MEME KANSERİ KO-KÜLTÜR MODELİNDE ESSİTALOPRAM OKSALATIN İMMÜNOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Nalan BİRİZ

Eskişehir 2021

MEME KANSERİ KO-KÜLTÜR MODELİNDE ESSİTALOPRAM OKSALATIN İMMÜNOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nalan BİRİZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK

Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Şubat 2021

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1905S060 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

ÖZET

MEME KANSERİ KO-KÜLTÜR MODELİNDE ESSİTALOPRAM OKSALATIN İMMÜNOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nalan BİRİZ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şubat 2021

Danışman: Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında %25.1 oranıyla en sık görülen kanser türüdür. Hastalarının 1/4'ünde, tanıdan sonra önemli depresyonlar görülebilmektedir. Meme kanseri tedavisi sırasında hastaların yaklaşık olarak yarısına seçici serotonin geri alım inhibitörü (SSRI) gibi psikotropik ilaçlar verilmektedir. Essitalopram oksalat antidepresan olarak kullanılan bir SSRI'dır. Bu maddenin meme kanseriyle menopoza bağlı sıcak basmalarında yan etkiyi hafifletici etkileri olduğu araştırmalar sonucunda ortaya çıkarılmıştır. Bu tezde; MCF-7, MDA-MB-231ve THP-1 hücre hatlarında essitalopram oksalatın sitotoksik etkilerinin konsantrasyon aralığı belirlenebilmek için MTS ve MTT testi kullanılmıştır. Sonrasında xCELLigence Gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle essitalopram oksalatın MCF-7 üzerinde IC_{50} değeri 13.7 μM, MDA-MB-231 hücrelerinde ise 10.9 μM olarak belirlenmiştir. AnneksinV-PI yöntemi ile essitalopram oksalatın apoptotik etlileri akış hücremetrede değerlendirilmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları ve LPS ile stimüle edilmiş THP-1 hücre hattı birlikte inkübe edilerek meme kanseri ko-kültür modeli oluşturulmuştur. Oluşturulan meme kanseri ko-kültür modelinde LPS stimülasyonu kullanılarak essitalopram oksalatın immünolojik etkileri, interlökin-1β (IL-1β), interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8), interlökin-10 (IL-10) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) seviyeleri akış sitometri de ölçülerek analiz edilmiş ve 1.07-3.75 kat aralığında değişen değerlerde inhibisyon yaptığı görülmüştür. Essitalopram oksalat, meme kanseri hücre hatlarının üzerinde sitotoksik etkinin yanında antiinflamatuar etkide göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Meme kanseri ko-kültür modeli, Essitalopram oksalat, RTCA DP, Akış sitometri

ABSTRACT

INVESTIGATION OF IMMUNOLOGICAL EFFECTS OF ESCITALOPRAM OXALATE IN BREAST CANCER CO-CULTURE MODEL

Nalan BİRİZ

Department of Pharmaceutical Microbiology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, February 2021

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK

Breast cancer is the most common type of cancer among women in the world with a rate of 25.1%. Significant depressions can be seen in 1/4 of the patients after diagnosis. During breast cancer treatment, approximately half of the patients are given psychotropic drugs such as selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). Escitalopram oxalate is an SSRI used as an antidepressant. As a result of research, it has been revealed that this substance has side effects alleviating effects in hot flashes due to breast cancer and menopause. In this thesis; MTS and MTT tests were used to determine the concentration range of cytotoxic effects of escitalopram oxalate in MCF-7, MDA-MB-231 and THP-1 cell lines. Afterward, the IC_{50} value of escitalopram oxalate on MCF-7 was determined as 13.7 µM and 10.9 µM in MDA-MB-231 cells using the Xcelligence Real-time cell analysis system. Apoptotic effects of escitalopram oxalate were evaluated in a flow cell meter by the Annexin V-PI method. A breast cancer coculture model was established by incubating MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines and LPS stimulated THP-1 cell line together. The immunological effects of escitalopram oxalate using LPS stimulation in the created breast cancer coculture model, interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interleukin-10 (IL-10), and the level of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) were measured and analyzed by flow cytometry, and it was observed that it inhibited values varying between 1.07-3.75 times. Escitalopram oxalate showed an anti-inflammatory effect as well as a cytotoxic effect on breast cancer cell lines.

Keywords: Breast cancer co-culture model, Escitalopram oxalate, RTCA DP, Flow Cytometry

TEŞEKKÜR

Başta bilgi birikimi ve tecrübeleri ile her daim yanımda olan; sevgisini, desteğini ve güvenini benden esirgemeyen danışmanım, akıl hocam sevgili Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK'e;

Bütün bilgi ve imkânları ile bana destek olan hocam Prof. Dr. Miriş DİKMEN'e;

Laboratuvar bilgileri ile ilerlememde bana yardımcı olan arkadaşım Songül GÖNEL'e;

Deney çalışmaları sırasında desteğiyle ve yardımıyla yanımda olan hocam Arş. Gör. Mustafa Güçlü ÖZARDA'ya, arkadaşım Perihan Ezgi TUNCER'e;

Tez Çalışmalarım sırasında bilgi ve yardımlarını benden esirgemeyen Arş. Gör. Elif KAYA TİLKİ'ye;

Yüksek lisans eğitimim süresince uzak olmamıza rağmen desteğini her zaman yanımda hissettiğim arkadaşlarım Seda Selen ÖKTEM, Eylül COLLET ve Büşra YAŞAR'a;

Maddi ve manevi destekleri ile benden hiçbir zaman vazgeçmeyen başta annem Nurperi BİRİZ olmak üzere dedem Okan UZAN, babaannem Ayşe BİRİZ ve bütün aileme sonsuz teşekkür derim.

03/02/2021

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan "bilimsel intihal tespit programı"yla tarandığını ve hiçbir şekilde "intihal içermediğini" beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

03/02/2021

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with "scientific plagiarism detection program" used by Anadolu University, and that "it does not have any plagiarism" whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KAPAK SAYFASI i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI ii
FINAL APPROVAL FOR THESIS iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
TEŞEKKÜR vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ vii
STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES viii
İÇİNDEKİLER ix
TABLOLAR DİZİNİ xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ xiv
GÖRSELLER DİZİNİ xvi
SİMGELER DİZİNİ xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. KAYNAK BİLGİSİ 3
2.1. Kanser 3
2.2. Meme Kanseri 3
2.3. Hücre Hatları 4
2.3.1. MCF-7 hücre hattı 4
2.3.2. MDA-MB-231 hücre hattı 5
2.3.3. THP-1 monosit hücre hattı 6
2.4. Meme Kanseri Tedavisinde Tamoksifen 6
2.5. Antidepresanlar 7
2.5.1. Seçici serotonin gerialım inhibitörü (SSRI) antidepresanlar 8
2.5.1.1. *Essitalopram Oksalat* 9
2.5.2. Meme kanserinde antidepresan tedavisi 10
2.6. İmmün Sistem 11
2.6.1. İmmün sistemin elemanları 12
2.6.1.1. *Makrofajlar* 12

2.6.1.2. *Mast hücreleri* **14**
2.6.1.3. *Lenfositler* **14**
2.6.1.4. *Doğal öldürücü hücreler (NK hücreler)* **14**
2.6.1.5. *Sitokinler* **15**
2.6.1.5.1. *İnterlökin-1β (IL-1β)* **15**
2.6.1.5.2. *İnterlökin-6 (IL-6)* **16**
2.6.1.5.3. İnterlökin-8 (IL-8) **17**
2.6.1.5.4. *İnterlökin-10 (IL-10)* **18**
2.6.1.5.5. *Tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α)* **18**
2.6.2. Meme kanseri ve immün sistem **19**
3. MALZEMELER **21**
3.1. Kullanılan Hücreler **21**
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Laboratuvar Gereçleri **21**
3.3. Kullanılan Laboratuvar Cihazları **22**
4. YÖNTEMLER **24**
4.1. Deneylerde Kullanılan Hücreler **24**
4.2. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması **24**
4.2.1. Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu **24**
4.2.2. Kullanılan kimyasal maddelerin hazırlanışı **24**
4.2.2.1. *Tamoksifen* **24**
4.2.2.2. *Essitalopram Oksalat* **24**
4.2.3. Kullanılan LPS'nin hazırlanışı **25**
4.2.3.1. *LPS E.coli 0111:B4* **25**
4.3. Hücre kültürü çalışmaları **25**
4.3.1. Hücre hatlarının çoğaltılması **25**
4.3.1.1. *MCF-7 hücre hattının kültür ortamında çoğaltılması* **25**
4.3.1.2. *MDA-MB-231 hücre hattının kültür ortamında çoğaltılması* .. **26**
4.3.1.3. *THP-1 hücre hattının kültür ortamında çoğaltılması* **27**
4.3.2. Hücrelerin sayılması **28**
4.3.2.1. *MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin sayımı* **28**
4.3.2.2. *THP-1 hücrelerinin sayımı* **28**
4.3.3. MTT ve MTS yöntemleri ile sitotoksisiste belirlenmesi **29**
4.3.3.1. *MTT yöntemi ile sitotoksisitenin belirlenmesi* **29**

4.3.3.1.1. ***MTT yönteminin uygulanması*** **..... 30**
4.3.3.2. ***MTS yöntemi ile sitotoksisitenin belirlenmesi*** **..... 30**
4.3.3.2.1. ***MTS yönteminin uygulanması*** **..... 31**
4.3.4. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi 32
4.3.4.1. ***xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Essitalopram Oksalat ve Tamoksifen için IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi*** **..... 33**
4.3.5. AnnexinV-PI yöntemi ile apoptotik etkinin akış sitometride belirlenmesi 33
4.3.5.1. ***Akış sitometride AnnexinV-PI yönteminin uygulanması*** **..... 34**
4.3.5.1.1. ***AnnexinV-PI yöntemi kullanılarak akış sitometride MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında Tamoksifen ve Essitalopram Oksalat'ın apoptotik etkilerinin belirlenmesi*** **..... 34**
4.3.6. ***E.coli*** **LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücrelerinde IL-1β seviyesinin akış sitometride ölçülmesi 35**
4.3.7. Meme kanseri ko-kültür modelinin oluşturulması 35
4.3.7.1. ***Oluşturulan meme kanseri ko-kültür modelinde tamoksifen ve essitalopram oksalatın IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF- α seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile ölçülmesi*** **..... 37**
4.3.8. Sitotoksisite yöntemlerinin istatistiksel analizi 39
5. BULGULAR VE TARTIŞMA 40
5.1. Essitalopram Oksalat ve Tamoksifen'in MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hatları İçin Sitotoksisitesinin MTT Yöntemi İle Değerlendirilmesi 40
5.2. Tamoksifen ve Essitalopram Oksalatın THP-1 Hücre Hattı İçin Sitotoksisitesinin MTS Yöntemi İle Değerlendirilmesi 43
5.3. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Essitalopram Oksalat ve Tamoksifen için IC_{50} Değerlerinin Değerlendirilmesi 45

5.4. AnnexinV-PI yöntemi kullanılarak akış sitometride MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında Tamoksifen ve Essitalopram Oksalat'ın apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi..... 52
5.5. E.coli LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücrelerinde IL-1β seviyesinin akış sitometride değerlendirilmesi..... 57
5.6. Oluşturulan meme kanseri ko-kültür modelinde tamoksifen ve essitalopram oksalatın immünolojik etkilerinin değerlendirilmesi..... 59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... 73
KAYNAKÇA..... 82
ÖZGEÇMİŞ..... 97

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Kullanılan meme kanseri hücre hatlarının sınıflandırılması 5

Tablo 5.1. MCF-7 hücrelerinin % canlılıkları 41

Tablo 5.2. MDA-MB-231 hücrelerinin % canlılıkları 41

Tablo 5.3. THP-1 hücrelerinin % canlılıkları 44

Tablo 5.4. Tamoksifen ve Essitalopram Oksalat'ın THP-1 hücre hattı için IC_{50} değerleri 45

Tablo 5.5. Tamoksifen ve Essitalopram Oksalat'ın MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları için IC_{50} değerleri 46

Tablo 5.6. Tamoksifen ve Essitalopram Oksalat'ın MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki apoptotik etkileri 53

Tablo 5.7. 1 μg/mL ve 100 ng/mL E.coli LPS'si ile muamele edilen THP-1 hücrelerinde IL-1β seviyeleri 58

Tablo 5.8. MCF-7 ko-kültür modelinde IL-1 β, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF-α sonuçları 60

Tablo 5.9. MDA-MB-231ko-kültür modelinde IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF-α sonuçları 65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Tamoksifenin kimyasal yapısı ve metabolitleri 7

Şekil 2.2. Essitalopram Oksalatın kimyasal yapısı 10

Şekil 4.1. MTT boyasının kimyasal yapısı (http-13) 29

Şekil 4.2. MTS boyasının kimyasal yapısı (http-14) 31

Şekil 4.3. Meme kanseri ko-kültür modelinin taslak şekli 37

Şekil 5.1. Essitalopram oksalat ve tamoksifen (pozitif kontrol) konsantrasyonlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki %hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi 40

Şekil 5.2. Essitalopram oksalat ve tamoksifen (pozitif kontrol) konsantrasyonlarının THP-1 hücre hattı üzerindeki %hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi 44

Şekil 5.3. Tamoksifen'in 48 saatlik konsantrasyonlarının MCF-7 hücre proliferasyon eğrisi 46

Şekil 5.4. RTCA DP sisteminde Tamoksifen'in MCF-7 hücrelerinde 48 saatteki CI değerlerine göre IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi 47

Şekil 5.5. Essitalopram Oksalat'ın 48 saatlik konsantrasyonlarının MCF-7 hücre proliferasyon eğrisi 47

Şekil 5.6. RTCA DP sisteminde Essitalopram Oksalat'ın MCF-7 hücrelerinde 48 saatteki CI değerlerine göre IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi 48

Şekil 5.7. Tamoksifen'in 48 saatlik konsantrasyonlarının MDA-MB-231 hücre proliferasyon eğrisi 49

Şekil 5.8. RTCA DP sisteminde Tamoksifen'in MDA-MB-231 hücrelerinde 48 saatteki CI değerlerine göre IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi 49

Şekil 5.9. Essitalopram Oksalat'ın 48 saatlik konsantrasyonlarının MDA-MB-231 hücre proliferasyon eğrisi 50

Şekil 5.10. RTCA DP sisteminde Essitalopram Oksalat'ın MDA-MB-231 hücrelerinde 48 saatteki CI değerlerine göre IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi 51

Şekil 5.11. Tamoksifen ve Essitalopram Oksalat'ın IC_{50} değerlerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki etkisinin Annexin-V – PI boyası ile boyanarak akış sitometride gösterilmesi 55

Şekil 5.12. 100 ng/mL ve 1 µg/mL E.coli LPS'si ile stimüle edilen THP-1 hücrelerinin IL-1β seviyeleri 58

Şekil 5.13. MCF-7 ko-kültür modelinde IL-1β seviyeleri 61

Şekil 5.14. MCF-7 ko-kültür modelinde IL-6 seviyeleri 62

Şekil 5.15. MCF-7 ko-kültür modelinde IL-8 seviyeleri 63

Şekil 5.16. MCF-7 ko-kültür modelinde IL-10 seviyeleri 64

Şekil 5.17. MCF-7 ko-kültür modelinde TNF-α seviyeleri 65

Şekil 5.18. MDA-MB-231 ko-kültür modelinde IL-1β seviyeleri 66

Şekil 5.19. MDA-MB-231 ko-kültür modelinde IL-6 seviyeleri 67

Şekil 5.20. MDA-MB-231 ko-kültür modelinde IL-8 seviyeleri 68

Şekil 5.21. MDA-MB-231 ko-kültür modelinde IL-10 seviyeleri 69

Şekil 5.22. MDA-MB-231 ko-kültür modelinde TNF-α seviyeleri 70

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 4.1. MCF-7 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü (10X)..... 26

Görsel 4.2. MDA-MB-231 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü (10X) 27

Görsel 4.3. THP-1 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü (20X) 28

SİMGELER DİZİNİ

8-OHdG	: 8-hidroksi-2'- deoksiguanozin
α	: Alfa
β	: Beta
ANOVA	: Varyans Analizi
ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
CI	: Hücre İndeksi
CYP	: Sitokrom P-450
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	: Ezyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi)
EMT	: Epithelial-Mesenchymal Transition (Epitelyal Mezenkimal Geçiş)
ER+	: Östrojen Pozitif
ER-	: Östrojen Negatif
FBS	: Fötal Sığır Serum
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FITC	: Fluorescein isothiocyanate (Floresan izotiyosiyanat)

Gr-	: Gram negatif
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü ReseptöRü
IC_{50}	: %50 İnhibitör Konsantrasyon
IL	: İnterlökin
IL-1β	: İnterlökin 1 Beta
LPS	: Lipopolisakkarit
MCF-7	: İnsan epitelyal adenokarsinom hücre hattı
MDA-MB-231	: İnsan epitelyal adenokarsinom hücre hattı
MTS	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrayolyum
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NK	: Naturel Killer (Doğal Öldürücü)
ort±	: Ortalama
PBS	: Phosphate buffered saline (Fosfat ile tamponlanmış tuz)
PE	: Phycoerythrin (Fitoeritrin)
Pen-Strep	: Penisilin-Streptomisin
PI	: Propidyum İyodid
PR+	: Progesteron Pozitif
PR-	: Progesteron Negatif
PS	: Fosfotidilserin
rpm	: Rounds per munite (Dakikadaki dönüş sayısı)

RPMI	: Roswell Park Memorial Institue
RTCA DP	:xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi
SARIs	: Serotonin antogonists and reuptake inhibitors (Serotonin antogonistleri ve geri alım inhibitöleri)
SCM	: Senescence-conditioned medium (Yaşlanma koşullu ortam)
SCF	: Stem Cell Factor (Kök hücre faktörü)
SMSs	: Serotonin modulators and stiulators (Serotonin düzenleyicileri ve uyarıcıları)
SASP	: Senescence-associated Secretory Phenotype (Yaşlanma ile ilişkili salgılama fenotipi)
SNRIs	: Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors (Serotonin-nöroepinefrin geri alım inhibitörleri)
SSRI	: Selective serotonin reuptake inhibitors (Seçici serotonin geri alım inhibitörü)
TAMs	: Tumor- associated macrophages (Tümörle ilişkili makrofaj)
TC	: T-sitotoksik hücreler T^8
TH	: T-yardımcı hücreler T^4
THP-1	: İnsan monositik lösemi hücre hattı
TNBC	: Triple-Negative Breast Cancer (Üçlü Negatif Meme Kanseri)
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TQ	: Timokinon
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gelişen teknoloji ve yapılan çalışmalar sonucunda hücrelerde meydana gelen DNA hasarı neticesinde hücrelerin kontrolsüz gelişip çoğalmasının kanser oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Baykara, 2016). Her yıl milyonlarca insan kansere yakalanmakta ve hayatını kaybetmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre sadece 2018 yılında 18.1 milyon insana kanser teşhisi konulmuş ve bunlardan 9.6 milyonu ne yazık ki hayatını kaybetmiştir (WHO, 2018).

Dünya genelinde en sık karşılaşılan kanser türü akciğer kanseriyken bunu meme kanseri takip etmektedir. Meme kanseri özellikle kadınlar arasında çok sık rastlanan bir kanser türü olup, hormon reseptörlerine göre sınıflandırılmaktadırlar. Hormon reseptörlerinin pozitif (+) ya da negatif (-) olmalarına göre meme kanserleri iyi prognoz ya da kötü prognoz göstermektedirler (Hefti vd., 2013).

Meme kanseri başlangıcı ve progresyonu inflamasyonla bağlantılıdır. Vücudumuzun immün sistem elemanlarından olan sitokinler ise inflamasyon durumunda hücreler arası iletişimde görev almaktadır (Esquivel-Velazquez vd., 2015). Yine immün sistemin önemli elemanlarından biri olan makrofajlar, meme tümör stromasının yarısıdan fazlasını işgal etmektedir. Bu da bizlere meme kanseri ile makrofaj yoğunluğunun ve meme kanseri ile mikro çevrenin ilişkili olduğunu göstermektedir (Poh ve Ernst, 2018).

Kanser hastalarının yaklaşık dörtte birinde tanı ve tedaviden sonraki dönemlerde depresyon gözlenmektedir (Lash vd., 2009). Bunun yanında meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoksifen, vücutta sitokrom P-450 adlı enzim sayesinde çalışmakta ve bazı antidepresanlar (fluoksetin, paroksetin gibi) bu enzimin üretilmesini negatif yönde etkilemektedir (Juurlink, 2016).

Meme kanseri olan hastaların depresyon sürecinde uygulanan antidepresan tedavilerinde seçici serotonin gerialım inhibitörü (SSRI) olan ilaçlar tercih edilmektedir. SSRI mekanizmasına sahip olan ilaçlar arasında sertalin, paroksetin, sitalopram, essitalopram, fluoksetin ve fluvoksamin türevi ilaçlar yer almaktadır. Bu ilaçlar depresyon tedavisinin yanında obsesif kompulsif bozukluğun, bipolar bozukluğun tedavisinde de kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar SSRI mekanizmasına sahip olan antidepresan türlerinin antikanserojen etkiye yol açabileceği ya da etki göstermeyeceği yönündedir (Ashbury vd., 2012).

Kanser tedavilerinde majör depresyonu engellemek için antidepresan kullanımı oldukça yaygındır. Bu yardımcı tedavi protokolü araştırmacıları antidepresanların antikanserojenik, pro/antiinflamatuar etkilerini araştırmaya yönlendirmiştir. Birçok antidepresan ilaç, farklı kanser türleri üzerinde antikanserojenik etkisi bakımından çalışılmıştır. Ancak bu çalışmalar genelde tek hücre hattı ile yapılmış olup, farklı meme kanseri türleri üzerindeki etkileri karşılaştırılmamış ve immün sisteme etkileri ile bir bağlantı kurulmamıştır.

Tez kapsamında; MCF-7, MDA-MB-231 ve THP-1 hücre hatlarında essitalopram oksalatın sitotoksik etkileri öncelikle MTS/MTT testi ile sitotoksik etkinin belirlenebilmesi için bir taramaya tabi tutulmuş, sonrasında Xcelligence Gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Belirlenen IC_{50} değerleri kullanılarak Anneksin V-PI testi ile akış hücremetrede apoptotik etki değerlendirilmiştir. THP-1 hücre hattı ile MCF-7 ve MDA-MB-231 ile meme kanseri hücre hatları kullanılarak, meme kanseri mikro çevresi oluşturularak ko-kültür modeli oluşturulmuştur. Oluşturulan meme kanseri ko-kültür modelinde essitalopram oksalatın IC_{50} konsantrasyonları kullanılarak, interlökin-1β (IL-1β), interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8), interlökin-10 (IL-10) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) seviyeleri immünolojik etki bakımından akış sitometride ölçülerek analiz edilmiştir.

Birçok antidepresanın kanser hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır, ancak bu çalışmada daha önce yapılan çalışmalardan farklı olarak tek hücre hattı kullanmak yerine farklı iki meme kanseri türü kullanılmıştır. Bu da farklı meme kanseri türlerinin birbirleri ile karşılaştırılmasına olanak sağlamıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Kanser

Gelişen teknoloji ve yapılan çalışmalar neticesinde hücrelerin DNA hasarı sonucu kontrolsüz büyüyerek çoğalması ile kanser oluşumunun geliştiği anlaşılmıştır. Vücudumuzda birçok mutasyon gerçekleşmektedir ve bu mutasyonlar sonucunda kanserli hücrelerin oluşumu söz konusudur. İmmün sistemimizin vücudumuzu taraması sonucu bu hücre yapıları yok edilmektedir (Baykara, 2016).

Mutasyon sonucu oluşan mutant hücreler değişen genetik yapıları nedeniyle anormal protein sentezine başlamaktadırlar. Bağışıklık sistemine yabancı olan bu anormal proteinler, oluşturulan antikorlar sayesinde ya da kanserli hücrelere karşı duyarlılık kazanan lenfosit oluşumu sayesinde yok edilmektedir (Pazarbaşı ve Kasap, 2003).

Mutasyon sonucu oluşan hücrelerin yaşama yetenekleri diğer normal hücre yapılarına göre daha azdır. Bu yüzden bağışıklık sistemimizin tepkisi ile karşılaşmadan da yok edilebilirler (Elmore, 2007). Bunun yanında vücudumuzda bulunan tümör baskılayıcı genler sayesinde de kontrol altında tutulabilmektedirler. Ancak çevresel etmenler ve genetik, kanser oluşumu üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (Sherr, 2004).

Kanserli hücreler gelişip büyüyerek tümörleri oluşturur. Oluşan kanser hücreleri fark edilmediği takdirde ya da tedavi edilmediğinde, bulundukları dokunun dışına çıkarak komşu dokulara yayılır ve buna invazyon denir. İnvazyonun gelişimini takiben kana ve lenf dolaşımına karışan kanser hücreleri vücutta ilgisiz bölgelere taşınabilir ve buralarda tümör oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu duruma ise metastaz denmektedir (Güllü ve Akalın, 2005).

Kanserler oluştukları, köken aldıkları dokudan isimlerini alırlar. Tipleri ise iyi huylu ve kötü huylu olarak temelde ikiye ayrılır. İyi huylu olan tümörlerin sınırları belirgin ve düzgün yapıdadır. Kötü huylu olan tümörlerin ise sınırları belirsizdir ve büyüyüp yayılma istekleri yüzünden dallanmış yapıdadırlar (Ünal, 2012).

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında görülme sıklığı %25.1 oranı ile en sık karşılaşılan kanser türünü oluşturmaktadır (Ghoncheh vd., 2016). Meme kanseri erkeklerde de görülmektedir, ancak görülme sıklığı kadınlara oranla çok daha azdır. Son yıllarda geliştirilen tanı ve tedavi yöntemleri sayesinde meme kanseri olan hastaların

sağkalım artışı önemli ölçüde artmıştır. Bütün bu gelişmelere rağmen meme kanserlerinin önemli bir kısmı ya tedaviye direnç göstermekte ya da tekrar etmektedir (Ahmad, 2013).

Meme kanseri genel anlamda bakıldığında heterojen yapıda bir kanser türüdür, ancak meme kanseri alt tiplerinin oluşumu hormonlar ile ilgilidir (World Cancer Research Fund, 2017). Genelde hormon reseptörlerine göre sınıflandırılan meme kanseri alt tipleri; östrojen pozitif (ER+), östrojen negatif (ER-), progesteron pozitif (PR+) ve progesteron negatif (PR-) olmak üzere dört tiptir (Hefti vd., 2013).

Hormon reseptörü pozitif olan meme kanseri alt tipleri, hormon reseptörü negatif olan meme kanseri alt tiplerine oranla daha iyi bir prognoza sahiptir. Bu bağlamda hormon reseptörü negatif olan meme kanseri alt tiplerinin daha agresif bir yapıya ve daha kötü bir prognoza sahip olduğu görülmektedir (Li vd., 2020).

2.3. Hücre Hatları

2.3.1. MCF-7 hücre hattı

MCF-7 hücre hattı ilk olarak 1970 yılında 69 yaşındaki Kafkas bir kadının meme dokusundan izole edilmiş, tipik hücre büyüklüğü 20-25 mikron olan oldukça yapışık bir hücre hattıdır. Yapılan mastektomi sonucunda kötü huylu bir adenokarsinom olduğu anlaşılmıştır. Donör meme kanseri radyoterapi ve hormon terapi ile tedavi edilmiştir. Yaygın olarak incelenen meme adenokarsinomundan türetilmiş bir epitel kanser hücre hattı olan MCF-7, farklılaşmış meme epitelinin özelliklerine sahiptir. MCF-7 hücre hattı östrojen ve progesteron pozitif (ER/PR +) ve insan epidermal büyüme faktörü reseprörü 2 negatif (HER2-)'tir (Subik, 2010).

MCF-7 hücre hattı 40 yıldan daha uzun süredir birçok grup tarafından çoğaltılmış ve kullanılmıştır. Anti-kanser ilaçlarla ilgili yapılan çalışmalar da dahil olmak üzere meme kanseri araştırmaları için uygun bir model hücre dizisidir. Normalde düşük metastatik potansiyele sahip olan MCF-7, zayıf agresif ve invazif olmayan bir hücre hattıdır (Comşa vd., 2015).

MCF-7 hücreleri *in vitro* şartlarda büyütüldüğünde üst üste katman oluşturabilir veya epitelyal hücreler gibi tek katlı olarak büyüyebilmektedir. Hücre hattının büyümesi TNF-α ile inhibe edilebilmektedir. Bunun yanında MCF-7 hücre hatları hücre büyümesinde etkili olan insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinleri sentezlerler. Anti-östrojenlerle tedavisi sonucunda bu büyüme faktörleri modüle edilebilir (http-1).

Parental MCF-7 hücreleri genelde göç etmezler. Meme kanserinde hücre göçü vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) etkisi ile gerçekleşmektedir ve MCF-7 hücrelerinde VEGF daha düşük seviyelerde ifade edilmektedir (Comşa vd., 2015).

Bilim adamları çalışmalar sonucunda MCF-7 hücre hattının kolay çoğaltılabilen ancak genellikle yavaş büyüyen bir hücre hattı olduğunu keşfetmişlerdir. MCF-7 hücre hattının iki katına çıkma süresi 30-40 saat kadar sürmektedir (http-2).

1970'lerin ortasında Lippman ve diğerleri genel olarak steroidal olmayan anti-östrojenlerin ve özellikle de tamoksifenin kültürde MCF-7 hücrelerinin büyümesini durdurabileceğini göstermiştir (Sweeney vd., 2012)

2.3.2. MDA-MB-231 hücre hattı

MDA-MB-231 hücre hattı metastatik meme adenokarsinomu olan 51 yaşındaki beyaz bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir (http-3).

MDA-MB-231 hücre hattı ER- ve PR- ve ayrıca HER2- yapıda bir hücre hattıdır (Subik, 2010). Bu nedenle oldukça agresif, istilacı ve kötü huylu üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücre hattıdır (Mohammed vd., 2020).

Meme kanserinde hücre göçünü indükleyen VEGF, MDA-MB-231 hücre hattında yüksek seviyelerde ifade edilir ve bu nedenle sınırlı tedavi seçenekleriyle TNBC yüksek invazif ve migrasyon kapasitesine sahiptir. Bu nedenle bu hücre hattının moleküler temelini anlamak, etkili yeni ilaçların geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir (Comşa vd., 2015).

MDA-MB-231 hücre hattı ile yapılan çalışmalar sonucunda, TNBC'nin agresif yapıda olduğu, bu hücre hattının çok kolay bir şekilde büyüdüğü ve geliştiği görülmüştür. Bunun yanında ER- olmasından kaynaklı olarak tamoksifen dahil olmak üzere anti-hormon bazlı tedavilere karşı duyarsızdır (Mohammed vd., 2020).

Tablo 2.1. *Kullanılan meme kanseri hücre hatlarının sınıflandırılması*

Hücre Hatları	ER	PR	HER2
MCF-7	+	+	-
MDA-MB-231	-	-	-

2.3.3. THP-1 monosit hücre hattı

THP-1 hücre hattı monosit/makrofaj fonksiyonlarını, mekanizmalarını sinyal yollarını, besin ve ilaç etkilerini incelemek için yaygın olarak kullanılan bir insan monositik lösemi hücre hattıdır (Tsuchiya vd., 1980). Bu hücreler yapıları gereği parlak, yuvarlak süspanse halde bir halde bulunmaktadırlar.

THP-1 monosit hücreleri birtakım kimyasallar yardımı ile *in vitro* ortamda farklılaştırılarak makrofajlarına dönüştürülebilmektedir (Auwerx, 1991). Ancak bu işlemlerin düzgün bir şekilde yapılabilmesi için THP-1 hücrelerinin log fazına geçmeleri yani gelişmeleri gerekmektedir. Gelişen THP-1 hücreleri kendi etraflarında toplanarak çiçeklenmiş bir görüntü oluştururlar. Bu sırada etraflarına salgıladıkları bir takım büyüme faktörleri ile süspanse halde olan bazı THP-1 hücreleri tabana yapışmaktadır.

2.4. Meme Kanseri Tedavisinde Tamoksifen

Hastalara uygulanan bileşik trans-tamoksifendir (sitrat tuzu olarak), çünkü bu izomer östrojen reseptörlerine cis izomerden daha yüksek afiniteye sahiptir. Trans-tamoksifen sadece anti-östrojenik değil, aynı zamanda tür, doku ve gene bağlı olarak östrojenik özelliklere de sahiptir. Tamoksifenin [2-[4-[(Z)-1,2-diphenylbut-1-enyl]phenoxy]-N,N-dimethylethanamine] insanlarda başlıca metabolitleri 4-hidroksitamoksifen ve N-desmetiltamoksifendir (Görsel 2.1.). Tamoksifen gibi ilaçlar, çoklu aktiviteleri nedeniyle daha doğru bir şekilde seçici östrojen reseptörü modülatörleri olarak adlandırılmaktadırlar (Osborne, 1998).

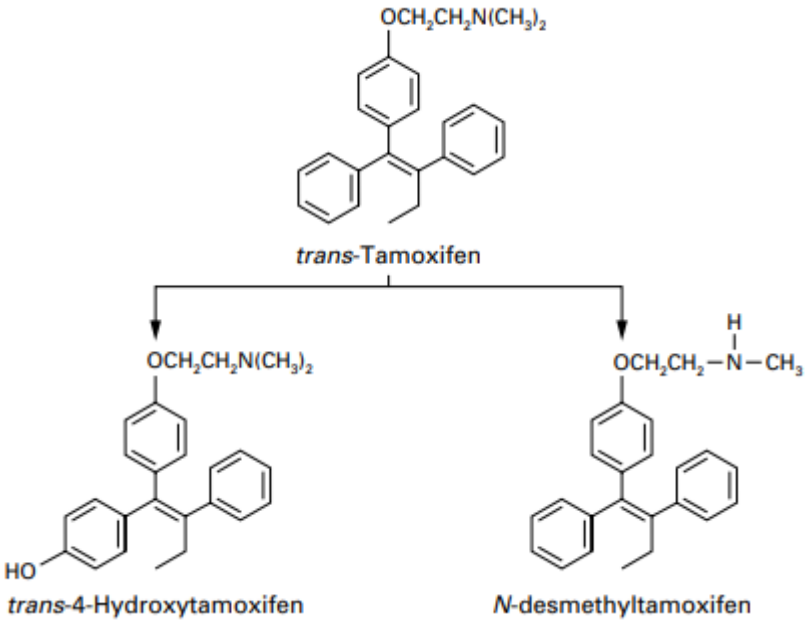
Tamoksifen, ilk jenerasyon selektif östrojen reseptör modülatörü (SERM)'dür. Östrojenin reseptörüne bağlanmasını engelleyerek meme kanserinin büyümesini durdurmaktadır. Kadınlarda ve erkeklerde meme kanserini önlemek için kullanılan bir ilaçtır. Bunun yanında diğer kanser tipleri üzerinde de çalışılmaktadır. Tamoksifen tipik olarak ağızdan alınan ve meme kanserinden sonra ki beş yıl boyunca kullanılan bir ilaçtır. Yapılan araştırmalarda tamoksifenin genellikle iyi tolere edildiği ancak yaşa bağlı olarak ciddi yan etkileri olabildiği görülmüştür (Mariantonietta vd., 2014).

Tamoksifen ER+ meme kanseri olan kadınların tedavisi için tercih edilen önemli bir tedavidir ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış tek hormonal ajandır (Dean, 2014).

Yaygın yan etkileri arasında menstural döngünün düzensizleşmesi, kilo kaybı ve sıcak basmaları görülmektedir (http-4). Anti-östrojen olan tamoksifen meme kanseri hücrelerinin büyümesini azalmaktadır (http-5) (Sweeney vd., 2012).

Tamoksifen ile ilgili bu zamana kadar yayınlanan çalışmalarda ER+ tümöre sahip olan hastalarda meme kanserinin tekrarlama riskinin %50 oranında azalttığı görülmüştür (Pan vd., 2017). Ayrıca erkek meme kanseri için kullanıla en yaygın hormon tedavisidir olmakla birlikte metastatik meme kanseri tedavisinde de kullanılmaktadır (http-6). Bunun yanında hastalığın nüks etme riski yüksek olan kadınlarda meme kanserinin önlenmesi için FDA tarafından onaylanmış bir ilaçtır.

Anti-östrojenler güçlü bir şekilde inhibe edicidir ve $3x10^{-7}$ M'dan büyük konsantrasyonlarda hücreleri öldürebilmektedir (Lippman vd., 1976). Yapılan araştırmalar sonucunda tamoksifenin diğer memede kanser oluşma riskini büyük ölçüde azalttığı görülmüştür (http-7). Ayrıca tamoksifen doğrudan programlanmış hücre ölümüne neden olabilmektedir (Osborne, 1998).



Şekil 2.1. *Tamoksifenin kimyasal yapısı ve metabolitleri (Osborne vd., 1998)*

2.5. Antidepresanlar

Antidepresanlar depresyon, anksiyete bozuklukları, kronik ağrı durumları gibi birtakım rahatsızlıkların tedavi edilmesi ya da etkilerinin hafifletilmesi için kullanılan

ilaçlardır (Jennigs, 2018). Antidepresanlar etkilerini hemen göstermeyip senelerce kullanılması gerekebilmektedir. Depresyon ve distimi gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılan antidepresanlar (Frick ve Rapanelli, 2013), genellikle depresif dönemlerden muzdarip olan kanser hastalarına reçete edilmektedir (Shuster vd., 1992).

Antidepresanların birçok farklı türü bulunmaktadır, ancak serotonin inhibitörleri açısından; seçici serotonin geri alım inhibitörü (SSRI), serotonin-nöroepinefrin geri alım inhibitörleri (SNRIs), serotonin antagonistleri ve geri alım inhibitörleri (SARIs) ile serotonin düzenleyicileri ve uyarıcıları (SMSs) olmak üzere dört temel tipi bulunmaktadır (Mandrioli vd., 2018).

Serotonin ve türevlerinin depresif bozuklukların gelişim mekanizmasına katılımı yaklaşık 40 yıldır incelenmektedir (Mendels ve Frazer, 1974). Seçici serotonin geri alım inhibitörü (SSRI) grubundan olan kimyasal ajanlar, 1980'li yıllarda ilk kez depresif bozuklukların farmakoterapisinde kullanılmıştır (Cohen vd., 2000).

SSRI'lar birçok ülkede en çok reçete edilen antidepresanlar olup, diğer bütün antidepresanlara göre daha iyi tolere edilebilmektedir (Ferguson, 2001).

SSRI'ların nörotransmitter serotonin hücre dışı seviye artışının, serotoninin presinaptik hücreye yeniden geri emilimini sınırlandırarak ve postsinaptik reseptöre bağlanmak için mevcut olan sinaptik yarıktaki serotonin seviyesini arttırdığına inanılmaktadır (Artigas vd., 2002). Saf SSRI'lar nöroepinefrin ve dopamin taşıyıcıları için sadece zayıf afiniteye sahipken, diğer monamin taşıyıcıları için değişen derecelerde seçiciliğe sahiptirler (Banzi vd., 2015).

Antidepresanların neoplastik hastalıkların seyrini değiştirebileceği düşünülmüş ve çeşitli bulgular sonucunda antidepresanların tümör hücrelerinin gelişmesine yardımcı olabileceği ya da aksine sebep olarak tümör gelişimini olumsuz etkilediği görülmüştür (Frick Rapanelli, 2013).

Yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda tümördeki serotonin seviyesinin kanser gelişimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu görülmüştür (Sarrouilhe ve Mesnil, 2019).

2.5.1. Seçici serotonin gerialım inhibitörü (SSRI) antidepresanlar

SSRI'lar yaygın olarak reçete edilen antidepresan sınıfı olup, yapılan araştırmalar serotonin düzeyinde ikincil olarak prolaktin aracılı bir mekanizmanın kanserojen etkiye

yol açabileceğini göstermektedir. Ancak Ashbury ve diğerlerinin 2003-2007 yılları arasında yaptığı çalışmada SSRI kullanımının meme kanserine dair kesin bir kanıtı bulunamamıştır (Ashbury vd., 2012).

Sertalin SSRI grubundaki bir madde olup yapılan bir çalışmada tekrarlanan dozlardan sonra interlökin-1 beta (IL-1β) mRNA ekspresyonunun ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) ekspresyonunun azalttığı görülmüştür (Sitges vd., 2014).

Öte yandan Lindavist ve diğerlerinin (2016) inceledikleri SSRI ile tedaviye zayıf yanıt ile karakterize edilen hastalarda devam eden bir inflamatuar sürecin (F2-izoprostanlar) göstergelerinin önemli ölçüde daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca sekiz haftalık bir tedavi sonrasında terapötik yanıtı zayıf olan grupta 8-OH 2-deoksiguanozin (8-OHdG) (DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte olan mutajen) artışı gözlenmiş; en yüksek iyileşme göstergelerine sahip hastalarda interlökin-6 (IL-6) seviyesinde önemli bir düşüş görülmüştür (Galecki vd., 2017).

Meme kanseri hastalarının yaklaşık dörtte birinde tanıdan sonraki dönemde depresyon gözlenmektedir. Major depresyon meme kanseri hastalarında fiziksel semptomların, fonksiyonel bozukluğun ve kötü tedaviye uyumun artmasına neden olmaktadır. Sık rastlanan bu durum tedavi edilememektedir (Lash vd., 2009).

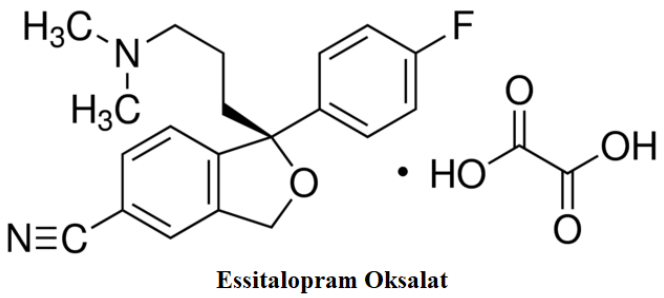
Meme kanseri tedavisinde depresyonu engellemek için hastaların hemen hemen yarısına SSRI gibi psikotropik ilaçlar verilmektedir. Düşük dozlarda kullanılan serotonin tümöre kan tedariğini azaltarak tümör büyümesinin inhibe eder ve bu da serotoninin tümör büyümesi üzerindeki etkisinin konsantrasyona bağlı olduğunun düşünülmesine neden olmaktadır (Sarrouilhe vd., 2015).

2.5.1.1. *Essitalopram Oksalat*

Essitalopram, SSRI mekanizmasına sahip olup, yan etkileri düşük olan bir antidepresan türüdür. (Kanarya Vardar vd., 2017). Serotonin özgüllüğü en yüksek ve en seçici moleküldür (Hedges ve Woon, 2007). Panik bozukluğunun ve depresyonun tedavisinde, depresyonun tekrarlanmasının önlenmesinde, agorafobi ve obsesif kompulsif bozukluğun tedavisinde kullanılmakta olan bir antidepresan türüdür.

Essitalopram oksalat [(1S)-1-[3-(dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorophenyl)-3H-2-benzofuran-5-carbonitrile;oxalic acid] (Görsel 2.2.) ince, beyaz ila hafif sarı bir toz olarak bulunur ve dimetilsülfoksit (DMSO) içinde serbestçe çözünür. SSRI mekanizmasına

sahip antidepresan türlerinden biridir ve majör depresyon, panik atak ve anksiyete bozukluğu tedavisinde kullanılmaktadır (http-8). Ayırca essitalopram oksalat sitokrom P-450 (CYP) hepatik enizimi tarafından metabolize edilir; CYP2C19 (%36), CYP2D6 (%30) ve CYP3A4 (%34) (Culpepper, 2002).



Şekil 2.2. *Essitalopram oksalatın kimyasal yapısı (http-9)*

Antidepresan olarak kullanılan essitalopram oksalat psikolojik problemlerin tedavisinde kullanılmasının yanı sıra, menopoza girmiş kadınlarda sıcak basmalarını ve meme kanseri sebebiyle oluşan yangıları hafiflettiği görülmüştür (http-10).

2.5.2. Meme kanserinde antidepresan tedavisi

Meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoksifen, sitokrom P-450 2D6 (CYP2D6) adlı bir enzim sayesinde vücutta çalışır ve bazı antidepresanlar (fluoksetin, paroksetin gibi) bu enzimin üretilmesini engelleyebilmektedir (http-10). Bunun yanında sertalin, sitalopram, essitalopram ve venlafaksin daha düşük düzeyde inhibisyona neden olur. Bu nedenle tamoksifen kullanan meme kanseri hastalarında depresyon tedavisi için daha makul alternatiflerdir (Juurlink, 2016).

CYP2D6 SSRI'ları metabolize ederken tamoksifeni daha aktif bir forma metabolize eder. Sitokrom P-450 2D6'nın hem tamoksifeni hem de SSRI'ı metabolize etmesi göz önünde bulundurulduğunda bu ilaçların aynı anda alınmalarının meme kanseri tekrarlama olasılığını azaltabileceği düşünülmektedir (Lash vd., 2010). Ancak yapılan çalışmalarda 184 meme kanseri nüksüne sahip hastalarda sitalopram kullanılmış ve eşdeğer takip sonrası nüks görülmeyen 184 uyumlu kontrol grubu incelenmiştir. Vakalar ve kontroller ER+ meme kanseri olan ve en çok 5 yıl boyunca tamoksifen alan kadın popülasyonunu içermektedir. Timothy L. Lash ve diğerlerinin yaptıkları çalışmaların sonucunda ise tamoksifen alırken devamlı sitalopram kullanan ER+/Tamoksifen kullanmış (TAM+)

kadınların, tamoksifen alırken hiç sitalopram kullanmayan kadınlarla aynı oranda meme kanseri nüksüne sahip olduğu görmüştür. Aynı şekilde ne sitalopram kullanımının ne de başka bir SSRI kullanımının, ER-/Tamoksifen kullanmamış (TAM-) kadınlarda nüks üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı, SSRI ilaçlarının doğrudan meme kanseri nüks riskini etkilemediğini öne sürmüşlerdir (Lash vd., 2010).

Bunun yanında Catherine M. Kelly ve diğerlerinin yapmış olduğu bir çalışmada 66 yaş ve üstü 24430 meme kanseri tanısı konulmuş kadın belirlenmiş ve bunlardan %30.6'sı tamoksifen ile tedavi sırasında en az bir antidepresan kullanmıştır. SSRI kullanmayan ya da birden fazla SSRI ile tedavi edilen hastalar, tamoksifene zayıf bağlı olan hastalar ve ölüm nedeni bilinmeyen hastalar hariç tutulduktan sonra analiz edilen kadınların (2430 kadın) %44.2'si takip sonunda hayatını kaybetmiştir. Bu kadınların %15.6'sının ölüm nedeni meme kanseri olarak kaydedilirken, ölüm riski ile SSRI'lara maruz kalma arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Kelly vd., 2009).

2.6. İmmün Sistem

İmmünite canlıların zararlı olan mikroorganizma, patojen, polisakkarit gibi madde ya da organizmalara karşı vermiş olduğu reaksiyondur. Vücudun yabancı bir madde ya da organizmayla karşılaşması durumunda hücreler ve moleküller arasında ortaya çıkan savunma immün yanıtı oluşmaktadır. İmmün yanıtı antijenler ya da immünojenler başlatabilir. İmmünojenler sadece immün yanıt oluşturma yeteneği olan herhangi bir maddeyi tanımlarken, antijenler organizmaların yapısına yabancı olan, immün yanıt oluşumundan sonra oluşan antikor ve hücre yüzey molekülleriyle birleşebilen maddelerdir. İmmün yanıtın oluşmasında görev alan bütün hücre ve moleküller immün sistemin birer elemanıdır (http-11).

İmmün sistem aktive olma özelliğine sahiptir ve spesifik antijeni tanır. Bu sayede aynı antijenle ikinci kez karşılaştığına etkili cevap oluşturur. Kendi hücrelerine karşı immün cevap oluşturmayan immün sistem karmaşık ve koruyucu bir sistemdir (Tunalı, 2015).

İmmün sistem, doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklığı sağlayan faktörlerden oluşur. En önemli işlevlerinden biri yabancı antijenlere karşı enfeksiyon oluşturmak ve savunma yapmaktır (Goldman ve Prabhakar, 1996).

İmmün sistem zararlı organizma ve maddelere karşı vücudu koruduğu gibi tümör gelişiminin farklı aşamalarında tümörleri tanımlayabilir ve yok edebilir (Jiand ve Shapiro,

2014). Kanser hücreleri, T-yardımcı hücreler (TH) T^4, T-sitotoksik hücreler (TC) T^8, doğal öldürücü hücreler ve makrofajlar tarafından yok edilir (Tunalı, 2015).

Tümörler tarafından aktive edilen T lenfositleri makrofaj uyarıcı etkisi olan faktörler salgılar ve bu sayede TC, makrofaj, B lenfositleri, NK hücreleri aktive olur. Makrofajların salgıladığı tümör nekroz faktör alfa (TNF-α) tümör hücreleri için sitotoksiktir (Tunalı, 2015).

2.6.1. İmmün sistemin elemanları

İmmün sistem organları kemik iliği ve timustan oluşan santral (primer); dalak, tonsiller, lenf düğümü ve lenfoid organlardan oluşan periferik (sekonder) organlar olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. Santral organlarda lenfositler antijene bağımlı olmadan devamlı olarak üretilir ve immün yanıt oluşturma yeteneği kazanır, periferik organlarda ise lenfositler çoğalır ve antijenik uyarılara cevap oluştururlar (Tunalı, 2015).

Santral organ elemanı olan kemik iliği, tüm kan hücrelerinin yapım yeridir. Buradaki kök hücreler farklılaşarak immün sistem hücrelerini oluşturur ve kan dolaşımına katılır (http-12).

2.6.1.1. *Makrofajlar*

Makrofajlar monositlerden köken almaktadır. Monositler kemik iliğinde üretildikten sonra kan dolaşımına katılır ve inflamasyonun kimyasal aracılarına yanıt verir. Bu aracılar tarafından aktive olan monositler endotele geçerek makrofajlara dönüşürler. Makrofajlar dokularda bulunan yabancı maddelerin, patojenlerin ve hücresel kalıntıların fagosite edilmesinden sorumlu hücrelerdir. Fagosite ettikleri yabancı maddelerden antijen salınımı yaparlar. Bu antijenler yardımcı T hücreleri tarafından tanınır ve B hücreleri uyarılır. Böylece antijene özgü antikor üretimi ve salınımı başlar. Makrofajların duyarlılıkları antikora sahip olan hücrelere karşı daha yüksektir. Fagosite yetenekleri sayesinde patojenleri sindirmeleri göz önüne alındığında makrofajlar immün sistem için önemli bir yere sahiptir (Stewart vd., 2012).

İmmün hücreler ve hücre dışı matriks gibi tümör mikro çevresindeki malign olmayan hücrelerden biri de tümörle ilişkili makrofajlar (TAMs)'dır. Bu makrofajlar tümör hücrelerini öldürebileceği gibi, tümör hücrelerinin büyümesine ve metastazına da sebep olabilmektedir (Oui vd., 2018). Farklı şekillerde koruyucu olabilen makrofajlar, tümör hücrelerini öldüren tedavileri takiben bu hücreleri fagositoz ile uzaklaştırabilir.

Bunun yanında zararlı da olabilen makrofajlar çeşitli kemoterapileri, radyoterapileri ve immünoterapileri de baskılayabilmektedir (Miller vd., 2015).

Meme kanserinin dayanıklı bir kanser türü olması mikro çevrenin önemini arttırmaktadır. Meme kanseri stromasında makrofajlar tümör kitlesinin %50'den fazlasını işgal edebilmektedir. Bu da makrofaj yoğunluğu ile zayıf hasta prognozu arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir (Poh ve Ernst, 2018).

Makrofajlara bakıldığında tümör stromasının anahtar bileşenlerinden biri olduğuna ve meme kanseri prognozunu bir şekilde etkilediğine dair net kanıtlar bulunmaktadır. Meme kanseri dayanıklı bir kanser türü olup mikro çevre özellikle önemlidir. Makrofajların meme kanser stromasını işgal ettiği göz önünde bulundurulduğunda makrofaj yoğunluğu ile hasta prognozu arasında bir ilişki olduğu görülmektedir (Ward vd., 2015). Meme kanseri tümörünü infiltre eden lenfositlerin (lenfositik infiltrasyon) fonksiyonel ve prognostik önemi açık değildir (Ögmundsdottır vd., 1995).

Makrofajlar kemik iliğindeki progenitör hücrelerden kaynaklanan monositerden farklılaşan beyaz kan hücreleridir ve monositlerin periferal kandan dokuya geçmesi sonucu farklılaşarak yerleşik makrofaj olarak adlandırılırlar (Gordon, 2003). Bunun yanında monositler hasara bağlı iltihaplanmalara yanıt olarak hücresel kalıntıları fagosite etmek, enfeksiyonla mücadele etmek ve yara iyileşmesini destekleyen bileşikler salgılamak ve farklılaşmak için yaralı dokuya göç ederler. Ayrıca makrofajlar yaraların iyileşmesine ve makrofaj tepkilerinin tümör progresyonu ile bağıntılı olduğuna dair gözlemlerle tutarlı olarak, tümörlerin gelişimini destekleyebilirler. Anjiyogenez ve büyüme faktörü sekresyonunu uyararak diğer bağışıklık yanıtlarını baskılayarak ya da invazyon ve metastazı kolaylaştırarak tümör büyümesini arttırırlar (Stewart vd., 2012).

2000'den fazla meme kanseri hastasını içeren bir araştırmada, TAM infiltrasyon yoğunluğu ile kötü hasta prognozunun orantılı olduğu görülmüştür (Zhang vd., 2012). TAM'lar, tümör hücresi büyümesi, istilası ve metastazı dahil olmak üzere göğüs tümörünün ilerlemesini uyarır. TAM'lar ayrıca meme kanseri modellerinde birden fazla tedavi türüne karşı direnç oluşturur. Bütün bu veriler sonucunda TAM'lar meme kanserinde potansiyel bir terapötik hedef olarak ilgi görmektedir (Oui vd., 2018).

2.6.1.2. *Mast hücreleri*

Bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olan mast hücreler, alerji hücreleri olarak da bilinmektedir. Sitoplazmalarında çok sayıda granül bulundurmaları ile immün sistemin diğer hücrelerinden ayrılan mast hücreleri kemik iliği kökenlidir. Dolaşımda progenitör hücreler olarak bulunurken, dokuda olgunlaşıp farklılaşırlar. Mast hücrelerinin aktive olup farklıklaşması için kök hücre föktörü (SCF) reseptörleri gereklidir. Bunun dışında T hücre kökenli IL-3, IL-6, IL-9'da mast hücrelerin aktivasyonunda önemlidir (Bayramgürler vd., 2013).

Mast hücreleri yara iyileşmesinin başlangıç dönemi olan inflamatuar yanıttan itibaren tüm fazlarda etkilidir. Bunun yanında mast hücre mediatörlerinden olan TNF-α, IL-1 ve IL-6 tümör gelişiminde de etkilidir (Gilfillan ve Beaven, 2011).

2.6.1.3. *Lenfositler*

Görünüşte tek tip beyaz kan hücreleri olan lenfositler, fonksiyonları bakımından farklılık gösterirler. T ve B lenfositlerle birlikte doğal öldürücü hücreleri (NK) içeren lenfositler antikor üretiminden, enfekte olmuş hücrelerle ve tümör hücrelerinin doğrudan öldürülmesinden ve bağışıklık yanıtının düzenlenmesinden sorumludur (LaRosa ve Organge, 2007).

Dolaşımda yer alan lenfositlerin %80'i T lenfositler iken sadece %15'i B lenfositlerden oluşur ve kalan hücre yapıları ile NK hücreleridir. Timusta çoğalma ve farklılaşma yeteneği kazanan T lenfositler, özgül antijenlerle karşılaşarak başkalaşır ve bellekli lenfositleri oluşturur. Başkalaşan T lenfositleri yıllarca yaşayabilir. Lenfositler kemik iliğinde lenfosit özelliklerini kazanır. Başkalaşan T lenfositleri T hücre reseptörleri kazanırlar ve bu sayede farklı antijenleri tanıyabilirler. İmmün yanıtta anahtar rol oynayan T lenfositler aynı zamanda tümör immonolojisinde de görevlidir (Tunalı, 2015).

2.6.1.4. *Doğal öldürücü hücreler (NK hücreler)*

Periferal kan mononükleer hücrelerin % 4-15'ini oluşturan NK hücreleri tümörlerde ve viral enfeksiyonlarda önemli bir role sahiptir. Kemik iliğinden köken alan bu hücreler gelişip çoğalmak için yine kemik iliğine gerek duyarlar. Özellikle dalakta yoğun halde bulanan NK hücreleri diğer lenfoid dokularda az sayıdadır (Tekeli ve Özenci, 1997).

Bazı tümör hücrelerini ve virüsle enfekte olan hücreleri duyarlanma olmadan öldürme yeteneğine sahip olmaları ile T ve B hücrelerinden ayrılmaktadırlar (Tunalı, 2015).

2.6.1.5. *Sitokinler*

Sitokinler bağışıklık sistemindeki hücreler arası iletişime aracılık eden ve yüksek oranda indüklenebilen proteinlerdir (Esquivel-Velazquez vd., 2015). İmmün sistem regülasyonu ve inflamatuar olaylarda sitokinlerin önemli bir yeri vardır. Vücuda giren yabancı ajan ve antijenlere karşı organizmada reaksiyonları düzenleyici ve kontrol edici önemli bir role sahiptir. Bunun yanı sıra lokal ve sistemik inflamatuara cevap oluşturmak için hücreler arası iletişimde de görev almaktadırlar. Sitokinler çeşitli hücreler tarafından üretilmeleri bakımından hormonlardan ayrılmaktadırlar, bu nedenle hormona benzemelerine rağmen hormon olarak kabul edilmezler. İmmün sisteminin en önemli sitokinlerini interlökinler oluşturmaktadır ve immün sistem hücrelerini uyarmakla görevlidirler (Mayer, 2016).

Sitokinlerin immün cevapta hücreler arası iletişimi sağlamak, kemik iliğinden kan hücrelerinin oluşumunu düzenlemek, immün cevabı arttırmak gibi birçok görevi vardır (Tunalı, 2015). Son yıllarda sitokinlerin bir kısmının ve reseptörlerinin fizyolojik ve patolojik koşullar altında organizmada üretildiği anlaşılmıştır (Esquivel-Velazquez vd., 2015).

Sitokinler, tümör büyümesi ve metastazının önemli aracılarıdır ve bunlardan bazıları tümörün bağışıklık yanıtlarından kaçmasına ve bunlardan faydalanmasına yardımcı olur (Esquivel-Velazquez vd., 2015).

Çeşitli sitokinler inflamatuar tümör mikro çevresini düzenler. Tümör mikro çevresindeki iltihaplanma, tümörün yanıt verdiği sitokinleri, kemokinleri ve büyüme faktörü salgılayan infitre bağışıklık hücrelerinini ve aktive edilmiş fibroblastları içerir. IL-1, IL-6 gibi bazı interlökinler ve büyüme faktörlerinin bir kısmı kanser hücre çoğalmasını uyarır (Nicolini vd., 2006).

2.6.1.5.1. *İnterlökin-1β (IL-1β)*

İnflamatuar bir sitokin olan IL-1'in çeşitli fizyolojik, patolojik öneme sahip olduğu ve hastalık, sağlık durumlarında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Kaneko vd., 2019).

Öncelikli olarak monosit ve makrofajlardan salınan IL-1'ler tüm çekirdekli hücreler tarafından da salınabilir (Tunalı, 2015). α ve β olmak üzere %30 homolog moleküldür ve aynı reseptöre bağlanmaktadır (Saçu 2008). Dolaşımda ise en çok bulunan IL-1β'dır. (Bilgehan, 1993). IL-1'in immün sistem hücreleri üzerindeki etkileri ise genellikle TNF ve IL-6 ile birlikte görülmektedir (Abul vd., 2000).

Tümör mikro çevresinin en önemli bileşeni inflamasyondur ve bir çok kanıt IL-1 tümör ilerlemesinde anahtar rol oynayan bir inflamatuar sitokin olduğunu göstermektedir (Mantovani vd., 2018).

Dolaşımda en çok bulunan IL-1β'nın ekspresyonunun çeşitli kanser türlerinde (meme kanseri dahil) yüksek ve tümörleri IL-1β üreten hastaların da genelde daha kötü prognaza sahip olduğu görülmüştür (Holen vd., 2016). Yüksek serum IL-1β seviyeleri, meme kanserli hastalarda yüksek oranda nüks ile korelasyon göstermiştir (Nicolini vd., 2015).

Yapılan çalışmalarda sitokin üretimi ve yeni endotelyal hücre gelişimi arasında bir geri bildirim olduğu ve IL-1β ile TNF-α üretiminin bloke edilmesi ile yeni kan damarlarının oluşumunun önüne geçilmiştir. Bu sayede tümörün besin açlığından ve oksijensizlikten ölümü sağlanmıştır (Holen vd., 2016).

2.6.1.5.2. *İnterlökin-6 (IL-6)*

IL-6, hem bir pro-inflamatuar hem de bir anti-inflamatuar sitokin olarak işlev görmektedir. Fibroblast, T, B lenfositleri, monositler, endotel ve epitel hücrelerinde sentezlenirler (Tunalı, 2015).

IL-6, tümör hücrelerinde anti-apoptotik ve anjiyojenik proteinleri yukarı doğru düzenleyerek tümör büyümesini destekler. Bunun yanında IL-6 ve IL-1β'nın östrojen üretimi yoluyla meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu uyardığı hipotezi öne sürülmüştür (Nicolini vd., 2015).

Yapılan çalışmalarda meme kanseri hücre hatlarında da IL-6 salgılandığı ancak ER+ olan hücre hatlarında ER- hücre hatlarına göre bu salgının daha az olduğu görülmüştür. IL-6, ER+ hücrelerde çoğalmayı ve agresif bir fenotipi indükler (Sasser vd., 2007). Bunun yanında IL-6'ya uzun süre maruz kalınmasının hücrelerde yaşlanmaya neden olduğu ve epitelyal mezenkimal geçişi (EMT) indüklediği görülmüştür (Esquivel-Valezquez vd., 2015).

EMT hücrelerin epitelden mezenkimal hücreye farklılaşmasına neden olan ve hücrelerin kendiliğinden gerçekleştirdiği bir dönüşümdür. Epitel hücreler çevre dokulara daha sıkı tutunurken mezenkimal hücreler çevrelerindeki doku ve hücrelerle daha az tutunur. Bu da özellikle kanser hücrelerinde metastazı indükleyebilir (Sun, 2016).

Yapılan araştırmalar sonucunda hücre yaşlanması ile tümör oluşumunun ilişkili olduğu ve yaşlanan hücrelerin tümöre izin veren mikro çevreyi indüklediği anlaşılmıştır. Yaşlanma ile ilgili bütün mekanizmalar arasında en çok yaşlanma ile ilişkili salgı fenotipi (SASP) ilgi çekmektedir. IL-6'nın SASP yanıtının sürdürülmesinden ve yayılmasından sorumlu olduğu bilinmektedir (Ortiz-Montero vd., 2017).

Yapılan bazı çalışmalarda yaşlanma ile ilişkili pro-inflamatuar ortamdaki MCF-7 meme kanseri hücrelerinin, daha agresif hücrelerin özelliklerini taşıdığı, daha yüksek morbiliteye sahip bir mezenkimal morfolojiye sahip oldukları ve dolayısıyla bir EMT programına benzediği görülmüştür. IL-6'nın esas olarak yaşlanmış hücreler tarafından eksprese edildiği son zamanlarda gösterilmiştir Bununla birlikte yaşlanma koşullu ortamda inkübe edilen MCF-7 hücre hattında IL-6 salgılanması artmıştır ve bu da IL-6'nın kanser gelişimini ve ilerlemesinde rol oynayabileceğini göstermiştir. (Ortiz-Montero vd., 2017).

IL-6'nın tümör hücrelerinde anti-apoptotik ve anti-anjiyojenik proteini düzenleyerek tümör büyümesini teşvik ettiği bilinmektedir. Yine de IL-6 meme kanserini hem pozitif hem de negatif prognostikatörü olarak bildirilmiştir (Hamidullah vd., 2012).

MCF-7 hücre hattına sahip meme kanserinde IL-6 eksprese edilmezken, IL-6'nın MDA-MB-231 hücre hattında agresif özellikleri sürdürmek için önemli olduğu görülmüştür (Esquivel-Valezquez vd., 2015).

2.6.1.5.3. *İnterlökin-8 (IL-8)*

Temel etkisini nötrofiller üzerinde gösteren bir sitokin olan IL-8, lipopolisakkarit (LPS) ya da TNF ve IL-1 ile stimüle olmuş mononükleer fagositler, endotelyal ve epitel hücreler ile fibroblastlar tarafından yapılır (Akyol, 1994).

IL-8 kanserde neovaskülarizasyonu yani damarlanmayı indükleyen anjiyojenik bir moleküldür (Derin vd., 2007). Otokrin veya parakrin tümörü teşvik edici bir role sahip olan IL-8 çoğunlukla ER ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 ekspresyonu ile belirlenen göğüs kanserinde rol oynayabilir. IL-8, ER- meme kanserinde yüksek oranda eksprese edilir, ancak ER- ve ER+ her iki meme kanserinde de invazivliği ve metastazı

arttırır. Öte yandan düşük seviyelerde HER2 eksprese eden göğüs kanseri hücrelerinde (MCF-7 ve T-74D gibi) HER2'nin yeniden ekspresyonu daha yüksek IL-8 ekspresyonu ile sonuçlanabilir (Todoroviç-Rakovic ve Milovanovic, 2013). Yapılan araştırmalarda ilerlemiş meme kanseri hastalarında IL-8 seviyesinin daha yüksek olduğu ve meme kanserinin klinik evresi ile IL-8 seviyesinin doğrudan kolerasyon gösterdiği anlaşılmıştır (Nicolini vd., 2015).

IL-8'de IL-6 gibi hücrelerin SASP yanıtının sürdürülmesinden ve yayılmasından sorumludur ve hücre yaşlanmasının tümör destekleyici mikro çevre ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Ortiz-Montero vd., 2017).

2.6.1.5.4. *İnterlökin-10 (IL-10)*

İnterlökin 10, aktive edilmiş makrofajlar ve TH2 hücreleri tarafından üretilen anti-inflamatuar bir sitokindir (Mayer, 2016) ve hücresel bağışıklığın kontrol edilmesinde görevlidir (Balkwill, 2020).

IL-10, meme kanserinde bağışıklığın baskılanmasında rol oynamakla birlikte anti-tümör yanıtta da rol oynamaktadır. Ayrıca *in vitro* olarak kültürlenen tümör hücre hatlarında IL-10'un eksprese edildiği görülmüştür ve bu da IL-10'un immün baskılayıcı bir tümör mikro çevresi oluşturduğunu düşündürmektedir (Esquivel-Velazquez vd., 2015).

Artmış IL-10 konsantrasyonu sıklıkla meme kanseri hastalarının serumunda tespit edilir (Hamidullah vd., 2012). Serumda yüksek seviyelerde IL-10, IL-6'yı baskılayarak tümör büyümesini inhibe edebilir, ancak daha yüksek seviyelerde kötü prognozla ilişkilidir (Kozlowski vd., 2003, Merendino vd., 1996).

IL-10 ER+ tümörlere kıyasla ER- tümörlerde daha fazla eksprese edilir ve PR+ tümörlü hastalarda IL-10 seviyesi daha azdır (Hamidullah vd., 2012).

2.6.1.5.5. *Tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α)*

Makrofajlar ve bazı diğer hücreler tarafından üretilen TNF-α inflamasyon mekanizmasında önemli bir yere sahiptir ve ve bir çok inflamatuar hastalığın tedavisinde kullanılmaktadırlar (Gürek vd., 2014).

Meme karsinomlarında yüksek oranda eksprese edilen inflamatuar bir sitokin olan TNF-α (Leek vd., 1998), LPS'lere yanıt olarak tümör hücreleri tarafından serbest bırakılmaktadır (Edwardson vd., 2017).

TNF-α, doğuştan gelen ve adaptif immün yanıtların ana düzenleyicisi ve birçok inflamatuar bozuklukta anahtar rol oynar. Miyeloid hücreler, endotelyal, epitel hücreleri ve tümör hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından salındığı ve etkisi olduğu gösterilmiştir (Edwardson vd., 2017). TNF-α'nın inhibisyonu, kimyasal olarak indüklenen meme tümör oluşumuna karşı koruyucudur (Connelly ve diğerleri 2011).

Meme tümörlerinde TNF-α'nın kronik ifadesi, tümör büyümesini destekler, ancak TNF-α'nın *in vitro* etkileri meme kanseri hücre hatları arasında farklılık gösterir. TNF-α tümör büyümesini ve göçünü arttırırken, yüksek dozlarda TNF-α'nın lokal uygulaması güçlü anti-anjiyojenik ve antitümoral etkilere sahip olduğunu göstermektedir (Hamed ve diğerleri 2012).

2.6.2. Meme kanseri ve immün sistem

Erken teşhis ve ileri terapötiklerde önemli yeniliklere rağmen hala meme kanseri nüksü nodül negatiflerde %30, nodül pozitiflerde %70 kadardır. Karmaşık bir dizi bağışıklık hücresi meme tümörlerinin gelişimini, ilerlemesini ve metastazını infiltre etmektedir. Bunun yanında sistemik terapilerin meme tümörleri üzerinde etkili olduğunun kabul edilmesi immünoterapinin gelişiminde büyük bir ilgi uyandırmıştır (Nakasone vd., 2018). Hem de doğuştan hem de adaptif bağışıklık sisteminin meme kanseri olan kadınlarda nüksü önleme üzerindeki etkilerine dair kanıtlar gözden geçirilmiştir. Meme kanseri nüksünde ve önlenmesinde T hücreleri, düzenleyici T hücreleri, NK hücreleri dahil olmak lenfositler ve bunların sitokin salınım modellerinin etkisi vardır. Kanser prognozu bağışıklık sistemi fonksiyonel durumu ile ilişkili olabilir. Bağışıklık sisteminin meme kanserinde nedensel bir rolü olduğu hipotezi epidemiyolojik, klinik öncesi ve klinik araştırmalarla desteklenmektedir (Standish vd., 2008).

Meme kanseri başlangıcının ve progresyonunun inflamasyonla bağlantılı olduğu yapılan çalışmalar sonucunda görülmüştür. Bunun yanı sıra araştırmalar sonucunda malign dokularda B hücreleri, T hücreleri, eozinofiller ve makrofajlar da dahil olmak üzere doğuştan ve adaptif immün hücrelerin varlığında önemli bir artış olduğu gösterilmiştir. Meme kanseri hücreleri ile makrofajların etkileşimlerinin, makrofaj fenotipini etkileyen sitokinler dahil olmak üzere yüksek sitokin ekspresyonu ile sonuçlanabileceği gözlemlenmiştir (Stewart vd., 2013).

Yapılan çalışmalarda meme kanserinde ER +/- hücre hatları sitokin salınımı açısından farklılık göstermektedir. IL-6 hem ER+ hem de ER- hücre hatlarından

salgılanmaktadır. Ancak ER- hücre hatlarında daha yüksek oranda salgılanan IL-6 kötü prognoza neden olmaktadır (Sasse vd., 2007). IL-8 ise ER- hücre hatlarından yüksek oranlarda salınarak kötü prognoza sebep olmaktadır (Todoroviç-Rakovic ve Milovanovic, 2013), IL-10'un yüksek oranda salınımı IL-6'nın etkisini inhibe edebilmektedir. Ancak daha yüksek oranda IL-10 kötü prognoza sebep olmaktadır (Kozlowski vd., 2003, Merendino vd., 1996). Dolaşımda en çok bulunan IL-1 olan IL-1β'nın yüksek oranda salınımı da yine meme kanseri nüksüne ve kötü prognoza sebep olabilmektedir (Nicolini vd., 2015). IL-1B ve TNF-α üretiminin bloke edilmesi ile tümörlerde gelişmenin önüne geçilebilmektedir (Holen vd., 2016). Tümör büyümesini ve göçünü arttıran TNF-α'nın yüksek oranda lokal uygulanması yoluyla anti-tümöral etkiler gösterdiği yapılan çalışmalar sonucunda görülmüştür (Hamed vd., 2012).

3. MALZEMELER

3.1. Kullanılan Hücreler

Meme kanseri hücre hatları olarak MCF-7 (ATCC® HTB-22™) hücre hattı ve MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™), insan monosit hücre hattı olarak ise THP-1 (ATCC® TIB-202™) hücre hattı kullanıldı.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Laboratuvar Gereçleri

Essitalopram Oksalat (MA=414.433 g/mol, Almanya)

Tamoksifen (MA=371.52 g/mol, 50MG-Sigma, Almanya)

Lipopolisakkarit *E.coli* 0111:B4 (L4391 1MG-Sigma, Almanya)

Penisilin/Streptomisin (Biological Industries, İsrail)

Piromisin (İnvivogen, ABD)

B-Merkaptoetanol (AppliChem, Almanya)

Tripan mavisi (Roche, Almanya)

Tripsin-EDTA 10X (Pan, Biotch, Almanya)

MTT (Sigma-Aldrich, Almanya)

MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, ABD)

Phosphate Buffer Salina (PBS) (İnvitrogen, ABD)

RPMI-1640 medyum (1X) (HyClone, Thermo Scientific, ABD)

DMEM meydum (1X) (HyClone, Thermo Scientific, ABD)

Fetal Sığır Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Almanya)

Dimetilsülfoksit (DMSO) (Roth, Almanya)

Apoptoz Test Kiti (Serva, Almanya)

Fix&Perm Hücre Geçirgenlik Kiti (Life Teknoloji, ABD)

İnterlökin 1-βB, İnterlökin-6, İnterlökin-8, İnterlökin-10 (Biolegend, ABD)

TNF-α (Beckman Coulter, ABD)

10, 100, 1000 ve 5000 µl'lik otomatik pipetler (Eppendorf, Kanada)

10, 200, 1000 µl'lik mikropipet ucu (İsolab, Almanya)

12 kanallı otomatik pipet (Eppendorf, Kanada)

15 ve 50 ml'lik santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya)

25 cm^2-75 cm^2 'lik hücre kültür flaskı (Nest, China)

2ml'lik Ependorf tüp (Greiner bio-one, ABD)

5 mL, 10mL ve 25 ml'lik serolojik pipet (Nest, China)

6 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası (Nest, China)

Cedex Smart Slide (Roche, Almanya)

Kryotüp (2ml) (Cryos, Türkiye)

Lamel (Isolab, Almanya)

Şarjlı pipetör (Starlab, Almanya)

Corning HTS Transwell-24 kuyucuklu 0.4 µM por açıklığına sahip ko-kültür plakası (Corning, Amerika)

xCELLigence E-plate 16 (Roche, Almanya)

5 mL, 10 mL, 25 mL cam pipet (HGB, Almanya)

3.3. Kullanılan Laboratuvar Cihazları

Cedex XS (Innovatis, Almanya)

xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) (Roche, Almanya)

Derin dondurucu buzdolabı (Lıebherr, Almanya)

Akış sitometri cihazı (BD Accuri C6, ABD)

Hassas terazi (Sartorius, Almanya),

İnverted mikroskop (Leica, Almanya)

Laminar Flow Kabin (Heal Force)

Masaüstü soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya)

Mikro santrifüj (Hettich, Almanya)

Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (ELISA okuyucu) (BioTek, Belçika)

Otoklav (Alp, Türkiye)

Kuru Hava Sterilizatörü (Nüve FN 500, Türkiye)

Otomatik pipetler (Eppendorf, Kanada).

Steril CO2 inkübatörü (Thermo Scientific, ABD)

Vorteks (Daihan, Güney Kore)

Su banyosu (Lab Companion, Güney Kore)

4. YÖNTEMLER

4.1. Deneylerde Kullanılan Hücreler

Çalışmamızda kullanılan hücre hatları; insan ER+ meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 (ATCC® HTB-22™), insan TNBC hücre hattı olan MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) ve insan monosit hücre hattı olan THP-1 (ATCC® TIB-202™), hücre hatlarıdır.

4.2. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

4.2.1. Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu

Kullanılan sıvı solüsyonlar, falkonlar, şişeler, rezervuarlar ve küvetler uygun şekilde alüminyum folyo ile sarılarak otoklavda 121ºC, 1.5 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Cam pipetler teneke kutulara, lameller ise petriye aktarılarak uygun şekilde alüminyum ile sarılmış, sterilizatörde 170 ºC'de 3 saat steril edilmiştir.

4.2.2. Kullanılan kimyasal maddelerin hazırlanışı

4.2.2.1. *Tamoksifen*

Toz halindeki tamoksifenden 3.78 mg tartılarak 100 µL DMSO ile çözdürülmüş ve sonuç olarak 100 mM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok MCF-7, MDA-MB-231 ve THP-1 için uygun besiyerleri içinde seyreltilerek 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625 µM konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok -20ºC'de muhafaza edilmiştir.

4.2.2.2. *Essitalopram Oksalat*

Toz halindeki tamoksifenden 4.14 mg tartılarak 100 µL DMSO ile çözdürülmüş ve sonuç olarak 100 mM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok MCF-7, MDA-MB-231 ve THP-1 için uygun besiyerleri içinde seyreltilerek 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625 µM konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok -20ºC'de muhafaza edilmiştir.

4.2.3. Kullanılan LPS'nin hazırlanışı

4.2.3.1. *LPS E.coli 0111:B4*

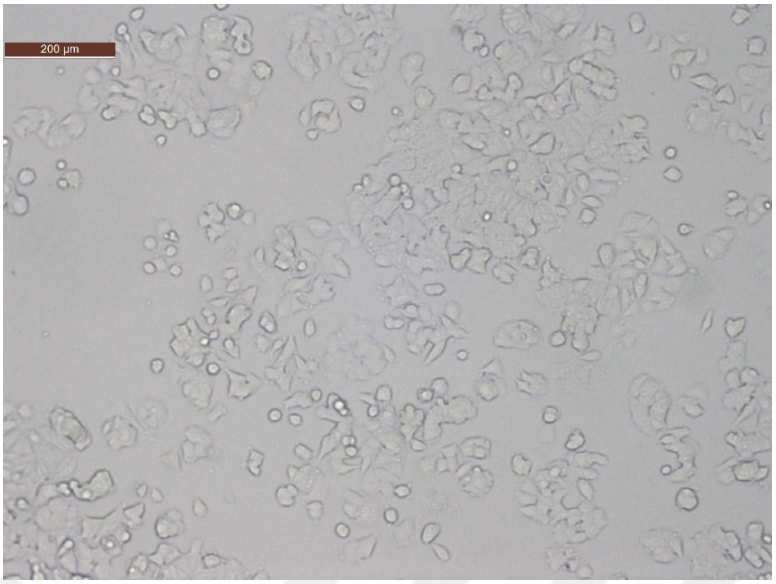
1 mg'lık LPS şişesi içine 1000 µL steril distile su eklenmiş ve 1000 µg/mL'lik ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok 100 µL'lik PCR tüplerine alikotlanmıştır.

4.3. Hücre kültürü çalışmaları

4.3.1. *Hücre hatlarının çoğaltılması*

4.3.1.1. *MCF-7 hücre hattının kültür ortamında çoğaltılması*

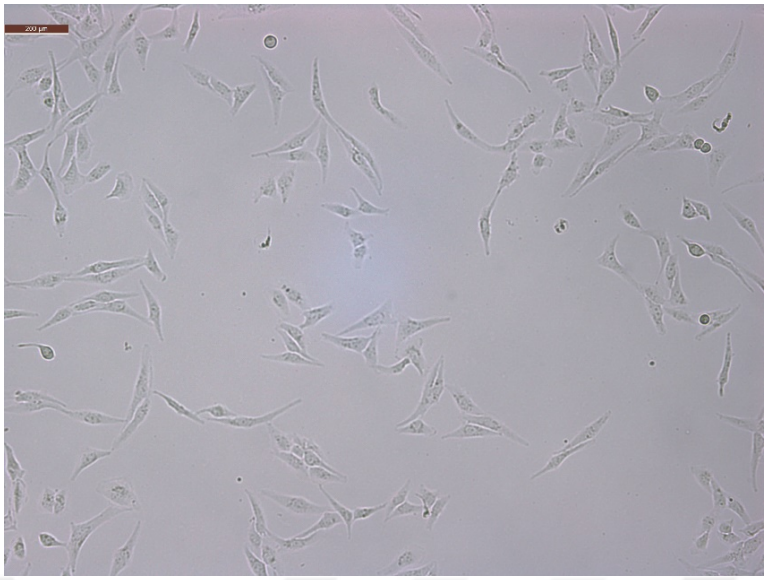
MCF-7 hücre hattını geliştirmek için %1 Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep), %0.1 Piromisin ve %10 fötal sığır serum (FBS) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri kullanılmıştır. MCF-7 hücre hattının geliştirilmesi sürecinde %5 CO_2'li etüvde sıcaklık 37ºC ve bağıl nem %95 olarak kullanılmıştır. Hücreler başlangıçta 25 cm^2'lik flasklarda geliştirilmiştir. Yüzeye yapışan MCF-7 hücreleri yeterli yoğunluğa ulaştığında (Görsel 4.1.), hücre pasajı yapılmıştır. Bunun için de önce flasktaki besiyeri uzaklaştırılmış, sonra 5 mL fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında PBS uzaklaştırılarak flask içine 500 µL tripsin-EDTA eklenmiş ve 3 dakika CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra flaska mekanik güç uygulanarak hücreler yüzeyden kaldırılmış ve flaska 5 mL taze besiyeri eklenerek süspanse hücre grubu 50 mL'lik falkona aktarılmıştır. 5 dakika 1200 rpm'de santifüj edilen hücreler dibe çöktürülmüş ve bu sayede süpernatan uzaklaştırılmıştır. Kalan hücre pelletinin üzerine yeterli miktarda (15 mL) taze besiyeri eklenerek elde edilen süspanse hücre 75 cm^2'lik flaska aktarılmıştır. Bu süreçte gelişen hücrelerin bir kısmından FBS kullanılarak stok hazırlanmış ve deneylerde tekrar kullanılabilmesi için -80 ºC'de muhafaza edilmiştir.



Görsel 4.1. *MCF-7 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü (10X)*

4.3.1.2. *MDA-MB-231 hücre hattının kültür ortamında çoğaltılması*

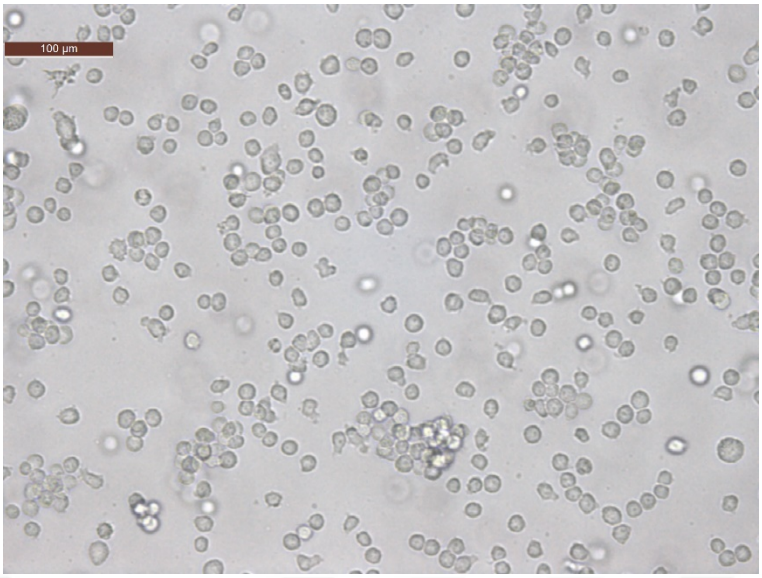
MDA-MB-231 hücre hattını geliştirmek için %1 Pen-Strep, %0.1 Piromisin ve %10 FBS içeren DMEM besiyeri kullanılmıştır. MDA-MB-231 hücre hattının geliştirilmesi sürecinde %5 CO_2'li etüvde sıcaklık 37ºC ve bağıl nem %95 olarak kullanılmıştır. Hücreler başlangıçta 25 cm^2'lik flasklarda geliştirilmiştir. Yüzeye yapışan MDA-MB-231 hücreleri yeterli yoğunluğa ulaştığında (Görsel 4.2.), hücre pasajı yapılmıştır. Bunun için de önce flasktaki besiyeri uzaklaştırılmış, sonra 5 mL fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında PBS uzaklaştırılarak flask içine 500 µL tripsin-EDTA eklenmiş ve 3 dakika CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra flaska mekanik güç uygulanarak hücreler yüzeyden kaldırılmış ve flaska 5 mL taze besiyeri eklenerek süspanse hücre grubu 50 mL'lik falkona aktarılmıştır. 5 dakika 1200 rpm'de santifüj edilen hücreler dibe çöktürülmüş ve bu sayede süpernatan uzaklaştırılmıştır. Kalan hücre pelletinin üzerine yeterli miktarda (15 mL) taze besiyeri eklenerek elde edilen süspanse hücre 75 cm^2'lik flaska aktarılmıştır. Bu süreçte gelişen hücrelerin bir kısmından FBS kullanılarak stok hazırlanmış ve deneylerde tekrar kullanılabilmesi için -80 ºC'de muhafaza edilmiştir.



Görsel 4.2. *MDA-MB-231 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü (10X)*

4.3.1.3. *THP-1 hücre hattının kültür ortamında çoğaltılması*

THP-1 hücre hattını geliştirmek için %1 Pen-Strep, %0.1 Piromisin, %10 FBS ve %0.0004 β-merkaptoetanol içeren Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) besiyeri kullanılmıştır. THP-1 hücre hattının geliştirilmesi sürecinde %5 CO_2'li etüvde sıcaklık 37ºC ve bağıl nem %95 olarak kullanılmıştır. Hücreler başlangıçta 25 cm^2'lik flasklarda geliştirilmiştir. Gelişerek kolonileşen THP-1 hücreleri (Görsel 4.3.) yoğunluklarına bağlı olarak pasajlanmıştır. Bunun için 25 cm^2'lik flasklarda bulunan hücre süspansiyonu pipet yardımı ile çekilmiş ve 50 mL'lik falkona aktarılmıştır. Falkona aktarılan THP-1 hücreleri 5 dk 1100 rpm'de santrifüj edildikten sonra dibe çöktürülmüş ve bu sayede süpernatan uzaklaştırılmıştır. Hücre pelletinin üzerine yeterli miktarda (15 mL) taze besiyeri eklenerek elde edilen hücre süspansiyonu 75 cm^2'lik flaska aktarılmıştır. Bu süreçte geliştirilen THP-1 hücrelerinin bir kısmından FBS kullanılarak stok elde edilmiş ve deneylerde tekrar kullanılabilmesi için -80ºC de muhafaza edilmiştir.



Görsel 4.3. *THP-1 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü (20X)*

4.3.2. Hücrelerin sayılması

4.3.2.1. *MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin sayımı*

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreler yüzeye yapışan hücreler olduğu için hücre sayım yöntemi ikisinde de aynıdır. Yüzeye yapışan hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında 75 cm^2'lik flasktaki besiyeri uzaklaştırılarak 5 mL PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında PBS uzaklaştırılarak flask içine 1000 µL tripsin-EDTA eklenmiş ve 3 dakika CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra flaska mekanik güç uygulanarak hücreler yüzeyden kaldırılmış ve flaska 5 mL taze besiyeri eklenerek süspanse hücre grubu 50 mL'lik falkona aktarılmıştır. 5 dakika 120 rpm'de santifüj edilen hücreler dibe çökmüş ve bu sayede süpernatan uzaklaştırılmıştır. Falkon içinde kalan hücre pelletine 1 mL uygun taze besiyeri (DMEM) eklenerek pipetaj yapılmıştır. Pipetaj sonrası homojen olarak dağılan MCF-7ve MDA-MB-231 hücreleri Tripan Mavi boyası kullanılarak Cedex (Roche – Almanya) cihazında sayılmıştır.

4.3.2.2. *THP-1 hücrelerinin sayımı*

Geliştirilen ve 75 cm2'lik flasklarda bulunan THP-1 hücreleri serolojik pipet yardımı ile toplanarak 50 mL'lik falkonlara aktarılmış ve 1100 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatan uzaklaştırılmış ve dibe çöken THP-1 hücrelerine 1 mL taze besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Pipetaj sonrasında homojen bir dağılım

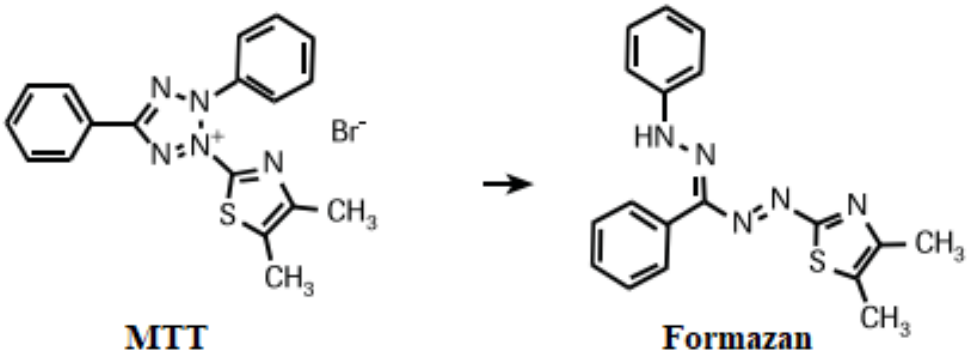
gösteren THP-1 hücreleri Tripan Mavisi kullanılarak Cedex (Roche – Almanya) cihazında sayılmıştır.

4.3.3. MTT ve MTS yöntemleri ile sitotoksisiste belirlenmesi

4.3.3.1. *MTT yöntemi ile sitotoksisitenin belirlenmesi*

Tetrazolyum tuzları elektron alarak indirgenebilmektedirler ve bu sayede formazan adı verilen yapıya dönüşerek renk değiştirebilmektedirler. Bu renk değişiminin gerçekleşmesi için ortamda aktif halde mitokondri bulunması gerekir, bu sayede tetrazolyum halkası kırılarak renk değişimi gerçekleşir. Ortamda aktif mitokondrinin bulunması ise canlı hücre varlığıyla gerçekleşmektedir (Mossman, 1983). Ölü durumda olan hücrelerde aktif mitokondrinin bulunmaması, tetrazolyum tuzlarının indirgenmesine yardımcı olamadığı için renk değişimi de gözlenmez (Tokur ve Aksoy, 2017). Tetrazolyum tuzlarının renk değişimi sayesinde geliştirilen sitotoksisite testlerinden biri de MTT yöntemidir.

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol–2-yl)-2,5- diphentyltetrazoliumbromide] sarı renkli olup, yapısı gereği pozitif yüklü bir bileşiktir. Bu sayede hücre membranından geçerek hücre içerisinde indirgenebilir. Bu indirgenme reaksiyonu sonucunda oluşan formazan tuzu (Şekil 4.1) mor renklidir, ancak suda çözünemediği için kristal yapıda çöker. Bu formazan tuzunun çözünebilmesi için Denizot ve Lang (1986) tarafından DMSO'nun kullanılabileceği ortaya konmuştur (Tokur ve Aksoy, 2017).



Şekil 4.1. *MTT boyasının kimyasal yapısı (http-13)*

4.3.3.1.1. *MTT yönteminin uygulanması*

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri %1 Pen-Strep, %0.1 Piromisin ve %10 FBS içeren DMEM besiyeri içinde %5 CO_2'li etüvde, 37ºC, %95 bağıl nemde geliştirilmiştir. Uygun yoğunluğa ulaşan hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra, 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyuya $5x10^3$ hücre gelecek şekilde uygun besiyeri kullanılarak ekilmiştir. MCF- 7 ve MDA-MB-231 hücreleri yapışan hücreler olduğu için ekim sonrası 96'lı plakalar 24 saat %5 CO_2'li etüvde, 37ºC ve %95 bağıl nemde inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda mikroskop ile kontrol edilen hücreler plakaların tabanına yapışmış ve uygulanacak olan maddenin konsantrasyonları hazır hale getirilmiştir. Bunun için öncelikle plakalarda bulunan besiyeri uzaklaştırılmış, gerekli seyreltmeler yapılarak hazırlanmış olan madde konsantrasyonları (125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625 µM) her bir kuyuya 100 µL olacak şekilde dağıtılmıştır. 11. kuyuya hücre gelişiminin kontrolünü sağlamak için taze besiyeri maddesiz uygulanırken, 12. kuyuya madde (essitalopram oksalat ve tamoksifen) çözücüsü olarak kullanılan DMSO %0.1 oranında besiyerine eklenmiştir. Maddenin kontrollerini sağlamak için hazırlanan konsantrasyonlar hücre içermeyen kuyulara 100 µL aktarılmış, böylece maddelerin körleri hazırlanmıştır. Madde verilen hücre hatları 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda kör olarak hazırlanan madde konsantrasyonlarının üzerinde 10 µL MTT eklenirken, hücrelerin bulunduğu plakalardan konsantrasyonlar uzaklaştırılmış ve 1:10 oranında besiyeri ile seyretilmiş MTT her kuyuya 100 µL olacak şekilde aktarılarak (0.5 mg/mL nihai konsantrasyonda) 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında plakadaki maddeler uzaklaştırılmış ve her kuyuya formazan tuzunu çözmesi için 100 µL DMSO eklenmiştir. Plakalar 540 nm dalga boyunda, ELISA okuyucu cihaz yardımı ile okunmuştur. MTT yöntemi MCF-7 ve MDA-MB-231 için aynı şekilde yapılmış olup, essitalopram oksalat ve tamoksifen için ayrı ayrı ve 3 bağımsız tekrar ile gerçekleştirilmiştir.

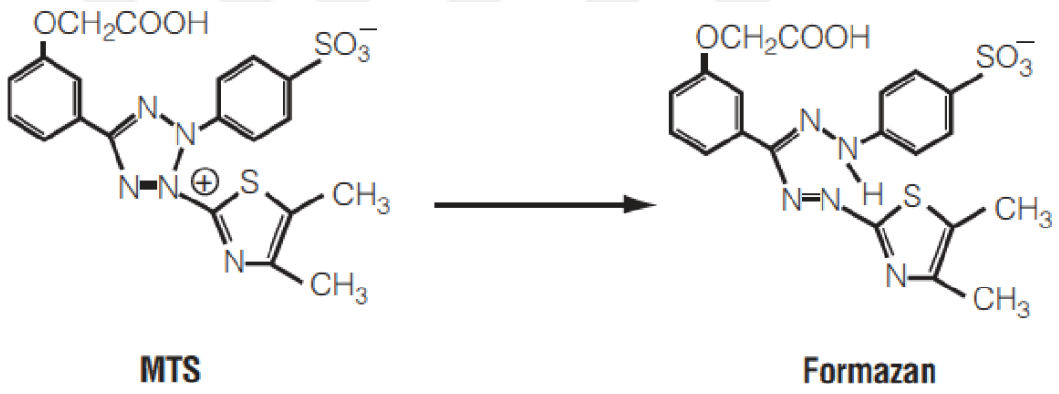
$$\%\ Canlılık = \frac{Örneğin\ absorbans\ değeri}{Kontrolün\ absorbans\ değeri}\ x\ 100 \qquad \textbf{(4.1)}$$

4.3.3.2. *MTS yöntemi ile sitotoksisitenin belirlenmesi*

Tetrazolyum tuzlarının formazana dönüşmesini sağlayan indükleme reaksiyonlarında ortamda aktif mitokondri bulunması gerekmektedir (Mossman, 1983). Bunun içinde canlı hücre varlığına ihtiyaç vardır. MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-

(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] yöntemi de MTT yöntemi gibi tetrazolyum tuzlarının indüklenerek (Şekil 4.2) renk değiştirmesi mantığına dayanmaktadır.

MTS bileşiğinin yapısı MTT bileşiğinden farklı olarak negatif yükle yüklüdür. Bu nedenle hücre membranından geçememektedir (Tokur ve Aksoy, 2017). Bu noktada devreye ara elektron alıcı moleküller (fenazin metil sülfat, fenazin etil sülfat) girer. Elektron alıcı molekül hücre içine girerek elektron alır ve ortama (besiyerine) geri dönerek tetrazolyumu indirger. Burada oluşan formazan suda ve besiyerinde çözünebilir yapıdadır (Tokur ve Aksoy, 2017). Bu nedenle MTT yönteminde olduğu gibi ayrıca bir çözücüye ihtiyaç yoktur. Genelde bu tetrazolyum bileşiği 1-2 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanır, MTT kadar çözünmezler (Tokur ve Aksoy, 2017).



Şekil 4.2. *MTS boyasının kimyasal yapısı (http-14)*

4.3.3.2.1. *MTS yönteminin uygulanması*

THP-1 hücreleri %1 Pen-Strep, %0.1 Piromisin, %10 FBS ve %0.0004 β-merkaptoetanol içeren RPMI-1640 besiyeri içinde %5 CO_2'li etüvde, 37ºC, %95 bağıl nemde geliştirilmiştir. Uygun yoğunluğa ulaşan hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra, 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyuya $5x10^3$ hücre gelecek şekilde uygun besiyeri kullanılarak ekilmiştir. THP-1 hücreleri süspanse hücreler olduğu için ekim sonrası 96'lı plakalar 3-4 saat %5 CO_2'li etüvde, 37ºC ve %95 bağıl nemde inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda uygulanacak olan maddenin konsantrasyonları hazır hale getirilmiştir. Gerekli seyreltmeler yapılarak hazırlanmış olan madde konsantrasyonları (125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625 µM) her bir kuyuya 100 µL olacak şekilde

dağıtılmıştır. 11. kuyuya hücre gelişiminin kontrolünü sağlamak için taze besiyeri maddesiz uygulanırken, 12. kuyuya madde (essitalopram oksalat ve tamoksifen) çözücüsü olarak kullanılan DMSO %0.1 oranında besiyerine eklenmiştir. Maddenin kontrollerini sağlamak için hazırlanan konsantrasyonlar hücre içermeyen kuyulara 100 µL aktarılmış, böylece maddelerin körleri hazırlanmıştır. Madde verilen hücre hatları 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda kör olarak hazırlanan madde konsantrasyonlarının üzerinde 20 µL MTS eklenirken, hücrelerin bulunduğu plakalara 40 µL olacak şekilde aktarılarak (0.33 mg/mL nihai konsantrasyonda) 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında plakalar 490 nm dalga boyunda, ELISA okuyucu cihaz yardımı ile okunmuştur. MTS yöntemi süspanse halde olan THP-1 hücreleri için kullanılmış olup, essitalopram oksalat ve tamoksifen için ayrı ayrı ve 3 bağımsız tekrar ile gerçekleştirilmiştir.

Hücre canlılık oranı aşağıdaki yönteme göre hesaplanır (Toplayıcı, 2015).

$$\%\ Canlılık = \frac{Örneğin\ absorbans\ değeri}{Kontrolün\ absorbans\ değeri}\ x\ 100 \qquad \textbf{(4.2)}$$

4.3.4. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

xCELLigence cihazı elektriksel impedans teknolojisi ile kuyucuklardaki hücrelerin elektrodlara bağlanıp bağlanmadığına dayanarak ölçüm yapan biyosensör sistemidir. Herhangi bir işaretleyiciye ihtiyaç olmaksızın hücrelerin proliferasyonunu, morfoloji değişimini saptayabilmesi ve gerçek zamanlı izleme sağlaması açısından yüksek doğrulukta görüntüleme sağlamaktadır (http-15).

Cihazın plakaları özel olarak üretilmiş olup, her plaka 16 kuyudan oluşmaktadır. E-plaka denilen bu plakaların alt kısımlarına entegre edilmiş özel mikroelektronik hücre sensör dizileri bulunmaktadır. Birimsiz olarak ifade edilen hücre indeksi (CI) ölçümü için kullanılmaktadır. Ayrıca cihazın kendi yazılımı sayesinde bütün veriler otomatik olarak analiz edilir (http-15).

4.3.4.1. *xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Essitalopram Oksalat ve Tamoksifen için IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi*

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri %1 Pen-Strep, %0.1 Piromisin ve %10 FBS içeren DMEM besiyeri içinde %5 CO_2'li etüvde, 37ºC, %95 bağıl nemde geliştirilmiştir. Geliştirilen hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde ölçüm için kullanılacak olan E-plakaların içine 100 µL temiz besiyeri eklenmiş ve cihazda ölçüm alınarak cihaz durdurulmuştur. Daha sonra her bir hücreden $1x10^5$ hücre sayılmıştır. E-plakaların tabanına pipet ucu değdirmemeye dikkat ederek her bir kuyuya 100 µL süspanse hücre ekilmiştir. Bu sırada 1 kuyu boş besiyeri olarak ayrılmış, o kuyuya temiz besiyeri ilave edilmiştir. 15 dk hücrelerin E-plakanın tabanına çökmesi beklenmiş daha sonra E-plakalar yerleştirilerek cihaz tekrar çalıştırılmıştır. 24 saat boyunca inkübasyona bırakılan hücreler gelişmeye devam etmiş ve hücre sayısının pik yaptığı noktada cihaz durdurulmuştur. Daha sonra MTT yöntemi ile yapılan geniş konsantrasyon taramasından elde edilen uygun konsantrasyonlar (MCF-7 ve MDA-MB-231; tamoksifen için 125-3,90625 µM, essitalopram oksalat için 30-7.5 µM) hazırlanarak 100 µL besiyeri içinde bulunan hücrelerin üzerine eklenmiştir. Cihaz yeniden çalıştırılmış ve 48 saat sonra cihaz durdurularak sonuçlar analiz edilmiştir.

4.3.5. AnnexinV-PI yöntemi ile apoptotik etkinin akış sitometride belirlenmesi

Gelişmiş organizmalarda fonksiyonu bozulan ya da gereksinim duyulmayan hücrelerin programlı ölümleri apoptoz olarak adlandırılmaktadır. Apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmaktadırlar ve bu sayede fagosite edilebilmektedirler. Bir diğer hücre ölümü olan nekroz ise hipoksi, hipertermi, ultra viyole ışıklar gibi dış uyaranlar sonucu oluşan, hücrelerin parçalanarak hücre plazma membran lipitlerinin ortama dökülmesidir. Bunun sonucunda inflamatuar yanıt oluşumu söz konusudur (Öktem vd., 2001).

Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde başlatılabilir ya da uyaranlar sonucu sekonder olarak gelişebilmektedir. Hücre dışı uyaranlar olarak TNF, koloni uyarıcı faktörler, nöron büyüme faktörleri, IL-2 gibi bazı maddelerin azalması gibi etkenler sebep olabilmektedir (Öktem vd., 2001).

Normal hücrelerin sitoplazmik hücre membranı yüzeyinde fosfotidilserin (PS) adı verilen bir lipid bulunmaktadır. Hücrelerde apoptoz gerçekleştiği durumda ise normal

şartlarda membranın sitoplazma tarafında bulunan PS yer değiştirerek membranın dış yüzeyine geçer. Annexin-V PS'e bağlanabilen bir proteindir ve apoptotik hale gelen bu durumdaki hücreler floresan bir madde ile işaretlenen Annexin-V ile boyanır. Ancak nekrotik olan hücrelerin yüzeyine de bağlanabilen Annexin-V nedeniyle ikinci bir boya olarak propidyum iyodür (PI) eklenmektedir (Overbeeke vd., 1998). Annexin-V yeşil floresans (fluorescein isothiocyanate (FITC)) gösterirken, PI kırmızı floresans (phycoerythrin (PE)) gösterir. Bu sayede iki farklı boya ile boyanan hücreler; canlı hücreler (FITC-,PE-), erken apoptotik hücreler (FITC+, PE-), geç apoptotik hücreler (FITC+, PE+) ve nektorik hücreler (FITC-, PE+) şeklinde birbirinden ayırt edilebilir (Dikmen vd., 2011).

4.3.5.1. *Akış sitometride AnnexinV-PI yönteminin uygulanması*

4.3.5.1.1. *AnnexinV-PI yöntemi kullanılarak akış sitometride MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında Tamoksifen ve Essitalopram Oksalat'ın apoptotik etkilerinin belirlenmesi*

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri %1 Pen-Strep, %0.1 Piromisin ve %10 FBS içeren DMEM besiyeri içinde %5 CO_2'li etüvde, 37ºC, %95 bağıl nemde geliştirilmiştir. Gelişen hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra sayılarak 6 kuyucuklu plakalara her kuyuda $1x10^5$ hücre olacak şekilde ekilmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 yüzeye yapışan hücre hatları olduğu için 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda hücreler mikroskop altında kontrol edilmiş ve yapışmış olan hücrelerin besiyerleri çekilerek apoptoz ölçümü yapılacak olan maddelerin IC_{50} değerleri (MCF-7 için: Tamoksifen IC_{50} 54.6 µM, Essitalopram Oksalat IC_{50} 13.7 µM; MDA-MB-231 için: Tamoksifen IC_{50} 58.4 µM, Essitalopram Oksalat IC_{50} 10.9 µM) besiyeri içinde hazırlanarak kuyulara verilmiştir. Bu sırada 1 kuyu kontrol grubu olarak ayrılmış ve bu nedenle besiyeri taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Hücreler maddeler ile 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda uygun etiketlemelerin yapıldığı falkonlara besiyerleri toplanıp eklenmiştir. 1 mL soğuk PBS ile iyice yıkanan kuyulara 250 µL tripsin-EDTA eklenmiş ve 3 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücreler mikroskopta kontrol edilmiş ve tekrar 1 mL soğuk PBS ile yıkanarak kaldırılan hücreler falkonlara aktarılmıştır. 5 dk 1250 rpm'de santrifüj edilen hücrelerin süpernatanı uzaklaştırıldıktan

sonra 2 kez daha 1 mL soğuk PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında PBS ortamdan uzaklaştırılmış ve distile steril su ile hazırlanarak buzda bekletilen 10X Annexin-V bağlama tamponu her falkona 200 µL eklenmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonunun üstüne 5 µL Annexin-V, 10 µL propidyum iyodür eklenmiştir. Hücre süspansiyonları yavaşça vortekslendikten sonra 20 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında boyanan hücreler 1X bağlama tamponu yardımı ile yıkanmış ve santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır. Son olarak hücre pelletinin üzerine 400 µL 1X bağlama tamponu eklenerek ependorfa alınmış ve akış sitometride analiz yapılmıştır.

4.3.6. *E.coli* LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücrelerinde IL-1β seviyesinin akış sitometride ölçülmesi

THP-1 hücreleri %1 Pen-Strep, %0.1 Piromisin, %10 FBS ve %0.0004 β-merkaptoetanol içeren RPMI-1640 besiyeri içinde %5 CO_2'li etüvde, 37ºC, %95 bağıl nemde geliştirilmiştir. Uygun yoğunluğa ulaşan hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra, 6 kuyucuklu plakalara her bir kuyuda $2x10^5$ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Süspanse halde olan THP-1 hücrelerinin her kuyusuna 100 ng/mL oranında *E.coli* LPS'si ilave edilirken 1 kuyu kontrol grubu olarak ayrılmış ve 4 saat inkübasyona bırakılmıştır.

THP-1 hücreleri inkübasyon sonunda toplanarak falkonlara aktarılmıştır. Her bir kuyu 1 mL soğuk PBS ile yıkanmış ve falkona aktarılmıştır. 5 dk 1100 rpm'de santrifüj edilen THP-1 hücreleri dibe çökmüş ve süpernatan uzaklaştırılmıştır. 2 kez daha 1 mL soğuk PBS ile yıkanan THP-1 hücrelerine 300 µL cytofix/cytoperm ilave edilmiş ve 20 dk buzda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda santrifüj edilen hücreler 2 kere 500 µL perm wash ile yıkanmış ve son yıkamadan sonra hücre pelleti 50 µL perm wash ile süspanse edilerek üzerine 10 µL IL-1β ilave edilmiştir. 15 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılan hücreler inkübasyon sonunda 500 µL perm wash ile yıkanmış ve son olarak 350 µL perm wash ilave edilerek ependorfa aktarılmıştır. Daha sonra elde edilen süspanse hücre akış sitometride analiz edilmiştir.

4.3.7. Meme kanseri ko-kültür modelinin oluşturulması

Gram negatif (Gr-) bakterilerin dış zar bileşeni olan LPS güçlü bir monosit ve makrofaj aktivitörü olup monositlerin sitokin üretimini sağlar (Tsai vd., 2014). İn vivo

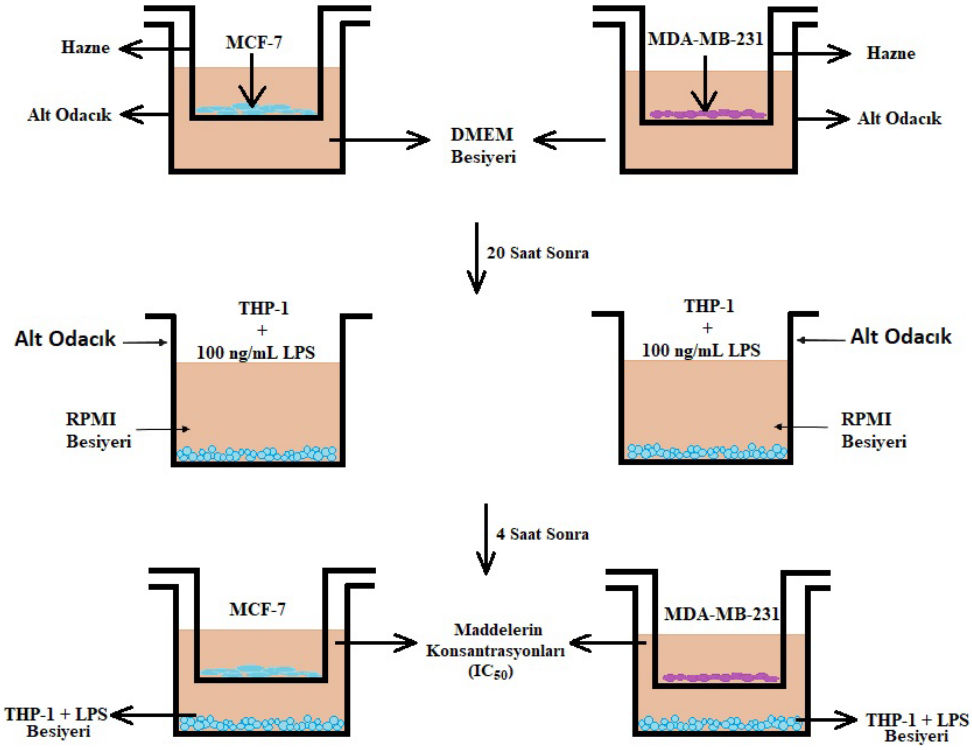
çalışmalarda geniş, spesifik olmayan olaylar zincirini ortaya çıkaran LPS, aktive edilmiş makrofaj ve monositler tarafından üretilen çeşitli güçlü aracıların ve sitokinlerin salgılanmasına neden olur (Kielian ve Blecha, 1995). LPS, tümör nekroz faktörü (TNF)-alfa, interlökin (IL)-1 ve IL-6 gibi sitokin oluşumlarını indüklemek için membran reseptörü CD14 ile etkileşime girerek bağışıklık tepkilerini uyarır (Meng ve Lowell, 1997). Makrofaj gibi bağışıklık hücrelerinin kanser hücreleri ile nasıl etkileşime girdiğinin anlaşılması, kanser tedavilerinde yeni yolların keşfedilmesi adına büyük önem taşımaktadır (Smith vd., 2015).

Ko-kültür modeli sayesinde, hücre popülasyonlarındaki her türlü hücre-hücre etkileşimi incelenebilmektedir. Burada amaç ortak bir kültür ortamında iki ya da daha fazla farklı hücrenin bir dereceye kadar temasla büyütülmesi ve popülasyonlar arasındaki doğal etkileşimlerin incelenmesidir (Goers vd., 2014).

THP-1 hücreleri insan monosit hücre hatları olup, uyarılarak ko-kültür modelinde doğrudan kullanılabilmektedir. Bu amaçla oluşturulan ko-kültür modelinde, THP-1 hücreleri ile MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri kullanılmıştır.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları %1 Pen-Strep, %0.1 Piromisin ve %10 FBS içeren DMEM besiyeri içinde ve THP-1 hücreleri %1 Pen-Strep, %0.1 Piromisin, %10 FBS ve %0.0004 β-merkaptoetanol içeren RPMI-1640 besiyeri içinde %5 CO_2'li etüvde, 37ºC, %95 bağıl nemde geliştirilmiştir. Yeterince gelişen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 24 kuyulu plakaya $2x10^5$ hücre olacak şekilde ekilmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları ko-kültür modelini oluşturabilmek için hazne içine ekilmiştir.

Yaklaşık 20 saat sonra gelişen THP-1 hücreleri, 24 kuyulu plakanın alt odacığına her kuyuda $2x0^5$ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Ekilen THP-1 hücrelerine 100 ng/mL LPS eklenerek 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda LPS verilen THP-1 hücre gruplarının üzerine 24 saat önce ekilip yapışan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin olduğu hazneler konularak ko-kültür modeli oluşturulmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *Meme kanseri ko-kültür modelinin taslak şekli*

4.3.7.1. *Oluşturulan meme kanseri ko-kültür modelinde tamoksifen ve essitalopram oksalatın IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF- α seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile ölçülmesi*

Akış sitometri, hücrelerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin akan bir sıvı içinde incelenmesi olarak tanımlanmaktadır (Dilaver, 1995). Süspanse haldeki hücreler akım sitometrisi yardımıyla lazer ışığı ile aydınlatılan bir bölmeden geçer ve bu sırada sinyaller oluşturur. Oluşturdukları bu sinyaller hücrelerin fiziksel özelliklerine göre (büyüklük, granülarite) ya da hücreye bağlanan fluokroma göre de olabilir (Dunphy, 2004).

Akış sitometri ile akış kabinine gelen hücrelerin ileri saçılma grafiği (forward scatter) ile büyüklüğü, yana saçılma grafiği (side scatter) ile granülitesi ve floresans grafiği ile floresans miktarı hakkında yaklaşık olarak bilgiler edinebiliriz (Kanev ve Gökalp Muranlı, 2015).

Akış sitometri yöntemi sayesinde hücreler farklı şekillerde analiz edilebilmektedir. Analizler; hücrelerin büyüklük ve granül yapılarına göre, tek floresan boya ile monoklonal antikor kullanarak, çok renkli floresan boyalar ile işaretlenen antikorlar

kullanarak veya hücre içerisindeki antijen ve yapıların membran geçirgenliğini arttırarak floresan boyası eklenmesi sonucu işaretlenen monoklonal antikorlar ile yapılabilmektedir (Villas, 1998).

IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α ölçümlerinin yapılması sırasında kullanılan boyalar (FITC ve PE) floresan özelliğine sahip olup antikorlar bu boyalarla işaretlenmiştir.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları %1 Pen-Strep, %0.1 Piromisin ve %10 FBS içeren DMEM besiyeri içinde ve THP-1 hücreleri %1 Pen-Strep, %0.1 Piromisin, %10 FBS ve %0.0004 β-merkaptoetanol içeren RPMI-1640 besiyeri içinde %5 CO_2'li etüvde, 37ºC, %95 bağıl nemde geliştirilmiştir. Yeterince gelişen MCF-7, MDA-MB-231 ve THP-1 hücreleri sayılmış, kontrol gruplarını oluşturmak için ayrı olarak alt odacığa $2x10^5$ hücre olacak şekilde ekilmiş ve hiçbir madde uygulanmadan temiz besiyeri içinde geliştirilmiştir.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri 1'er kuyunun alt odacığına $2x10^5$ hücre ekilirken 3'er kuyunun haznesine $2x10^5$ hücre ekilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Alt odacığa ekilen hücreler kontrol amaçlı ekilmiş olup hiçbir madde verilmeden temiz besiyeri içinde geliştirilmiştir.

Yaklaşık 20 saat sonra 24 kuyulu plakanın 8 kuyusunun alt odacığına her birinde $2x10^5$ hücre olacak şekilde ekilen THP-1 hücrelerinin 1 kuyusu kontrol için LPS eklenmeden bırakılırken diğer 7 kuyuya 100 ng/mL LPS eklenmiştir ve 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda LPS eklenen 1 THP-1 hücresi LPS kontrolü için ayrılırken diğer 3 THP-1 hücresinin üstüne MCF-7, diğer 3 THP-1 hücresinin üzerine ise MDA-MB-231 ekili olan hazneler yerleştirilmiştir.

MCF-7 ile oluşturulan ko-kültür modelinde bir kuyuya tamoksifenin MCF-7 için IC_{50} değeri verilirken diğerine essitalopram oksalatın MCF-7 için IC_{50} değeri verilmiştir. Diğer kuyu temiz besiyeri içinde bırakılarak MCF-7 ko-kültürü için kontrol grubu olarak ayrılmıştır. MDA-MB-231 ile oluşturulan ko-kültür modelinde ise bir kuyuya tamoksifenin MDA-MB-231 için IC_{50} değeri verilirken diğerine essitalopram oksalatın MDA-MB-231 için IC_{50} değeri verilmiştir. Diğer kuyu temiz besiyeri içinde bırakılarak MDA-MB-231 ko-kültürü için kontrol grubu olarak ayrılmıştır. Maddeler verildikten sonra sitokin ölçümleri için hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda hazneler çıkarılmış, her kuyudan hücreler toplanarak 15 mL'lik falkonlara aktarılmıştır. Her kuyu bir kez 1 mL soğuk PBS ile yıkanmış ve tekrar falkonlara aktarılmıştır. Bu sırada kontrol grubu olarak ayrılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının bulunduğu kuyulara 100 µL tripsin-EDTA eklenerek plaka 3 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 1 mL PBS ile yıkanan kuyulardan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri toplanarak uygun etiketli falkona eklenmiş ve bütün falkonlar 5 dk 1100 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatan uzaklaştırılmış ve 2 kez daha 1 mL PBS ile yıkanarak süpernatan uzaklaştırılmıştır.

Elde edilen pelletin üzerine 500 µL PBS eklenerek pipetaj yapılmış ve IL-8 hücre yüzeyine bağlandığı için her bir falkondan 100 µL ayrılarak kalan her bir falkona 400 µL cytofix eklenmiştir. Bu sırada ependorflara uygun etiketlemeler yapılarak IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α boyaları 10 µL eklenmiştir. Boya eklenen ependorflardan IL-1β, IL-6, IL-10 ve TNF-α'ya cytofix eklenen hücre süspansiyonundan 100'er µL dağıtılırken, IL-8 eklenen ependorfa cytofix eklenmemiş olan hücre süspansiyonundan 100 µL eklenerek 15 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda her bir ependorfa 1 mL PBS eklenmiş ve 300-350 x g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatan dikkatlice uzaklaştırılmış ve her ependorfa 200 µL PBS eklenerek akış sitometride analiz edilmiştir.

4.3.8. Sitotoksisite yöntemlerinin istatistiksel analizi

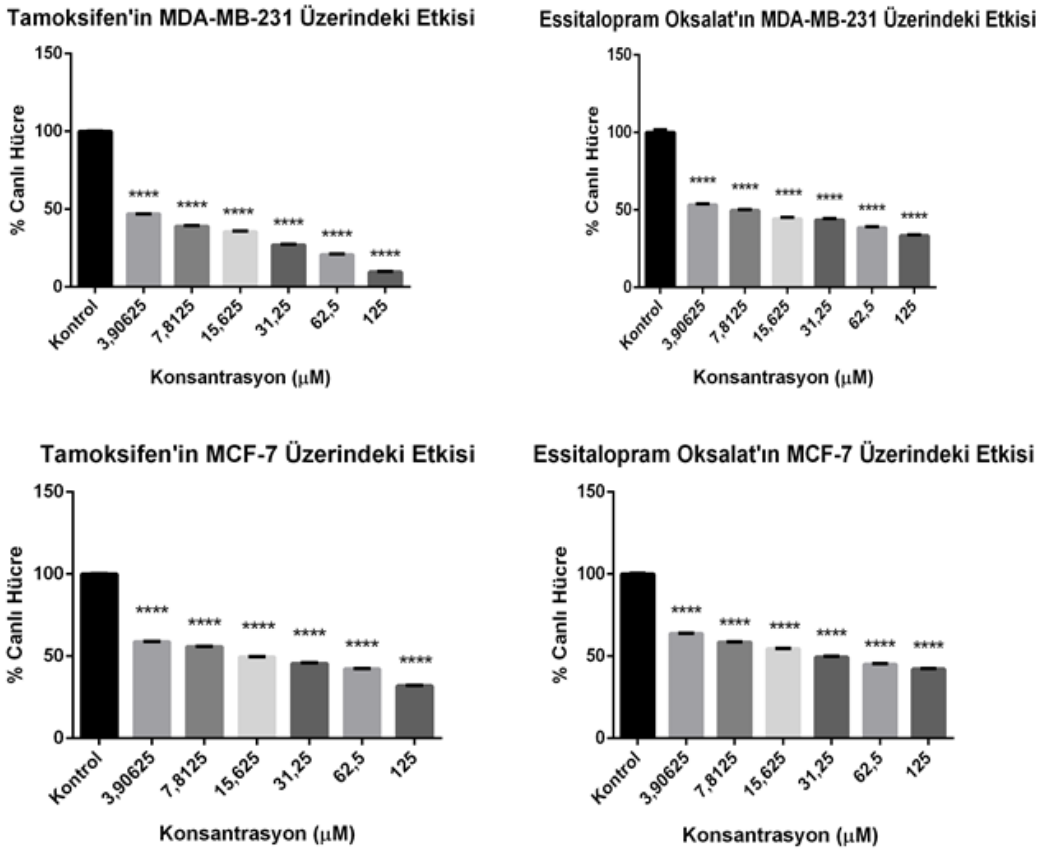
İstatistiksel değerlendirmeler ve grafiklerin çizimi GraphPad Prizm 6.0 analiz programı kullanılarak yapılmıştır. Analizler sırasında hücre gruplarının % canlılık grafikleri kontrol grubu maksimum değerlendirilerek çizilmiş olup, elde edilen veriler tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak analiz edilmiştir.

İstatistiksel anlamlılık değerleri $p>0.5$ fark yok, $p<0.05$ (*) fark var, $p<0.01$ (**) anlamlı fark var, $p<0.001$ (***) önemli fark var, $p<0.0001$ (****) çok önemli fark var olarak değerlendirilmiştir.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. Essitalopram Oksalat ve Tamoksifen'in MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hatları İçin Sitotoksisitesinin MTT Yöntemi İle Değerlendirilmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin tamoksifen ve essitalopram oksalat için yapılan MTT sonuçları ELISA okuyucu cihaz yardımı ile 540 nm dalga boyunda okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri hücre canlılıkları olarak kabul edilmiş olup, veriler Microsoft Office Excel programında % hesap şeklinde oluşturulmuştur. Birbirinden bağımsız 3 tekrarlı yapılan deneylerin sonuçlarında, kontrol grubu 100 olarak kabul edilmiş olup diğer bütün konsantrasyonların % değerleri bu değere göre hesaplanmıştır. Elde edilen veriler GraphPad Prism 6.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiş ve grafikleri oluşturulmuştur. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının tamoksifen ve essitalopram oksalat gruplarına ait % canlı hücre-konsantrasyon grafikleri şekil 5.1'de verilmiştir.



Şekil 5.1. *Essitalopram oksalat ve tamoksifen (pozitif kontrol) konsantrasyonlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (****p<0.0001, n=8)*

MTT yönteminde tamoksifen ve essitalopram oksalat gruplarında 125 µM-3.90625 µM aralığında anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Bu verilere göre elde edilen hücre canlılıkları MCF-7 (Tablo 5.1) ve MDA-MB-231 (Tablo 5.2) hücre hattında essitalopram oksalat ve tamoksifen için artan konsantrasyonlarda azalmıştır. İstatistiksel anlamlılık değerleri kontrol grubuna göre hesaplanmıştır.

Tablo 5.1. *MCF-7 hücrelerinin % canlılıkları (Kontrolün canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir.)*

Konsantrasyonlar	**Madde Konsantrasyonlarının % Hücre Canlılıkları**	
(µM)	**Tamoksifen (%)**	**Essitalopram Oksalat (%)**
125	31.98	42.22
62.5	42.19	45.08
31.25	45.52	49.50
15.62	49.42	54.40
7.81	55.77	58.54
3.90625	58.82	63.65

Tablo 5.2. *MDA-MB-231 hücrelerinin % canlılıkları (Kontrolün canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir.)*

Konsantrasyonlar	**Madde Konsantrasyonlarının % Hücre Canlılıkları**	
µM	**Tamoksifen (%)**	**Essitalopram Oksalat (%)**
125	9.73	33.38
62.5	20.78	38.62
31.25	27.07	43.61
15.62	35.48	44.24
7.81	39.00	49.66
3.90625	46.93	53.24

Östrojen ve anti-östrojenlerin hormona tepkili meme kanserleri (MCF-7, MDA-MB-231) üzerindeki etkisini araştıran Lippman ve diğerleri anti-östrojenlerin güçlü inhibe ediciler olduğunu ve $3x10^{-7}$ M'dan yüksek konsantrasyonlarda hücreleri öldürücü etkisi olduğunu ileri sürmüşlerdir (Lippman vd., 1976).

Tamoksifenin meme kanseri üzerindeki sitotoksik etkilerini araştıran Hassan ve diğerleri ise yapmış oldukları MTT testleri sonucu tamoksifenin MCF-7 için IC_{50} değerini 4.506 µg/mL olarak bulmuşlardır (Hassan vd., 2018).

MikroRNA'ların (miRNAs) değişen ekspresyonu ve fonksiyonlarının tamoksifen direnci ile ilişkisini araştıran Li ve diğerlerinin yapmış olduğu çalışmalarda MCF-7 hücrelerinde tamoksifenin IC_{50} değeri 7.29 µM olarak tespit edilmiştir (Li vd., 2018).

Acanthaster planci denizyıldızı ekstresinin sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştıran Mutee ve diğerleri pozitif kontrol olarak kullandıkları tamoksifenin MCF-7 hücresi için IC_{50} değerini 11.84 µg/mL olarak bulmuştur (Mutee vd., 2012).

Estradiol ve 13 endojen estradiol metabolitinin anti-proliferatif etkisini araştıran Seeger ve diğerleri ise; meme kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini tamoksifen ile karşılaştırmıştır. Yaptıkları bu çalışmada tamoksifenin IC_{50}'si MCF-7 için 27 µM ve MDA-MB-231 için ise 18 µM olarak tespit edilmiştir (Seeger vd., 2003).

Tamoksifenin 9 farklı tümör hücresinin gelişimi üzerindeki etkilerini inceleyen Petinari ve diğerleri bunun için MCF-7, UACC62, NCI-460, K-562, OVCAR-03, PC-03, HT-29, 786-0 ve NCI-ADR hücre hatlarını kullanmışlardır. Yapılan çalışmada hücresel protein içeriğinin ölçümüne dayalı olarak hücre yoğunluğunun belirlenmesinde kullanılan SRB deneyi uygulanmış ve 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücrelere 5, 10, 25 ve 50 µM konsantrasyonlarında tamoksifen verilmiştir. 48 saat sonunda plakalar 540 nm dalga boyunda okunmuş ve Microsoft Excel programı kullanılarak IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Alınan sonuçlara göre tamoksifenin MCF-7 hücreleri için IC_{50} değeri 12.59 µM olarak bulunmuştur (Petinari vd., 2004).

Timokinon ve tamoksifenin kombine uygulamalarının meme kanseri gelişimi ve apoptozu üzerine etkilerini araştıran Rajput ve diğerleri Timokin ve tamoksifenin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki sitotoksisitesini belirlemek için MTT testi uygulamışlardır. Yapmış oldukları MTT testlerinde tamoksifen için 0.01-40 µM konsantrasyon aralığını denemişler ve 48 saat sonra aldıkları sonuçlara göre IC_{50} değeri MCF-7 için 9.06±0.29 µM ve MDA-MB-231 için ise IC_{50} değeri 13.05±0.91 µM olarak hesaplamışlardır (Rajput vd., 2013).

Sitralin ilacına dirençli meme kanseri hücrelerini spesifik olarak hedefleme potansiyeli üzerine çalışmalarını yapan Nigjeh ve diğerleri MDA-MB-231 hücreleri üzerinde MTT testleri ile sitralin ve pozitif kontrol olarak kullandıkları doksorubisin, cisplatin ve tamoksifenin sitotoksik etkilerini belirlemiştir. Yapılan çalışmalarda tamoksifenin MDA-MB-231 hücre hattı için IC_{50} değeri 8.35±1.41 µg/mL olarak belirlenmiştir (Nigjeh vd., 2018).

MDA-MB-231 hücre hattı ile kombine dosetaksel-sertalin tedavisinin anti-proliferatif etkilerini inceleyen Arunasree, MDA-MB-231 için essitalopram'ın IC_{50} değerini 392.24 µM olarak bulmuştur (Arunasree, 2010).

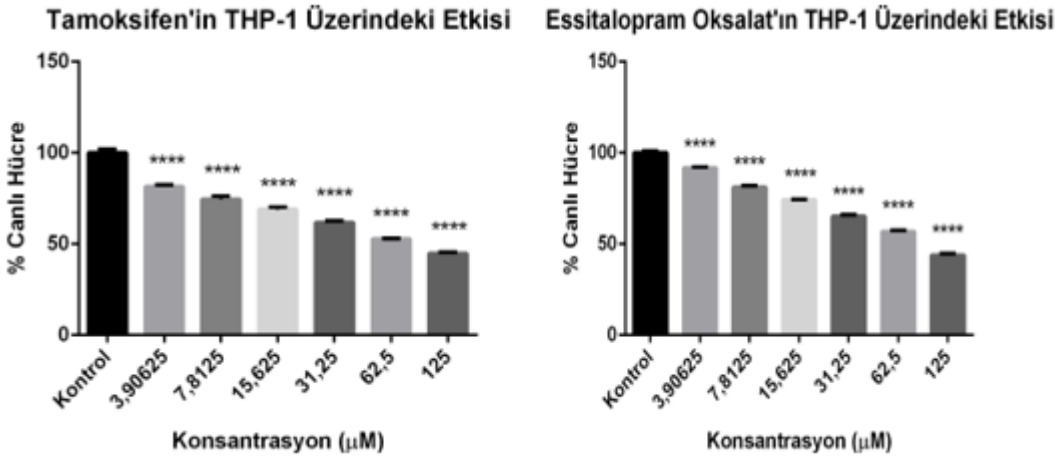
MCF-7 hücre hattı ve essitalopram oksalat ile benzer bir çalışma bulunmamaktadır. SSRI olan essitalopram oksalatın glioma C6 hücrelerinde ki sitotoksik etkilerini araştıran Dikmen ve diğerleri essitalopram oksalatın C6 hücreleri için IC_{50} değerini 106.97 µM olarak bulmuştur (Dikmen vd., 2011).

SSRI ve SNRI mekanizmasına sahip antidepresanların insan hepatoselüler karsinoma hücrelerindeki (HepG2) etkilerini araştıran Kauwahara ve diğerleri, essitalopramın HepG2 hücreleri için IC_{50} değeri 94.8 µM olarak bulmuştur. HepG2 hücrelerinde oluşan belirgin hasar, bu ilacın anti-tümör etkilerinin olabileceği düşündürmektedir (Kuwahara vd., 2015).

Glioblastoma multiforme (GBM) kötü prognoza sahip olan en agresif beyin kanseri olarak kabul edilmektedir ve tedavi sırasında beyin fonksiyonlarına zarar verilmemesi çok zordur. Bu nedenle farklı tedavi yöntemlerini araştıran Chen ve diğerleri, SSRI'ların belirli kanser türleri için sitotoksik etkiye sahip olmasından yola çıkarak essitalopram oksalatı glioblastoma hücresi olan U-87MG üzerinde denemiştir. Essitalopram oksalatın U-87MG hücreleri üzerindeki IC_{50} değeri 24 saat sonunda 0.247 mM ve 48 saat sonunda 0.169 mM olarak ölçülmüştür. Yapılan çalışmalar sonunda essitalopram oksalatın U-87MG hücrelerinin proliferasyonunu ve invazif kabiliyetlerini inhibe ettikleri sonucuna ulaşmışlardır (Chen, 2017).

5.2. Tamoksifen ve Essitalopram Oksalatın THP-1 Hücre Hattı İçin Sitotoksisitesinin MTS Yöntemi İle Değerlendirilmesi

THP-1 hücrelerinin tamoksifen ve essitalopram oksalat için yapılan MTS sonuçları ELISA okuyucu cihaz yardımı ile 420 nm dalga boyunda okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri hücre canlılıkları olarak kabul edilmiş olup, veriler Microsoft Office Excel programında % hesap şeklinde oluşturulmuştur. Birbirinden bağımsız 3 tekrarlı yapılan deneylerin sonuçlarında, kontrol grubu 100 olarak kabul edilmiş olup diğer bütün konsantrasyonların % değerleri bu değere göre hesaplanmıştır. Elde edilen veriler GraphPad Prism 6.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiş ve grafikleri oluşturulmuştur. THP-1 hücre hattının tamoksifen ve essitalopram oksalat gruplarına ait % canlı hücre değerleri şekil 5.2'de verilmiştir.



Şekil 5.2. *Essitalopram oksalat ve tamoksifen (pozitif kontrol) konsantrasyonlarının THP-1 hücre hattı üzerindeki %hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (****p<0.0001, n=8)*

MTS yönteminde tamoksifen ve essitalopram oksalat gruplarında 125 µM-3.90625 µM aralığında anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Bu verilere göre elde edilen hücre canlılıkları THP-1 hücre hattında essitalopram oksalat ve tamoksifen için artan konsantrasyonlarda azalmıştır (Tablo 5.3). İstatistiksel anlamlılık değerleri kontrol grubuna göre hesaplanmıştır.

Tablo 5.3. *THP-1 hücrelerinin % canlılıkları (Kontrolün canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir.)*

Konsantrasyonlar	**Madde Konsantrasyonlarının % Hücre Canlılıkları**	
µM	**Tamoksifen (%)**	**Essitalopram Oksalat (%)**
125	44.84	43.84
62.5	52.67	56.78
31.25	61.80	65.15
15.62	68.95	74.20
7.81	74.57	81.22
3.9	81.61	91.71

% Canlılık formülü ile elde edilen veriler ve Microsoft Office Excel kullanılarak yapılan hesaplamalar doğrultusunda tamoksifenin THP-1 hücre hattı için IC_{50} değeri 92.03 µM ve essitalopram oksalat için IC_{50} değeri 95.32 µM olarak hesaplanmıştır (Tablo 5.4).

Tablo 5.4. *Tamoksifen ve Essitalopram Oksalat'ın THP-1 hücre hattı için IC_{50} değerleri*

Hücre Hattı	Tamoksifen (µM)	Essitalopram Oksalat (µM)
THP-1	92.03	95.32

Literatür taramalarında tamoksifen ya da essitalopram oksalat ile muamele edilen THP-1 hücreleri hakkında benzer çalışma bulunmamaktadır.

Bunun yanında östrojen ve progestinin, minimal oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein ile indüklenen THP-1 hücreleri göçü üzerindeki etkisini araştıran Okada ve diğerleri bunun için THP-1 hücrelerinin östrojen reseptörlerini bloke etmek için 10^{-6} M tamoksifen ile 3 saat boyunca inkübe etmişlerdir. Kullanılan tamoksifen miktarı meme kanseri hücrelerinde östrojeni antogonize ettiği bilinen konsantrasyondur. Yaptıkları çalışmalar sonucunda estradiolün inhibe edici etkisi önemli ölçüde antagonize edilmiştir (Okada vd., 1997).

Altı farklı antidepresan sınıfının LPS ile uyarılan monositlerdeki IP-10 kemokin ekpresyonu üzerindeki etkilerini *in vitro* olarak araştıran Tsai ve diğerleri, THP-1 hücrelerini LPS ile stimüle etmeden önce antidepresanlarla ön işleme tabii tutmuşlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda 10^{-5} M uygulanan fluoksetin (SSRI) ve 10^{-5}-10^{-8} M uygulanan bupropion (NDRIs)'in sitotoksik etkisine rastlanmamıştır (Tsai vd., 2014).

5.3. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Essitalopram Oksalat ve Tamoksifen için IC_{50} Değerlerinin Değerlendirilmesi

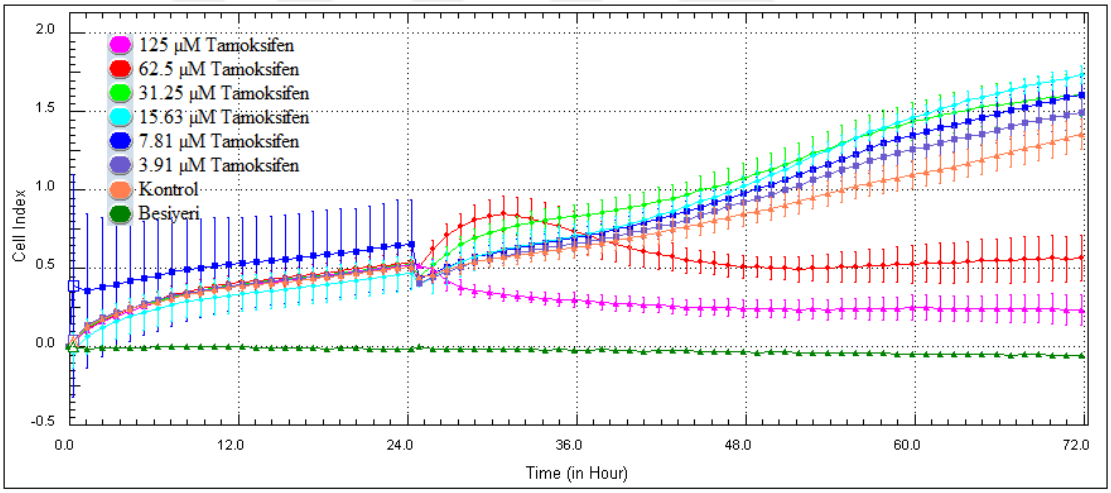
MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde (RTCA DP) ölçüm için kullanılacak olan E-plakaların içine $1x10^5$ hücre olacak şekilde ekilmiş ve daha sonra prosedüre uygun şekilde maddelerin konsantrasyonları denenmiştir.

MTT sitotoksisite testi ile yapılan taramalar sonucunda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının tamoksifen (125-3.90625 µM) ve essitalopram oksalat (30-7.5 µM) konsantrasyon aralıkları belirlenmiş olup, RTCA DP sisteminde uygulanmıştır. Konsantrasyonların uygulanmasından 48 saat sonra (toplam 72 saat) cihaz durdurulmuş ve IC_{50} değerleri RTCA DP Software 1.2.1 programı tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır. Tamoksifen ve essitalopram oksalatın MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları için elde edilen IC_{50} değerleri tablo 5.5'de gösterilmiştir.

Tablo 5.5. *Tamoksifen ve Essitalopram Oksalat'ın MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları için IC_{50} değerleri*

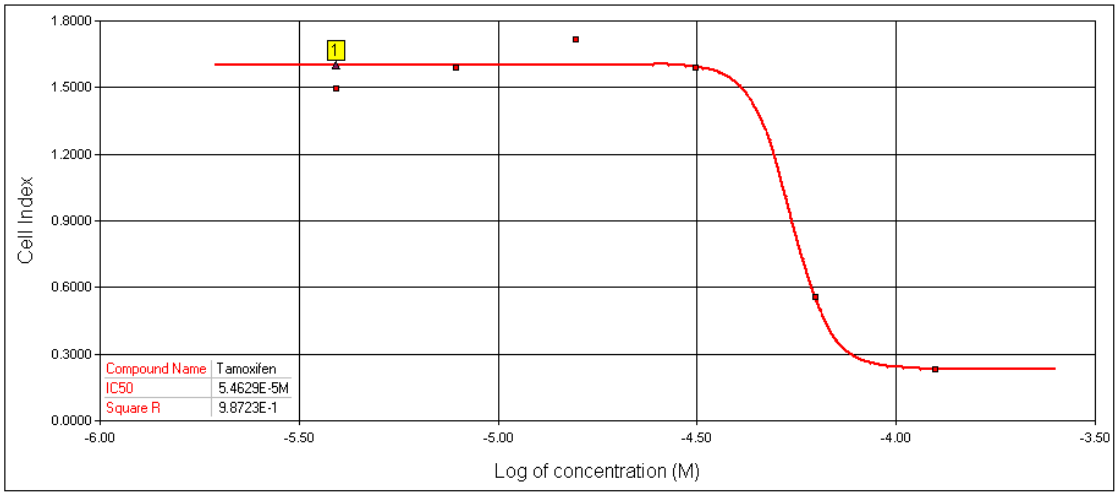
Hücre Hatları	Tamoksifen (µM)	Essitalopram Oksalat (µM)
MCF-7	54.6	13.7
MDA-MB-231	58.4	10.9

MTT sitotoksisite testi ile yapılan geniş konsantrasyon taramasından elde edilen veriler sonucu uygun konsantrasyonlar seçilmiş, RTCA DP'de saat başı ölçümler alınmıştır. MCF-7 hücrelerinde tamoksifen konsantrasyonları 125-3.90625 µM aralığında ve 4 tekrarlı olarak denenmiştir (Şekil 5.3). Yapılan deneyde hücreler E-plakalara ekildikten 24 saat sonra cihaz durdurulmuş ve tamoksifenin farklı konsantrasyonları MCF-7 hücrelerine uygulanmıştır. 48 saat sonunda (toplam 72 saat) cihaz durdurularak sonuçlar alınmıştır.



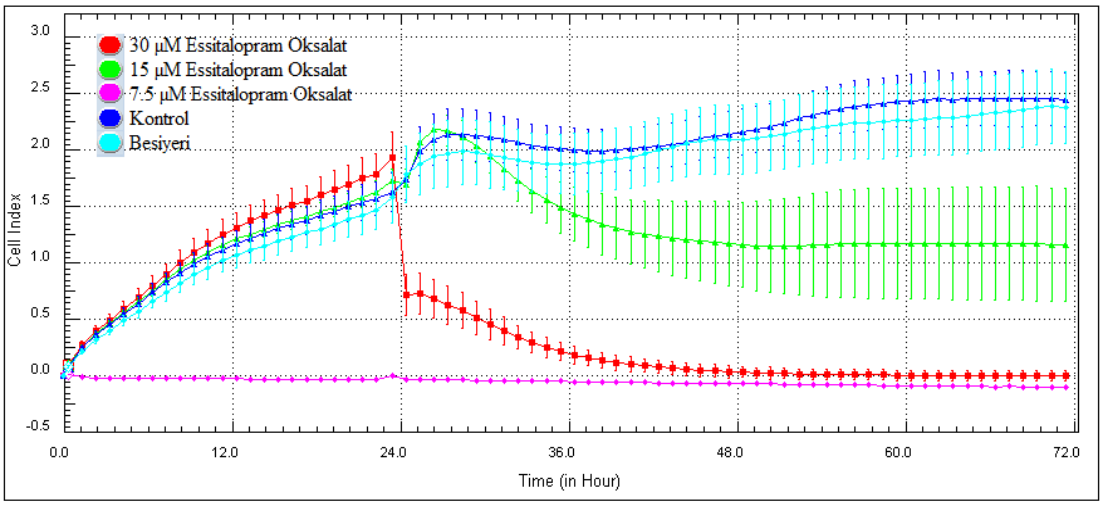
Şekil 5.3. *Tamoksifen'in 48 saatlik konsantrasyonlarının MCF-7 hücre proliferasyon eğrisi (n=4, ort± standart sapma)*

MCF-7 hücrelerine tamoksifen konsantrasyonları uygulandıktan 48 saat sonra program durdurulmuş ve RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak konsantrasyon-hücre indeksi eğrileri oluşturularak IC_{50} hesaplamaları yapılmıştır (Şekil 5.4). Bu verilere göre tamoksifenin MCF-7 hücreleri üzerindeki IC_{50} değeri 54.6 µM'dır.



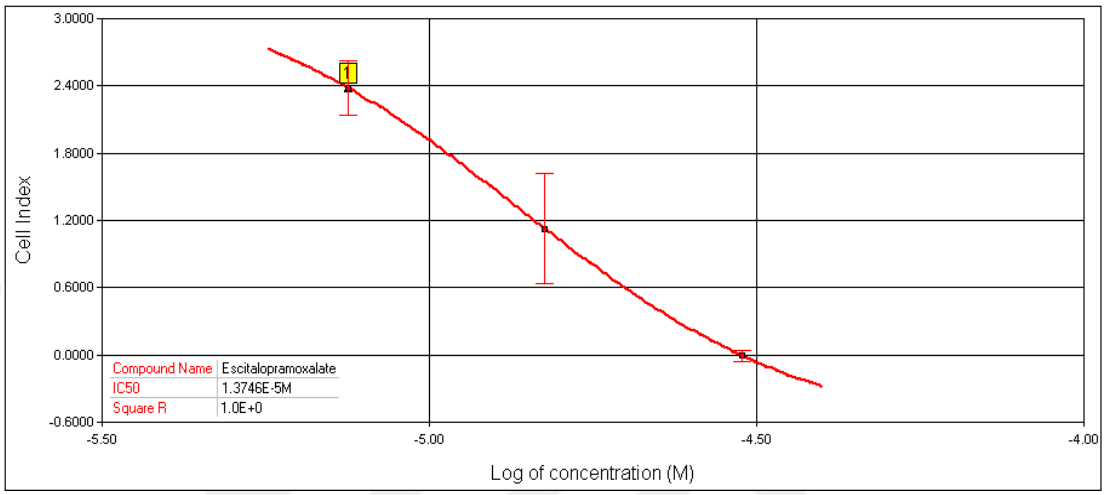
Şekil 5.4. *RTCA DP sisteminde Tamoksifen'in MCF-7 hücrelerinde 48 saatteki CI değerlerine göre IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi (IC_{50}: 54.6 µM)*

MTT testi ile elde ettiğimiz konsantrasyonları kullanarak kurduğumuz RTCA DP'de MCF-7 hücrelerinde essitalopram oksalat konsantrasyonları 30-7.5 µM aralığında ve 5 tekrarlı olarak denenmiştir (Şekil 5.5). Yapılan deneyde hücreler E-plakalara ekildikten 24 saat sonra cihaz durdurulmuş ve essitalopram oksalatın farklı konsantrasyonları MCF-7 hücrelerine uygulanmıştır. 48 saat sonunda (toplam 72 saat) cihaz durdurularak sonuçlar alınmıştır.



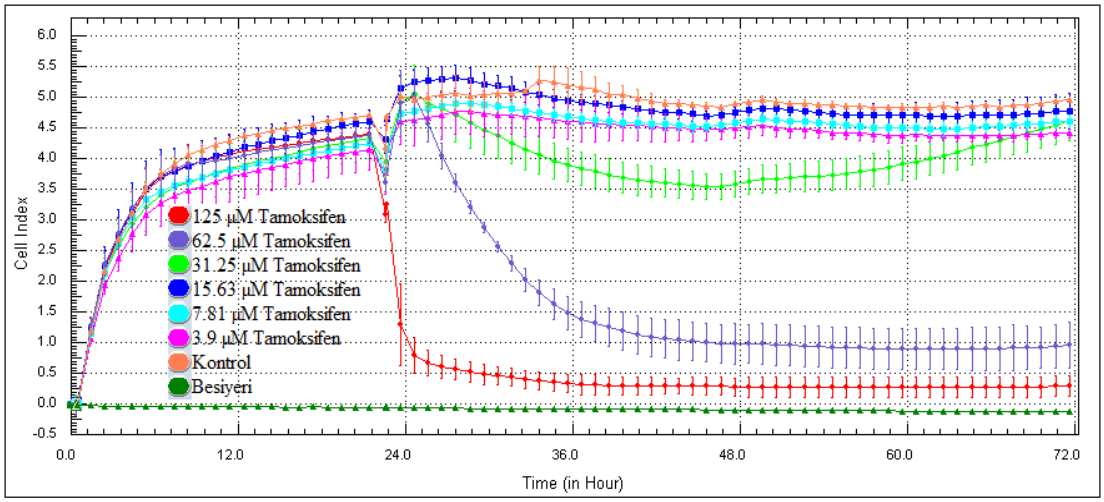
Şekil 5.5. *Essitalopram Oksalat'ın 48 saatlik konsantrasyonlarının MCF-7 hücre proliferasyon eğrisi (n=5, ort± standart sapma)*

Essitalopram oksalat konsantrasyonları uygulandıktan 48 saat sonra program durdurulmuş ve RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak konsantrasyon-hücre indeksi eğrileri oluşturularak IC_{50} hesaplamaları yapılmıştır (Şekil 5.6). Bu verilere göre essitalopram oksalatın MCF-7 hücreleri üzerindeki IC_{50} değeri 13.7 µM'dır.



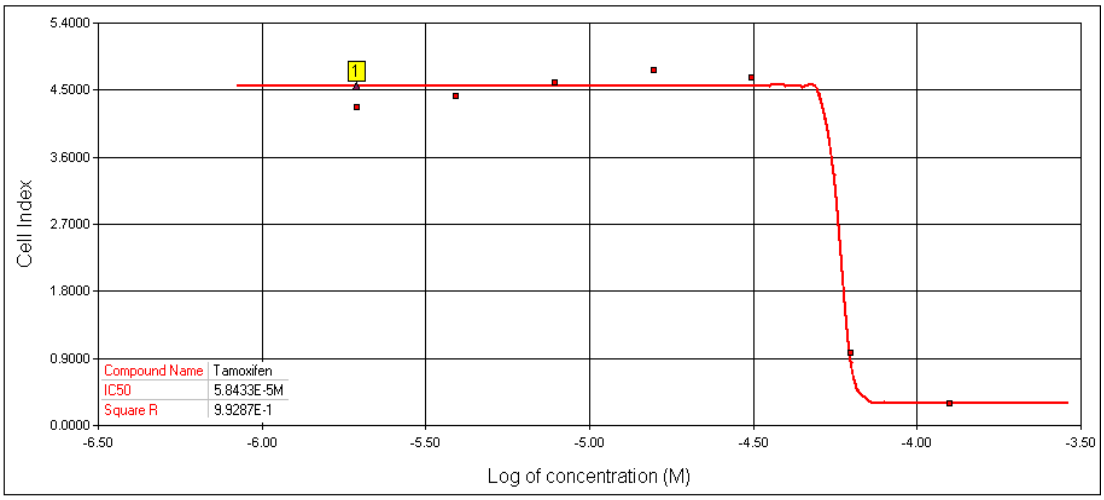
Şekil 5.6. *RTCA DP sisteminde Essitalopram Oksalat'ın MCF-7 hücrelerinde 48 saatteki CI değerlerine göre IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi (IC_{50}: 13.7 µM)*

Tamoksifenin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki etkilerine MTT sitotoksisite testleri ile bakılmış ve yapılan tarama sonucu 125-3.90625 µM aralığında, 4 tekrarlı olarak RTCA DP'de deney kurulmuştur (Şekil 5.7). Yapılan deneyde hücreler E-plakalara ekildikten 24 saat sonra cihaz durdurulmuş ve tamoksifenin farklı konsantrasyonları MDA-MB-231 hücrelerine uygulanmıştır. 48 saat sonunda (toplam 72 saat) cihaz durdurularak sonuçlar alınmıştır.



Şekil 5.7. *Tamoksifen'in 48 saatlik konsantrasyonlarının MDA-MB-231 hücre proliferasyon eğrisi (n=4, ort± standart sapma)*

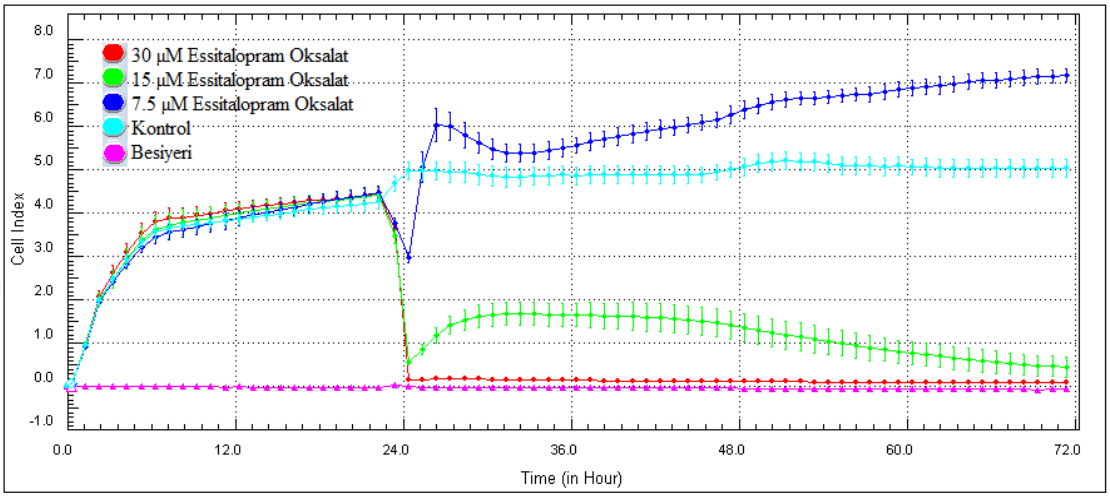
Tamoksifen konsantrasyonları uygulandıktan 48 saat sonra program durdurulmuş ve RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak konsantrasyon-hücre indeksi eğrileri oluşturularak IC_{50} hesaplamaları yapılmıştır (Şekil 5.8). Bu verilere göre tamoksifenin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki IC_{50} değeri 58.4 µM'dır.



Şekil 5.8. *RTCA DP sisteminde Tamoksifen'in MDA-MB-231 hücrelerinde 48 saatteki CI değerlerine göre IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi (IC_{50}: 58.4 µM)*

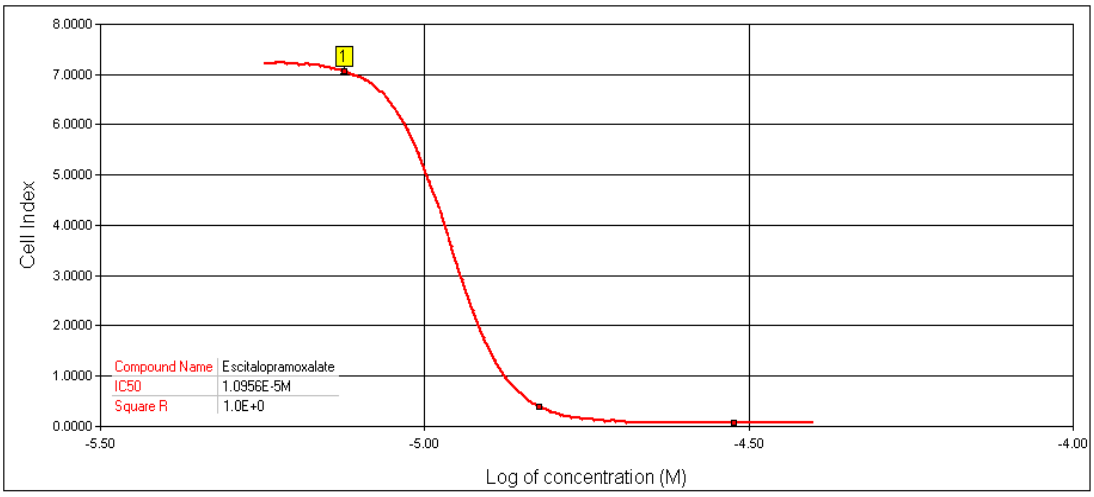
MTT sitotoksisite testi ile yapılan geniş konsantrasyon taramasından elde edilen veriler sonucu uygun konsantrasyonlar seçilmiş ve RTCA DP'de MDA-MB-231 hücrelerinde essitalopram oksalat konsantrasyonları 30-7.5 µM aralığında ve 5 tekrarlı

olarak denenmiştir (Şekil 5.9). Yapılan deneyde hücreler E-plakalara ekildikten 24 saat sonra cihaz durdurulmuş ve essitalopram oksalatın farklı konsantrasyonları MDA-MB-231 hücrelerine uygulanmıştır. 48 saat sonunda (toplam 72 saat) cihaz durdurularak sonuçlar alınmıştır.



Şekil 5.9. *Essitalopram Oksalat'ın 48 saatlik konsantrasyonlarının MDA-MB-231 hücre proliferasyon eğrisi (n=5, ort± standart sapma)*

Essitalopram oksalat konsantrasyonları uygulandıktan 48 saat sonra program durdurulmuş ve RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak konsantrasyon-hücre indeksi eğrileri oluşturularak IC_{50} hesaplamaları yapılmıştır (Şekil 5.10). Bu verilere göre essitalopram oksalatın MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki IC_{50} değeri 10.9 µM'dır.



Şekil 5.10. *RTCA DP sisteminde Essitalopram Oksalat'ın MDA-MB-231 hücrelerinde 48 saatteki CI değerlerine göre IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi (IC_{50}: 10.9 µM)*

17β-estradiolün tamoksifenin anti-proliferatif etkinliği üzerindeki etkilerini araştıran Xu ve diğerleri bunun için ER+ bir hücre hattı olan MCF-7'yi kullanmıştır. Tamoksifen 10^{-8} M, 10^{-7} M, $5x10^{-7}$ M, 10^{-6} M, $5x10^{-6}$ M ve 10^{-5} M konsantrasyonlarında MCF-7 hücre hattında denenmiştir. Hücre proliferasyonu ve sitotoksisite xCELLigence RTCA-S16 kullanılarak sürekli olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tamoksifen 10^{-7} M konsantrasyonda tedaviyi takiben önemli bir fark yaratmazken, daha yüksek konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerinin büyümesini inhibe etmiştir (Xu vd., 2019).

xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanarak tamoksifen ve D vitaminin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendiren Yetkin, farklı dozlarda tamoksifen ve vitamin D (20 µM Tam + 50 nM vit D, 20 µM Tam + 100 nM vit D, 10 µM Tam + 50 nM vit D, 10 µM Tam + 100 nM vit D) konsantrasyonlarını MCF-7 hücreleri üzerinde denemiştir. Elde ettiği veriler doğrultusunda düşük tamoksifen ve D vitamini kombinasyonunun kanser hücrelerinin çoğalmasını teşvik ettiğini ve MCF-7 hücreleri için tamoksifenin IC_{50} değerinin 22 µM olduğunu bulmuştur (Yetkin, 2019).

Usnik asidi meme kanseri tedavisinde rutin olarak kullanılan tamoksifen ile karşılaştıran Cansaran-Duman ve diğerleri, xCELLigence gerçek zamanlı analiz sistemi kullanarak usnik asit ve tamoksifenin IC_{50} değerlerini hesaplamışlardır. Bu çalışmalar sırasında usnik asit ve tamoksifen 10-25-50-100 µM konsantrasyon aralığında MDA-MB-231 hücre hattı için denenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda tamoksifenin MDA-

MB-231 hücre hattı için IC_{50} değeri 1.26E-05M olarak bulunmuştur (Cansaran-Duman vd., 2020).

Essitalopram oksalatın MCF-7, MDA-MB-231 ve farklı diğer hücre hatları ile benzer çalışmaları bulunmamaktadır.

5.4. AnnexinV-PI yöntemi kullanılarak akış sitometride MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında Tamoksifen ve Essitalopram Oksalat'ın apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi

Floresan bir madde ile işaretlenen Annexin-V apoptoz sonucu membranın dış yüzeyine geçen fosfotidilserine ve nektrotik hücrelerin yüzeyine bağlanır (Güleş ve Eren, 2008). Apoptotik hücrelerle nekroza uğrayan hücreleri birbirinden ayırabilmek için ortama ikinci bir boya olarak propidyum iyodür (PI) eklenmektedir. Annexin-V yeşil floresans (FITC) gösterirken, PI kırmızı floresans (PE) gösterir (Overbeeke vd., 1998). Bu sayede iki farklı boya ile boyanan hücreler; canlı hücreler (FITC-,PE-), erken apoptotik hücreler (FITC+, PE-), geç apoptotik hücreler (FITC+, PE+) ve nektorik hücreler (FITC-, PE+) şeklinde birbirinden ayırt edilebilmektedir (Dikmen vd., 2011).

Yeterince gelişen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri kaldırılıp sayıldıktan sonra 6 kuyucuklu plakalara her bir kuyuda $1x10^5$ hücre olacak şekilde dağıtılmıştır. 24 saat inkübasyondan sonra hücrelerin besiyerleri çekilerek apoptoz ölçümü yapılacak olan maddelerin IC_{50} değerleri (MCF-7 için: Tamoksifen IC_{50} 54.6 µM, Essitalopram Oksalat IC_{50} 13.7 µM; MDA-MB-231 için: Tamoksifen IC_{50} 58.4 µM, Essitalopram Oksalat IC_{50} 10.9 µM) besiyeri içinde hazırlanarak kuyulara verilmiş, bir kuyunun besiyeri kontrol amaçlı taze besiyeri ile değiştirilmiştir. 24 saat madde ile muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin Annexin-V PI ile boyanarak akış sitometri ile elde edilen apoptotik verileri tablo 5.6'da ve akış sitometri sonuçları ise şekil 5.11'de gösterilmektedir.

Tablo 5.6. *Tamoksifen ve Essitalopram Oksalat'ın MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki apoptotik etkileri*

Hücreler	Maddeler	Canlı Hücre (%)	Nekroz Hücre (%)	Erken Apoptoz (%)	Geç Apoptoz (%)
MCF-7	Kontrol	92.4	3.7	1.3	2.6
	Tamoksifen IC_{50}	62.0	5.1	5.1	17.9
	Essitalopram Oksalat IC_{50}	82.5	4.7	4.7	8.8
MDA-MB-231	Kontrol	94.0	2.9	0.9	2.2
	Tamoksifen IC_{50}	63.7	4.5	3.7	28.2
	Essitalopram Oksalat IC_{50}	89.6	8.2	0.4	1.8

Annexin-V – PI ile boyanan MCF-7 hücrelerinde kontrol grubunun canlı hücresi %92.4 iken nekroza uğrayan hücreler %3.7, erken apoptoza uğrayan hücreler %1.3 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %2.6'dır. Buna göre apoptotik hücreler toplam hücrelerin %3.9'unu oluşturmaktadır. Canlı hücreler nekroza uğrayan hücrelerin 25 katı iken, apoptotik hücrelerin 23.7 katıdır (Şekil 5.11) (Tablo 5.6).

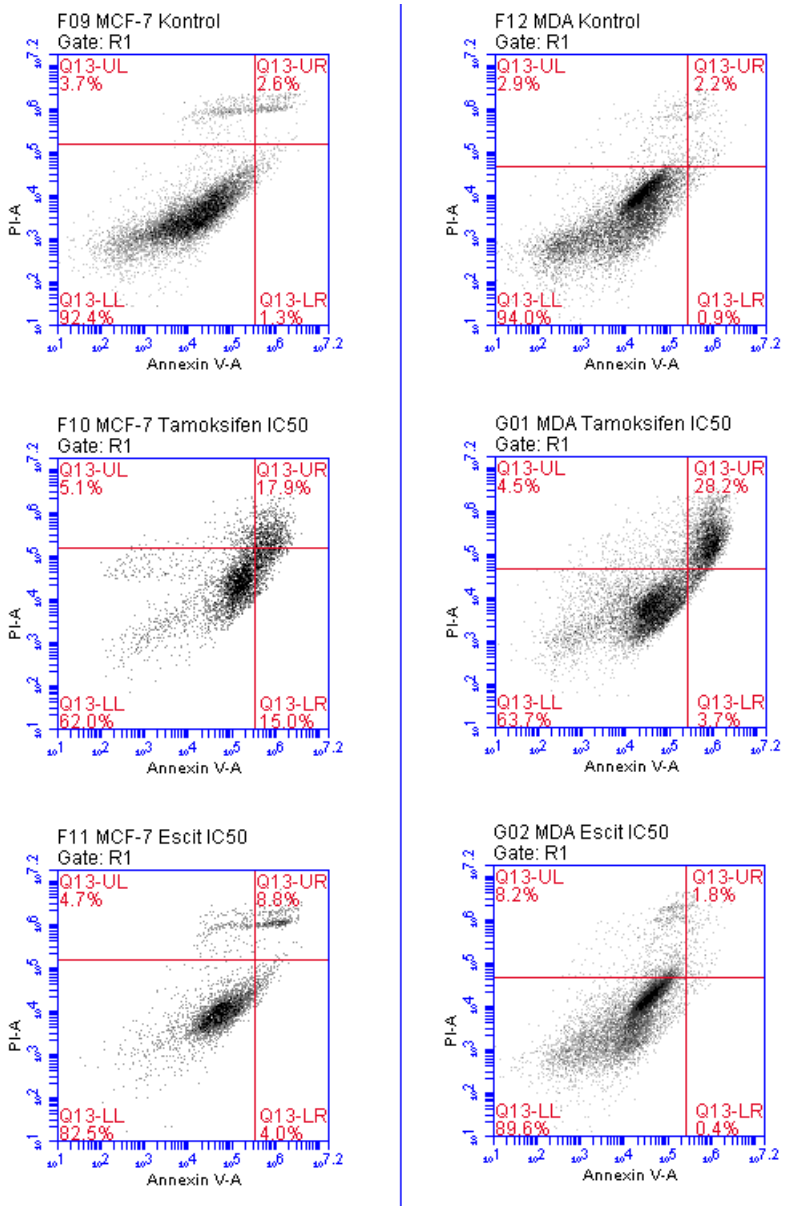
MCF-7'nin 24 saat tamoksifen (IC_{50} 54.6 µM) ile muamelesi sonucu canlı hücreler toplam hücrelerin %62.0'si iken nekroza uğrayan hücreler %5.1, erken apoptoza uğrayan hücreler %5.1 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %17.9 olarak ölçülmüştür. Buna göre apoptotik hücreler toplam hücrelerin %23'üdür. Tamoksifen ile muamele edilen MCF-7 hücrelerindeki apoptotik etkileri kontrol grubu ile kıyasladığımızda, canlı hücreler tamoksifen ile muamele edilen canlı hücrelerden 1.5 kat fazladır. Nekroza uğrayan hücreler ise tamoksifen ile muamele edilen gruptan 1.4 kat daha fazla olup, apoptotik hücreler ise kontrolün 5.9 katıdır (Şekil 5.11) (Tablo 5.6).

MCF-7'nin 24 saat essitalopram oksalat (IC_{50} 13.7 µM) ile muamelesi sonucu canlı hücreler toplam hücrelerin %82.5'i iken nekroza uğrayan hücreler %4.7, erken apoptoza uğrayan hücreler %4.7 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %8.8 olarak ölçülmüştür. Buna göre apoptotik hücreler toplam hücrelerin %13.5'idir. Essitalopram oksalat ile muamele edilen MCF-7 hücrelerindeki apoptotik etkileri kontrol grubu ile kıyasladığımızda, canlı hücreler essitalopram oksalat ile muamele edilen canlı hücrelerden 1.12 kat fazladır. Nekroza uğrayan hücreler ise essitalopram oksalat ile muamele edilen gruptan 1.3 kat daha fazla olup, apoptotik hücreler ise kontrolün 3.5 katıdır (Şekil 5.11) (Tablo 5.6).

Annexin-V – PI ile boyanan MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubunun canlı hücresi %94 iken nekroza uğrayan hücreler %2.9, erken apoptoza uğrayan hücreler %0.9 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %2.2'dir. Buna göre apoptotik hücreler toplam hücrelerin %3.1'ini oluşturmaktadır. Canlı hücreler nekroza uğrayan hücrelerin 32.4 katı iken, apoptotik hücrelerin 30.3 katıdır (Şekil 5.11) (Tablo 5.6).

MDA-MB-231'in 24 saat tamoksifen (IC_{50} 58.4 μM) ile muamelesi sonucu canlı hücreler toplam hücrelerin %63.7 iken nekroza uğrayan hücreler %4.5, erken apoptoza uğrayan hücreler %3.7 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %28.2 olarak ölçülmüştür. Buna göre apoptotik hücreler toplam hücrelerin %31.9'udur. Tamoksifen ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerindeki apoptotik etkileri kontrol grubu ile kıyasladığımızda, canlı hücreler tamoksifen ile muamele edilen canlı hücrelerden 1.5 kat fazladır. Nekroza uğrayan hücreler ise tamoksifen ile muamele edilen gruptan 1.6 kat daha fazla olup, apoptotik hücreler ise kontrolün 10.3 katıdır (Şekil 5.11) (Tablo 5.6).

MDA-MB-231'in 24 saat essitalopram oksalat (IC_{50} 10.9 μM) ile muamelesi sonucu canlı hücreler toplam hücrelerin %89.6'sı iken nekroza uğrayan hücreler %8.2, erken apoptoza uğrayan hücreler %0.4 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %1.8 olarak ölçülmüştür. Buna göre apoptotik hücreler toplam hücrelerin %2.2'idir. Essitalopram oksalat ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerindeki apoptotik etkileri kontrol grubu ile kıyasladığımızda, canlı hücreler essitalopram oksalat ile muamele edilen canlı hücrelerden 1.05 kat fazladır. Nekroza uğrayan hücreler ise essitalopram oksalat ile muamele edilen gruptan 2.8 kat daha fazla olup, apoptotik hücreler ise kontrolün 1.4 katıdır (Şekil 5.11) (Tablo 5.6).



Şekil 5.11. *Tamoksifen ve Essitalopram Oksalat'ın IC_{50} değerlerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki etkisinin Annexin-V – PI boyası ile boyanarak akış sitometride gösterilmesi*

Acanthaster planci denizyıldızı ekstresinin sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştıran Mutee ve diğerleri pozitif kontrol olarak tamoksifen kullanmıştır. MCF-7 hücreleri ile çalışan Mutee ve diğerleri apoptoz çalışmalarını Annexin-V PI boyası ile yapmış ve akış sitometri cihazı kullanarak sonuçları almışlardır. Aldıkları sonuçlara göre kontrol grubu hücrelerin yaklaşık %89'u canlı, yaklaşık %4.5'i erken apoptotik ve yaklaşık %6.5'inin ise geç apoptotik/nekrotik olduğu görülmüştür. 15 µg/mL tamoksifen ile 4 saat muameleden sonra ise canlılık %52.2'ye düşerken, erken apoptoz %41.3'e yükselmiş ve geç apoptoz/nekroz ise %5.5'e düşmüştür (Mutee vd., 2012).

Strobilanthes cripus yapraklarının östrojen reseptörüne yanıt veren ve vermeyen meme kanseri hücrelerinde tamoksifen tarafından indüklenen hücre ölümü aktiviteleri üzerindeki etkisini araştıran Yaacob, tek başına 2.5 µM tamoksifen ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde 24 saat sonunda %27 ve 48 saat sonunda %40 apoptoz görmüştür. 2.5 µM tamoksifen ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinde ise yaklaşık %11 apoptotik hücre gözlemlerken 5 µM tamoksifenin apoptozu %25'e kadar indüklediğini kaydetmişlerdir (Yaacob, 2014).

Tamoksifenin BCL-2 ailesi gen ürünleri BCL-2, BAX, BCL-X_L üzerindeki ve ER+ MCF-7 meme kanseri hücrelerinde p53 seviyeleri üzerindeki etkilerini araştıran Zhang ve diğerleri, anti-östrojen olan tamoksifenin MCF-7 insan meme hücrelerinde apoptozu zaman ve konsantrasyona bağlı olarak indüklediğini göstermiştir. Yaptıkları çalışmalarda 10^{-5} M tamoksifen ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin çekirdeklerinin 48 saat sonra büzülmeye başladığını, morfolojilerinde belirgin değişimler olduğunu saptamıştır. ELISA ile yaptıkları çalışmada 10^{-8} M tamoksifenden fazla uygulanan tamoksifenin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde apoptotik etkiye sahip olduğunu, zamana ve konsantrasyona bağlı olarak tamoksifenin apoptozu indüklediğini bulmuşlardır. 72 saat boyunca 10^{-5} M tamoksifen ile tedavi edilen MCF-7 hücreleri tedavi edilmeyen hücrelere oranla 8 kat daha yüksek apoptoz oranı sergilemiştir (Zhang vd., 1999).

Tamoksifenin doza ve zamana bağlı apoptotik etkilerini inceleyen Salami ve Karami-Tehrani, yaptıkları çalışmalarda ER+ olarak MCF-7 ve ER- olarak MDA-MB-468 hücre hattını ve apoptotik etkilere bakmak için Annexin-V ve PI boyama yöntemini kullanmışlardır. Yapılan çalışmalarda MCF-7 hücrelerinde tamoksifenin 1 µM'lık konsantrasyonu erken apoptozda önemli bir artışa neden olurken, 24 saatte pik değerine ulaştığı bulunmuştur. Bunun yanında MDA-MB-468 hücrelerinde daha düşük dozlarda (0.5, 1, 2.5, 10 ve 15 µM) tamoksifenin önemsiz apoptoza neden olduğu, 20 µM konsantrasyonda ise zamana bağlı olarak erken apoptozda önemli bir artışa neden olduğu ve MDA-M-468 hücrelerinin MCF-7 hücrelerinden farklı olarak 36 saatte pik değerine ulaştığı görülmüştür (Salami ve Karami-Tehrani, 2003).

Apigeninde Annexin-V FITC testi ile hücre apoptotik tayini ve meme kanseri hücrelerinde rutin nedeniyle hücre ölümünü araştıran Kamaludin ve diğerleri bu çalışmalarda tamoksifeni pozitif kontrol olarak kullanmışlardır. Yapılan çalışmada tamoksifenin IC_{50} değerini 30 µM olarak bulmuşlardır. 72 saat tamoksifen ile muamele edilen MCF-7 hücreleri Annexin-V ve PI ile boyayarak apoptotik etkiler akış sitometri

ile analiz etmişlerdir. Yapılan çalışmaya göre tamoksifen MCF-7 hücrelerinde %51 Anneksin-V+/PI- (erken apoptoz) değer göstermiştir (Kamaludin vd., 2013).

Timokinon (TQ) ve tamoksifenin kombine uygulamalarının meme kanseri gelişimi ve apoptozu üzerine etkilerini araştıran Rajput ve diğerleri MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerini 24 saat boyunca tamoksifen ve TQ'nun kombine IC_{50} konsantrasyonu ile muamele etmiştir ve apoptozu belirlemek için Annexin-V ve PI boyalarını kullanmışlardır. MCF-7 hücrelerinde (TQ 20 µM ve tamoksifen 9 µM), MDA-MB-231 hücrelerinde (TQ 16 µM ve tamoksifen 13 µM) tedavi edilmeyen kontrollere göre (%0.27±1.6) daha yüksek bir apoptotik hücre yüzdesine sahip olarak bulunmuştur. Düşük doz TQ ve tamoksifen kombinasyonu (MCF-7 için TQ ve tamoksifen 5 µM, MDA-MB-231 için 3 µM) her iki ilacın tek başına dozlarına oranla önemli ölçüde daha yüksek apoptotik etkiye sahip olarak bulunmuştur (Rajput vd., 2013).

Essitalopram oksalatın MDA-MB-231 ya da MCF-7 hücreleri ile benzer çalışmaları bulunmamaktadır. Bunun yanında essitalopram oksalatın glioma C6 hücrelerindeki sitotoksik etkilerini araştıran Dikmen ve diğerleri essitalopram oksalatın C6 hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini Annexin-V ve PI boyaları ile saptamışlardır. Bunun için C6 hücreleri 24 saat boyunca essitalopram oksalatın farklı konsantrasyonları (25,50,100 ve 200 µM) ile muamele edilmiştir. İnkübasyon sonrası essitalopram oksalatın erken ve geç apoptotik etkileri konsantrasyonlarına göre sırasıyla; %17, %22.3, %12.5 ve %7.8, nekrotik etkileri sırasıyla %2.8, %16.5, %21.5 ve %35.8 olarak hesaplanmıştır (Dikmen vd., 2011).

5.5. E.coli LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücrelerinde IL-1β seviyesinin akış sitometride değerlendirilmesi

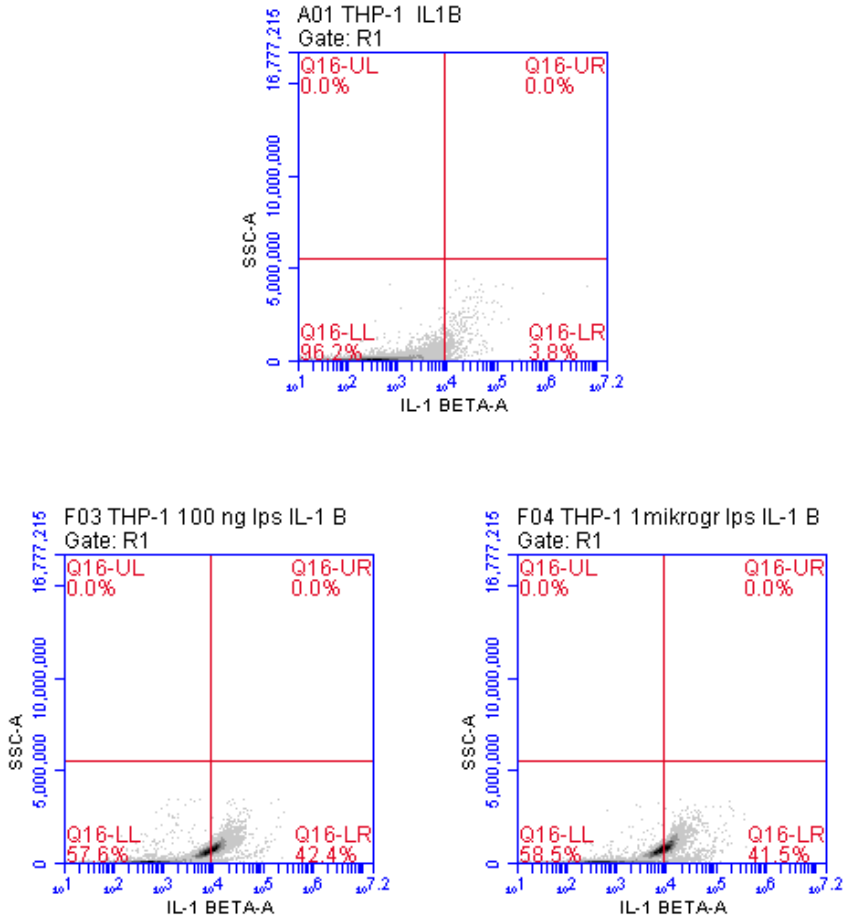
Uygun yoğunluğa ulaşan THP-1 hücrelerinin sayımı yapıldıktan sonra, 6 kuyucuklu plakalara her bir kuyuda $2x10^5$ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Süspanse halde olan THP-1 hücrelerinin bir kuyusuna 1 µg/mL ve diğer kuyusuna 100 ng/mL oranında *E.coli* LPS'si ilave edilirken 1 kuyu kontrol grubu olarak ayrılmış ve 4 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi dolan THP-1 hücreleri toplanarak prosedüre uygun olarak IL-1β ile boyanmıştır. İşlem sonrası elde edilen süspanse hücre akış sitometride analiz edilmiştir. Akış sitometri ile elde edilen sonuçlar tablo 5.7'de gösterilmektedir.

Tablo 5.7. *1 µg/mL ve 100 ng/mL E.coli LPS'si ile muamele edilen THP-1 hücrelerinde IL-1β seviyeleri*

Hücre	Maddeler	IL-1β	
		% (-)	% (+)
THP-1	Kontrol	96.2	3.8
	100 ng/mL LPS	57.6	42.4
	1 µg/mL LPS	58.5	41.5

Yapılan çalışmada LPS ile stimüle edilen THP-1 hücrelerinde kontrol grubu %3.8 IL-1β salgılarken 100 ng/mL LPS ile 4 saatlik muamele sonucunda bu değer 11.16 kat artarak % 42.4'e yükselmiş ve 1 µg/mL LPS ile 4 saatlik muamele sonucunda ise 10.9 kat artarak %41.5'e yükselmiştir. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda 100 ng/mL LPS'nin THP-1 monositlerinde IL-1β aktivitesini 1 µg/mL LPS'ye oranla 1.02 kat daha fazla arttırdığını söyleyebiliriz (Tablo 5.7)(Şekil 5.12).



Şekil 5.12. *100 ng/mL ve 1 µg/mL E.coli LPS'si ile stimüle edilen THP-1 hücrelerinin IL-1β seviyeleri*

THP-1 hücre hattından türetilen monosit ve makrofajlar üzerindeki gıda bileşiklerilerinin iltihaplanma ile ilişkili immün tepkilerini inceleyen Chanput ve diğerleri bunun için THP-1 hücrelerini 1 µg/mL LPS ile stimüle etmiştir. IL-1β seviyesini akış sitometri ile analiz etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre THP-1 monositlerinin LPS'ye maruz bırakılması IL-1β salınımını önemli ölçüde arttırmıştır (Chanput vd., 2010).

5.6. Oluşturulan meme kanseri ko-kültür modelinde tamoksifen ve essitalopram oksalatın immünolojik etkilerinin değerlendirilmesi

MCF-7, MDA-MB-231 ve THP-1 hücreleri ile oluşturulan meme kanseri ko-kültür modelleri, MCF-7 ko-kültür modeli ve MDA-MB-231 ko-kültür modelidir. Bu modeller oluşturulurken kullanılan MCF-7, MDA-MB-231 ve THP-1 hücreleri her kuyuya $2x10^5$ hücre olacak şekilde sayılarak ekilmiştir.

Deneyler sırasında THP-1 hücrelerinden 24 kuyulu plakanın 8 kuyusuna (alt odacığa) ekilmiş ve bu 8 kuyunun 7'sine 100 ng/mL LPS verilmiştir. LPS uygulanmayan kuyu THP-1 kontrolünü oluştururken, LPS uygulanan 1 kuyu THP-1 LPS kontrol grubunu oluşturmaktadır.

MCF-7 ko-kültür modeli için 1 kuyunun alt odacığına ekilen MCF-7 hücrelerine madde verilmeden kontrol grubu olarak kullanılırken, diğer 3 kuyunun alt odacığında LPS ile stimüle edilen THP-1 hücreleri ve haznelerinde ise MCF-7 hücreleri bulunmaktadır. Bu 3 kuyunun birine MCF-7 için tamoksifenin IC_{50} değerindeki konsantrasyonu (54.6 µM) verilirken bir diğerine essitalopram oksalat için IC_{50} değerinde konsantrasyon (13.7 µM) uygulanmıştır. Diğer kuyu ise MCF-7 ko-kültür modelinin kontrol grubunu oluşturmaktadır.

Aynı şekilde MDA-MB-231 ko-kültür modelinde bir kuyunun alt odacığında MDA-MB-231 hücresi kontrol grubu olarak temiz besiyeri içinde ekilirken, diğer 3 kuyunun alt odacığına LPS ile stimüle edilen THP-1 hücreleri ve haznelerinde ise MDA-MB-231 hücreleri bulunmaktadır. Bu 3 kuyunun birine MDA-MB-231 için tamoksifenin IC_{50} (58.4 µM) değerindeki konsantrasyonu uygulanırken diğerine ise essitalopram oksalat için IC_{50} (10.9 µM) değerindeki konsantrasyon uygulanmıştır. Diğer kuyu ise MDA-MB-231 ko-kültür modelinin kontrol grubunu oluşturmaktadır.

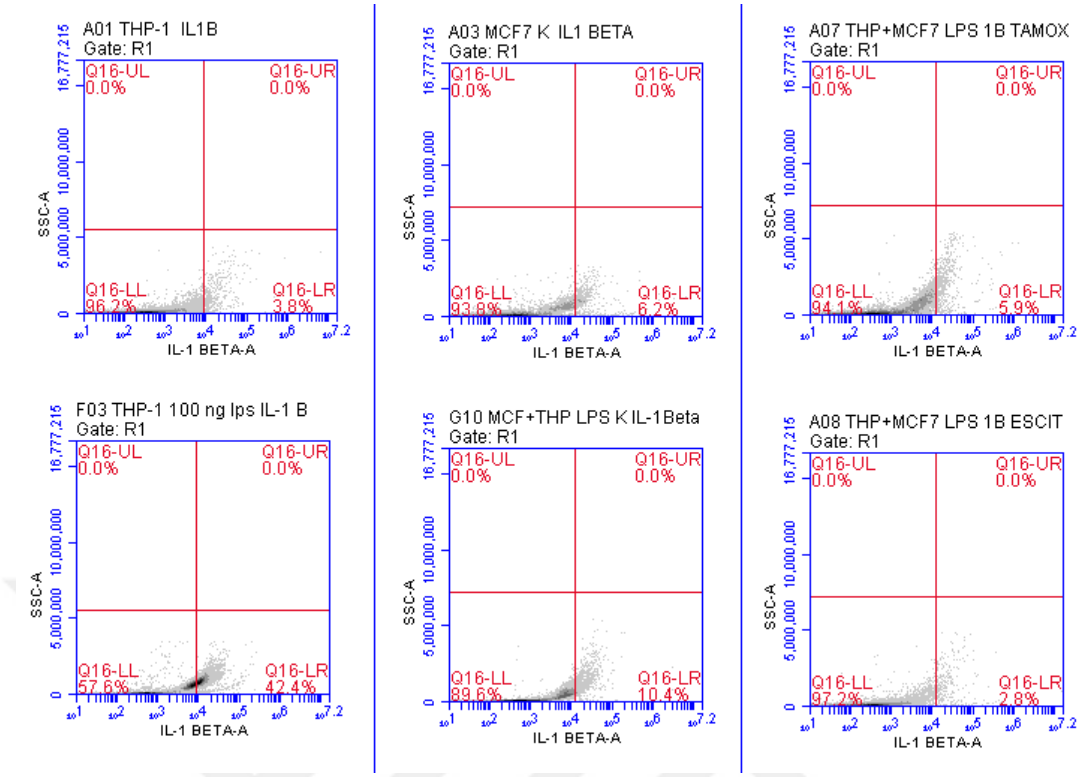
Ko-kültür modelinde tamoksifen ve essitalopram oksalatın immünolojik etkilerini anlamak için akış sitometri yöntemi kullanılmış ve sonuçlar BD Accuri C6 Flow

Cytometer cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Tamoksifen ve essitalopramın MCF-7 ko-kültür modelinde immünolojik etkileri tablo 5.8'de gösterilmektedir.

Tablo 5.8. *MCF-7 ko-kültür modelinde IL-1 β, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF-α sonuçları*

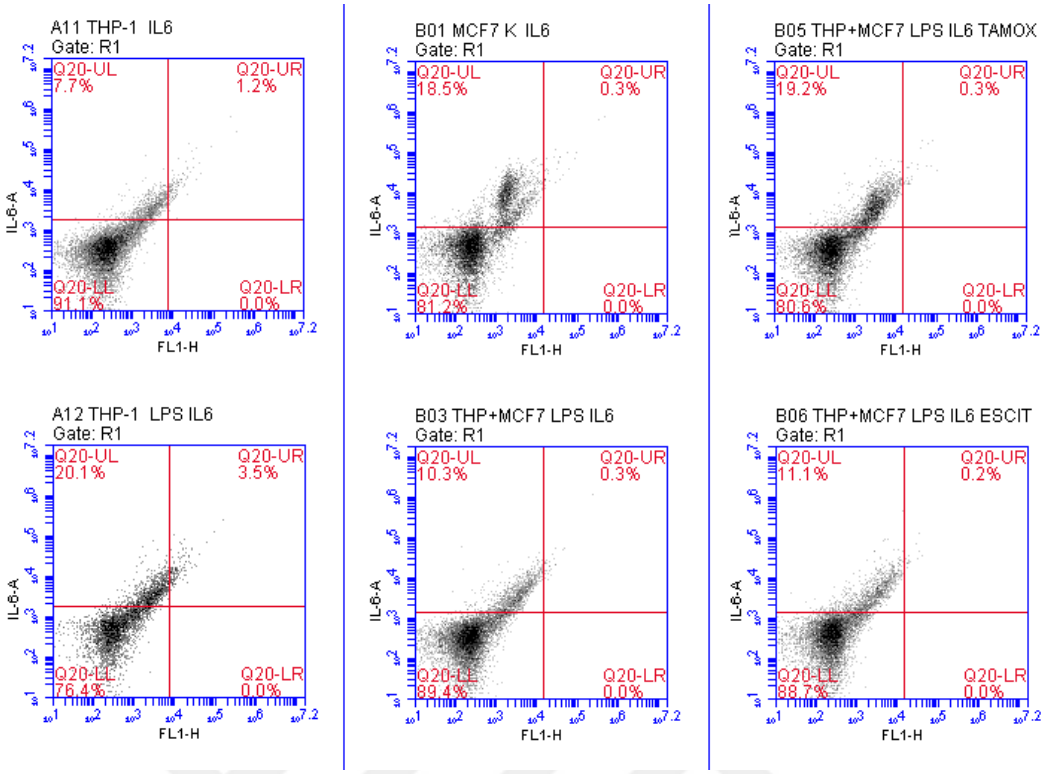
		IL-1β		**IL-6**		**IL-8**		**IL-10**		**TNF-α**	
Hücreler	**Maddeler**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**
		(-)	**(+)**	**(-)**	**(+)**	**(-)**	**(+)**	**(-)**	**(+)**	**(-)**	**(+)**
THP-1	Kontrol	96.2	3.8	91.1	7.7	85.5	14.2	90.0	9.7	86.9	12.7
	100 ng/mL LPS	57.6	42.4	76.4	20.1	53.7	44.4	77.3	22.1	68.6	30.9
MCF-7	Kontrol	93.8	6.2	81.2	18.5	77.3	20.2	88.6	11.0	79.8	19.9
Ko-Kültür	Kontrol	89.6	10.4	89.4	10.3	42.7	56.1	65.8	33.3	54.8	44.2
	Tamoksifen IC_{50}	94.1	5.9	80.6	19.2	80.1	18.7	87.0	12.6	78.4	21.1
	Essitalopram Oksalat IC_{50}	97.2	2.8	88.7	11.1	83.8	15.6	88.9	10.6	87.7	12.1

Akış sitometri cihazı kullanılarak alınan ölçümlerin sonuçlarına THP-1 kontrol grubunda IL-1β seviyesi %3.8 iken, 100 ng/mL LPS uygulanması sonucunda %42.4'e çıkmış ve 11.15 kat artmıştır. MCF-7 kontrol grubunda ise IL-1β seviyesi %6.2 iken ko-kültür modelinde ise kontrol grubu %10.4'e çıkmış ve 1.67 kat artmıştır. Tamoksifen ile muamele edilen ko-kültür modelinde IL-1β seviyesi %5.9'a düşerek ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 1.76 kat azalmıştır. Essitalopram oksalat ile muamele edilen ko-kültür modelinde ise IL-1β seviyesi %2.8'e kadar düşmüş, ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 3.71 kat azalmıştır (Tablo 5.8) (Şekil 5.13).



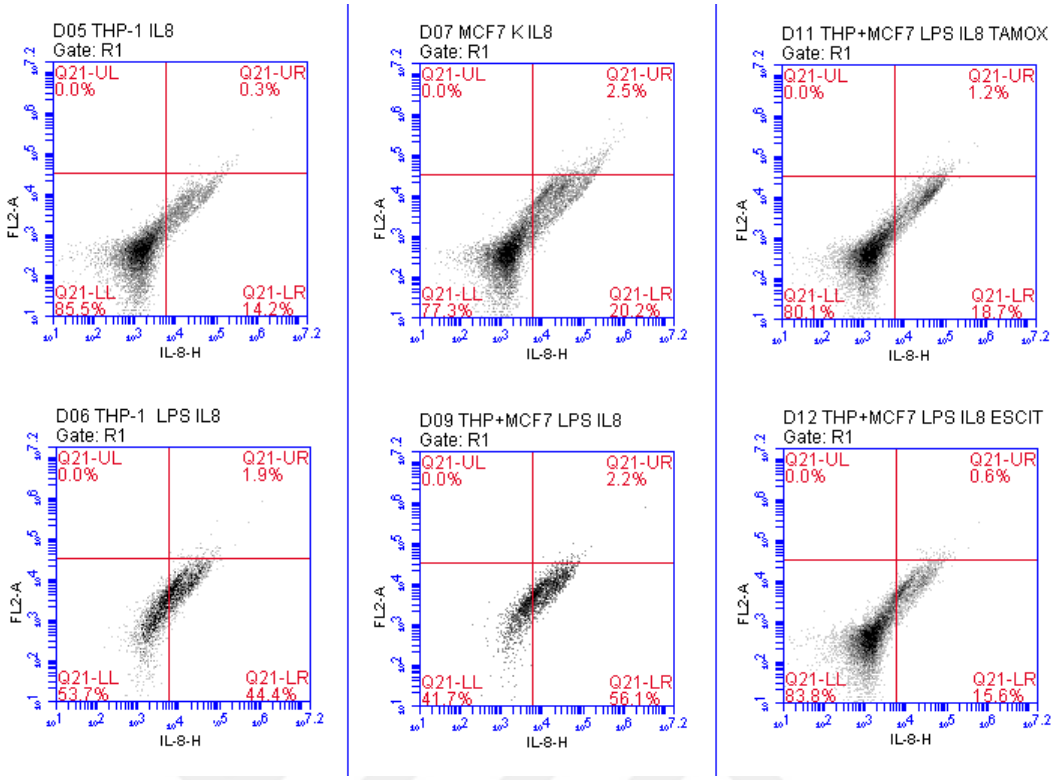
Şekil 5.13. *MCF-7 ko-kültür modelinde IL-1β seviyeleri*

THP-1 hücrelerinin kontrol grubundan alınan ölçümlerde IL-6 seviyesi %7.7 iken, 100 ng/mL LPS uygulanması sonucunda IL-6 seviyesi %20.1'e çıkmış ve 2.61 kat artmıştır. MCF-7 kontrol grubunda ise IL-6 seviyesi %18.5 iken ko-kültür modelinde ise kontrol grubu %10.3'e düşmüş ve 1.79 kat azalmıştır. Tamoksifen ile muamele edilen ko-kültür modelinde IL-6 seviyesi %19.2'ye yükselerek ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 1.86 kat artmıştır. Essitalopram oksalat ile muamele edilen ko-kültür modelinde ise IL-6 seviyesi %11.1'e kadar artmış, ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 1.07 kat artmıştır (Tablo 5.8) (Şekil 5.14).



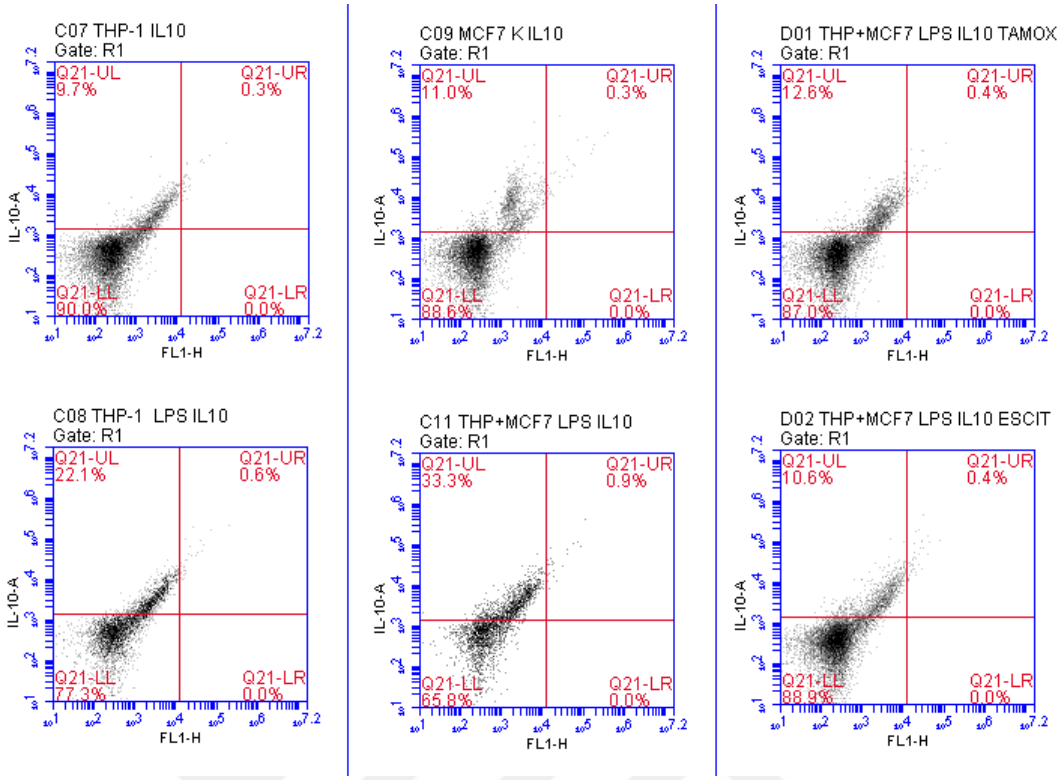
Şekil 5.14. *MCF-7 ko-kültür modelinde IL-6 seviyeleri*

Akış sitometri cihazı kullanılarak alınan ölçümlerin sonuçlarına göre THP-1 hücrelerinin kontrol grubundan alınan ölçümlerde IL-8 seviyesi %14.2 iken, 100 ng/mL LPS uygulanması sonucunda IL-8 seviyesi %44.4'e çıkmış ve 3.12 kat artmıştır. MCF-7 kontrol grubunda ise IL-8 seviyesi %20.2 iken ko-kültür modelinde ise kontrol grubu %56.1'e yükselerek 2.77 kat artmıştır. Tamoksifen ile muamele edilen ko-kültür modelinde IL-8 seviyesi %18.7'ye düşerek ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 3 kat azalmıştır. Essitalopram oksalat ile muamele edilen ko-kültür modelinde ise IL-8 seviyesi %15.6'e kadar düşmüş, ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 3.59 kat azalmıştır (Tablo 5.8) (Şekil 5.15).



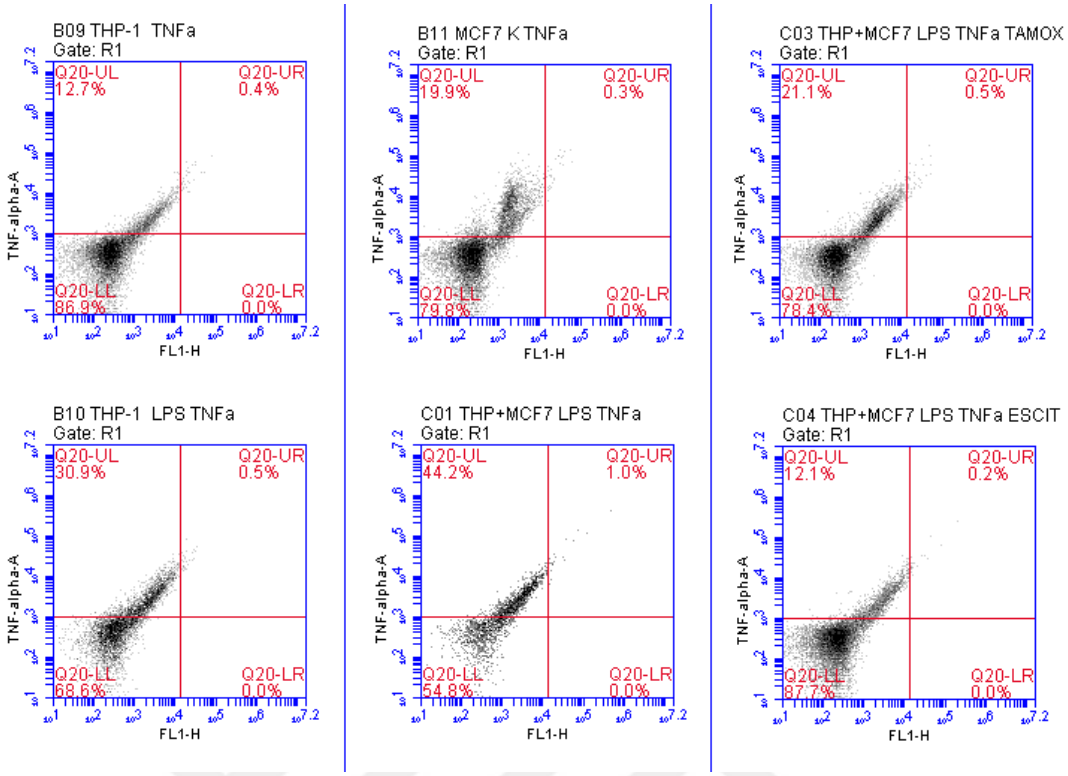
Şekil 5.15. *MCF-7 ko-kültür modelinde IL-8 seviyeleri*

THP-1 kontrol grubunda IL-10 seviyesi %9.7 iken, 100 ng/mL LPS uygulanması sonucunda %22.1'e çıkmış ve 2.27 kat artmıştır. MCF-7 kontrol grubunda ise IL-10 seviyesi %11.0 iken ko-kültür modelinde ise kontrol grubu %33.3'e çıkmış ve 3.02 kat artmıştır. Tamoksifen ile muamele edilen ko-kültür modelinde IL-10 seviyesi %12.6'a düşerek ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 2.64 kat azalmıştır. Essitalopram oksalat ile muamele edilen ko-kültür modelinde ise IL-10 seviyesi %10.6'ya kadar düşmüş, ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 3.14 kat azalmıştır (Tablo 5.8) (Şekil 5.16).



Şekil 5.16. *MCF-7 ko-kültür modelinde IL-10 seviyeleri*

Akış sitometri cihazı kullanılarak alınan ölçümlerin sonuçlarına göre THP-1 hücrelerinin kontrol grubundan alınan ölçümlerde TNF-α seviyesi %12.7 iken, 100 ng/mL LPS uygulanması sonucunda TNF-α seviyesi %30.9'a çıkmış ve 2.43 kat artmıştır. MCF-7 kontrol grubunda ise TNF-α seviyesi %19.9 iken ko-kültür modelinde ise kontrol grubu %44.2'ye yükselmiş ve 2.22 kat artmıştır. Tamoksifen ile muamele edilen ko-kültür modelinde TNF-α seviyesi %21.1'e düşerek ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 2.09 kat azalmıştır. Essitalopram oksalat ile muamele edilen ko-kültür modelinde ise TNF-α seviyesi %12.1'e kadar düşmüş, ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 3.65 kat azalmıştır (Tablo 5.8) (Şekil 5.17).



Şekil 5.17. *MCF-7 ko-kültür modelinde TNF-α seviyeleri*

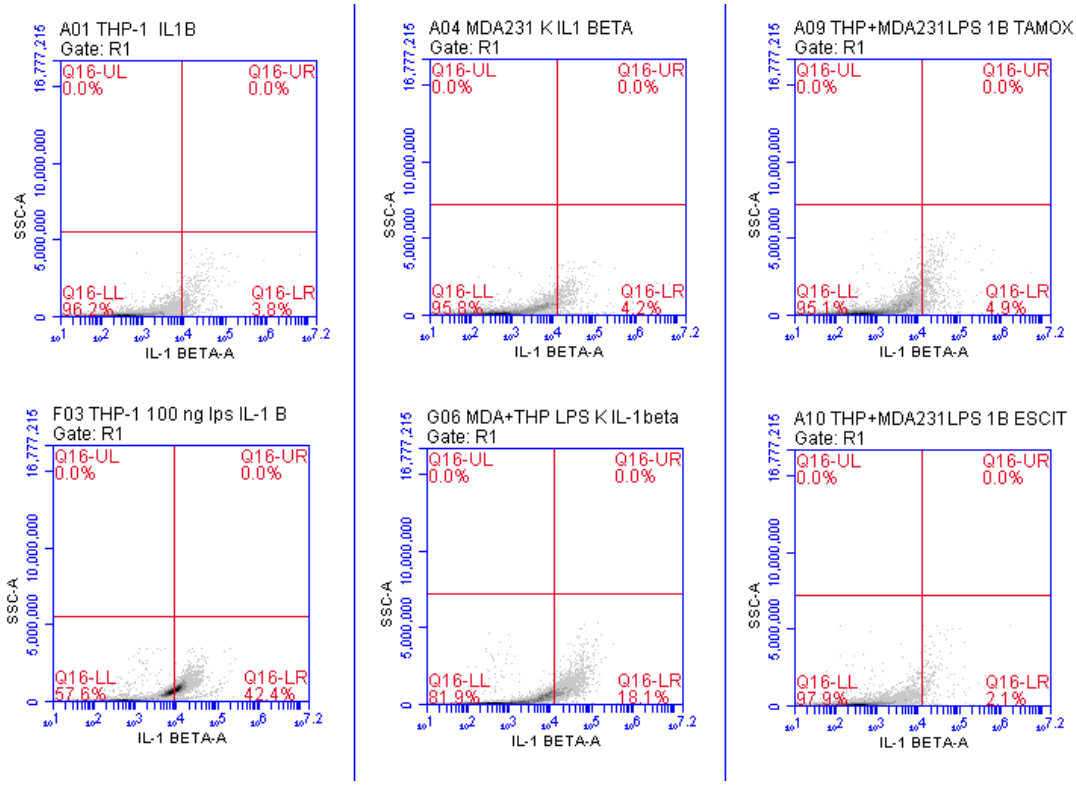
MDA-MB-231 ko-kültür modelinde tamoksifen ve essitalopram oksalatın immünolojik etkilerini anlamak için BD Accuri C6 Flow Cytometer cihazı kullanılarak alınan ölçümler tablo 5.9'da gösterilmektedir.

Tablo 5.9. *MDA-MB-231ko-kültür modelinde IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF-α sonuçları*

		IL-1β		**IL-6**		**IL-8**		**IL-10**		**TNF-α**	
Hücreler	**Maddeler**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**
		(-)	**(+)**	**(-)**	**(+)**	**(-)**	**(+)**	**(-)**	**(+)**	**(-)**	**(+)**
THP-1	Kontrol	96.2	3.8	91.1	7.7	85.5	14.2	90.0	9.7	86.9	12.7
	100 ng/mL LPS	57.6	42.4	76.4	20.1	53.7	44.4	77.3	22.1	68.6	30.9
MDA-MB-231	Kontrol	95.8	4.2	93.3	6.4	81.8	17.9	93.4	6.3	92.4	7.4
Ko-Kültür	Kontrol	81.9	18.1	90.3	9.4	32.0	66.7	67.5	31.5	49.3	48.6
	Tamoksifen IC_{50}	95.1	4.9	85.9	13.8	83.1	16.3	89.4	10.3	75.5	24.0
	Essitalopram Oksalat IC_{50}	97.9	2.1	83.7	15.9	82.8	16.2	90.8	8.8	87.9	11.8

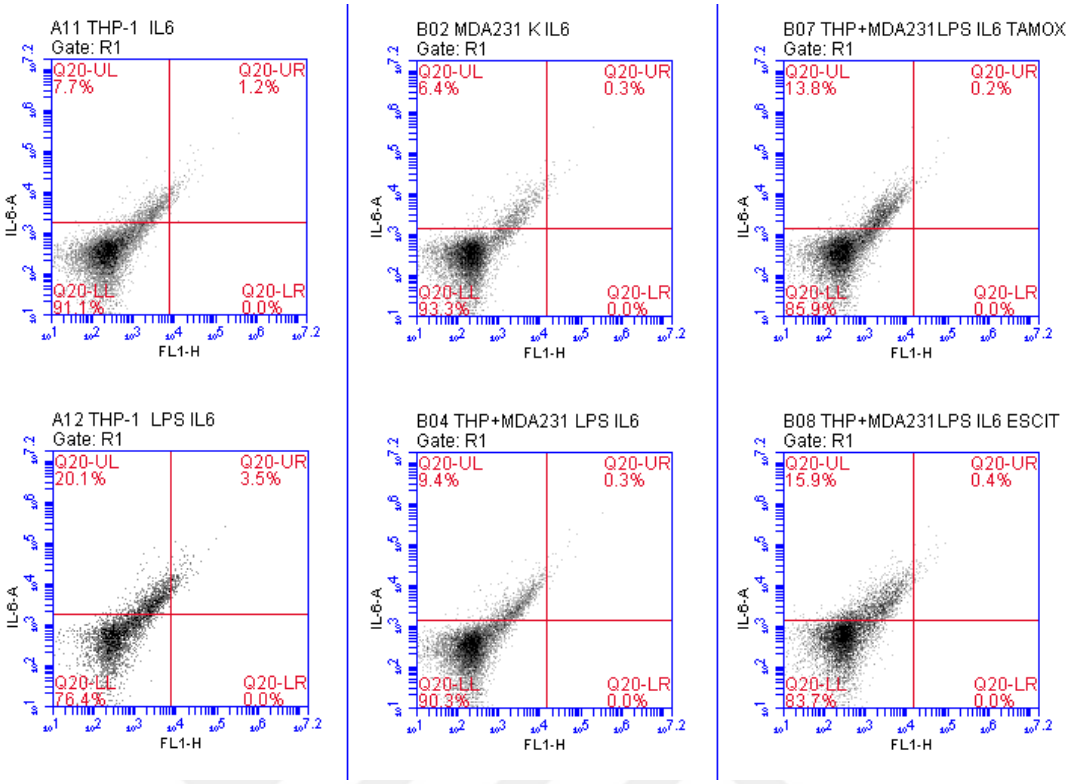
Akış sitometri cihazı kullanılarak alınan ölçümlerin sonuçlarına THP-1 kontrol grubunda IL-1β seviyesi %3.8 iken, 100 ng/mL LPS uygulanması sonucunda %42.4'e

çıkmış ve 11.15 kat artmıştır. MDA-MB-231 kontrol grubunda ise IL-1β seviyesi %4.2 iken ko-kültür modelinde ise kontrol grubu %18.1'e çıkmış ve 4.3 kat artmıştır. Tamoksifen ile muamele edilen ko-kültür modelinde IL-1β seviyesi %4.9'a düşerek ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 3.7 kat azalmıştır. Essitalopram oksalat ile muamele edilen ko-kültür modelinde ise IL-1β seviyesi %2.1'e kadar düşmüş, ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 8.61 kat azalmıştır (Tablo 5.9) (Şekil 5.18).



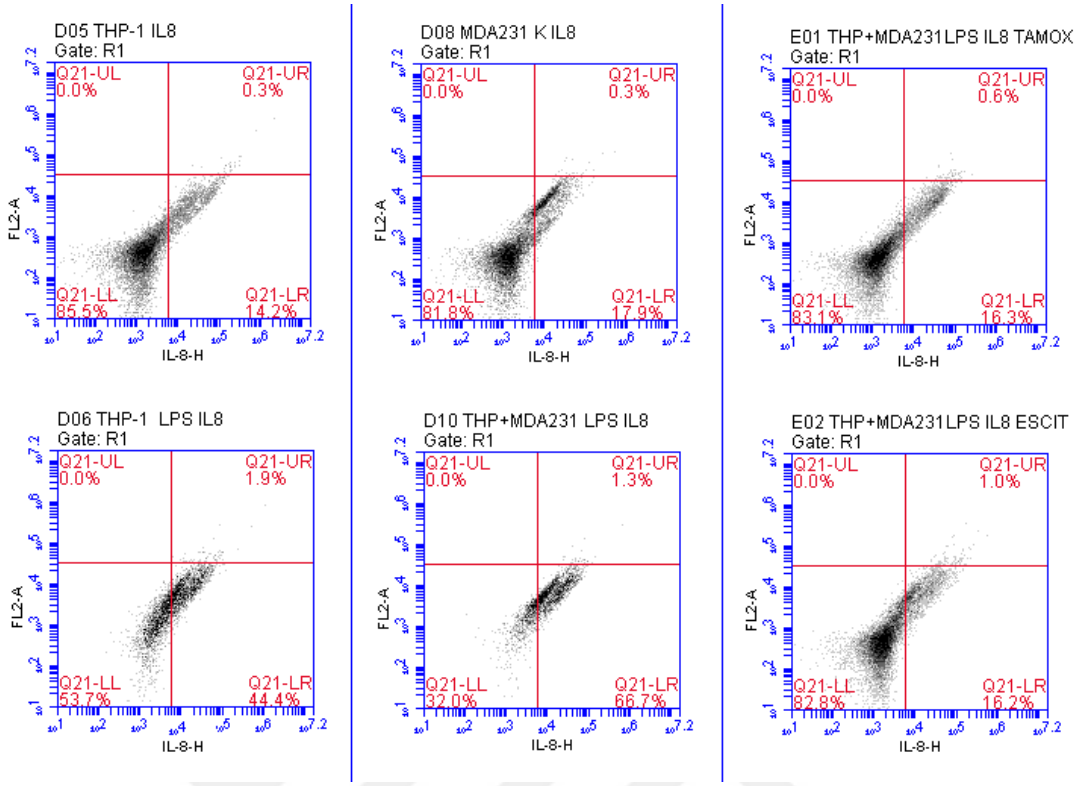
Şekil 5.18. *MDA-MB-231 ko-kültür modelinde IL-1β seviyeleri*

THP-1 hücrelerinin kontrol grubundan alınan ölçümlerde IL-6 seviyesi %7.7 iken, 100 ng/mL LPS uygulanması sonucunda IL-6 seviyesi %20.1'e çıkmış ve 2.61 kat artmıştır. MDA-MB-231 kontrol grubunda ise IL-6 seviyesi %6.4 iken ko-kültür modelinde ise kontrol grubu %9.4'e düşmüş ve 1.46 kat azalmıştır. Tamoksifen ile muamele edilen ko-kültür modelinde IL-6 seviyesi %13.8'e yükselerek ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 1.46 kat artmıştır. Essitalopram oksalat ile muamele edilen ko-kültür modelinde ise IL-6 seviyesi %15.9'a kadar yükselmiş, ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 1.7 kat artmıştır (Tablo 5.9) (Şekil 5.19).



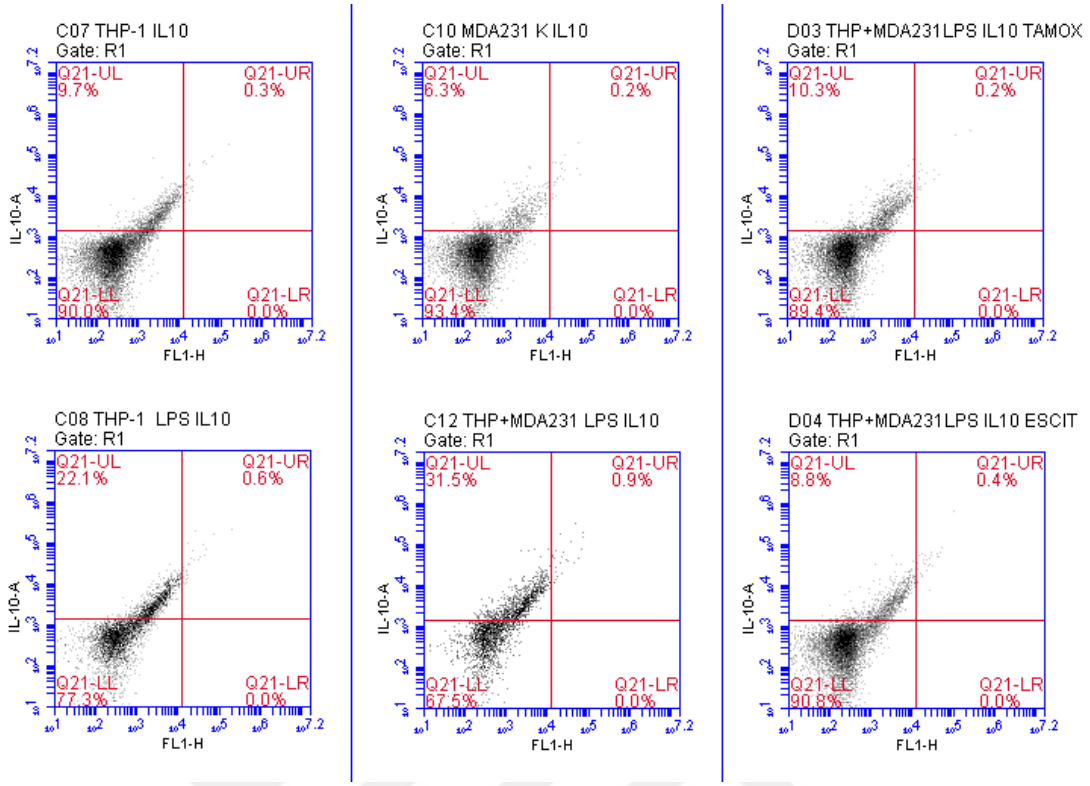
Şekil 5.19. *MDA-MB-231 ko-kültür modelinde IL-6 seviyeleri*

Akış sitometri cihazı kullanılarak alınan ölçümlerin sonuçlarına göre THP-1 hücrelerinin kontrol grubundan alınan ölçümlerde IL-8 seviyesi %14.2 iken, 100 ng/mL LPS uygulanması sonucunda IL-8 seviyesi %44.4'e çıkmış ve 3.12 kat artmıştır. MDA-MB-231 kontrol grubunda ise IL-8 seviyesi %17.9 iken ko-kültür modelinde ise kontrol grubu %66.7'ye yükselerek 3.72 kat artmıştır. Tamoksifen ile muamele edilen ko-kültür modelinde IL-8 seviyesi %16.3'e düşerek ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 4.09 kat azalmıştır. Essitalopram oksalat ile muamele edilen ko-kültür modelinde ise IL-8 seviyesi %16.2'ye kadar düşmüş, ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 4.11 kat azalmıştır (Tablo 5.9) (Şekil 5.20).



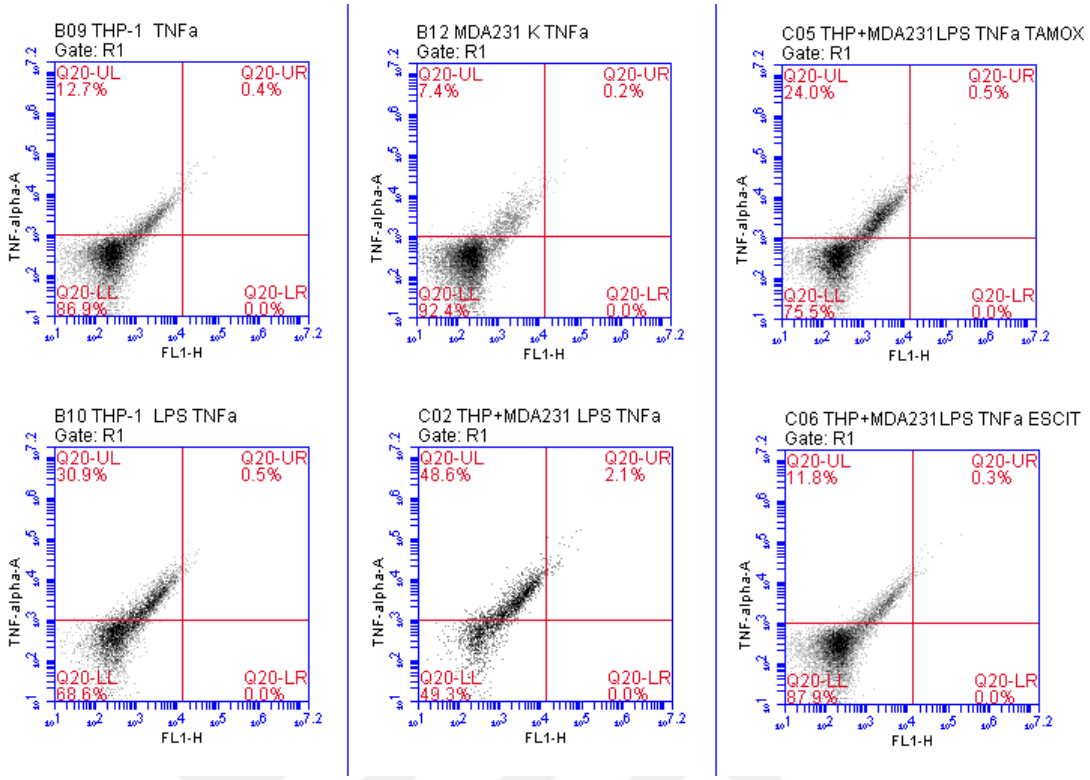
Şekil 5.20. *MDA-MB-231 ko-kültür modelinde IL-8 seviyeleri*

THP-1 kontrol grubunda IL-10 seviyesi %9.7 iken, 100 ng/mL LPS uygulanması sonucunda %22.1'e çıkmış ve 2.27 kat artmıştır. MDA-MB-231 kontrol grubunda ise IL-10 seviyesi %6.3 iken ko-kültür modelinde ise kontrol grubu %31.5'e çıkmış ve 5 kat artmıştır. Tamoksifen ile muamele edilen ko-kültür modelinde IL-10 seviyesi %10.3'e düşerek ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 3.05 kat azalmıştır. Essitalopram oksalat ile muamele edilen ko-kültür modelinde ise IL-10 seviyesi %8.8'e kadar düşmüş, ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 3.57 kat azalmıştır (Tablo 5.9) (Şekil 5.21).



Şekil 5.21. *MDA-MB-231 ko-kültür modelinde IL-10 seviyeleri*

Akış sitometri cihazı kullanılarak alınan ölçümlerin sonuçlarına göre THP-1 hücrelerinin kontrol grubundan alınan ölçümlerde TNF-α seviyesi %12.7 iken, 100 ng/mL LPS uygulanması sonucunda TNF-α seviyesi %30.9'a çıkmış ve 2.43 kat artmıştır. MDA-MB-231 kontrol grubunda ise TNF-α seviyesi %7.4 iken ko-kültür modelinde ise kontrol grubu %48.6'ya yükselmiş ve 6.56 kat artmıştır. Tamoksifen ile muamele edilen ko-kültür modelinde TNF-α seviyesi %24.0'a düşerek ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 2.03 kat azalmıştır. Essitalopram oksalat ile muamele edilen ko-kültür modelinde ise TNF-α seviyesi %11.8'e kadar düşmüş, ko-kültür modeli kontrol grubuna göre 4.11 kat azalmıştır (Tablo 5.9) (Şekil 5.22).



Şekil 5.22. *MDA-MB-231 ko-kültür modelinde TNF-α seviyeleri*

Yapılan çalışmalarda; THP-1 hücre hattından üretilen monositler ve makrofajlar üzerindeki gıda bileşiklerinin iltihaplanma ile ilişkili bağışıklık tepkilerini inceleyen Chanput ve diğerleri bunun için THP-1 hücrelerini 100 ng/mL PMA ile makrofajlara dönüştürmüş ve monosit halde olan THP-1 hücrelerini de kontrol amaçlı kullanmışlardır. Çalışma için hem makrofajlara farklılaşan hem de monosit halde olan THP-1 hücrelerini 3 ila 6 saat 1 µg/mL LPS ile stimüle etmişlerdir. Daha sonra inflamasyonla ilişkili sitokinler olan IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF-α seviyelerini analiz etmişlerdir. THP-1 hücrelerinin LPS ile uyarılması sonucu IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF-α seviyelerinde çarpıcı bir artış görülmüştür. IL-8 hem THP-1 monositlerine hem de makrofajlarında süpernatanda en baskın olan sitokin olarak ölçülmüştür. Monositlerden TNF-α ve IL-10 dışında analiz edilen bütün sitokinler inkübasyon süresi boyunca birikmeye devam etmiştir (Chanput vd., 2010).

IL-1R'nin inhibisyonu ile IL-1β aktivitesinin bloke edilmesinin meme kanseri kemik metastazı üzerindeki etkilerini araştıran Holen ve diğerleri, anakinra ile IL-1R sinyalleşmesini bloke ederek IL-1β'nın işlevsel rolünü araştırmıştır. Bunun için 6 haftalık dişi farelere MDA-MB-231-IV ya da MCF-7 hücre enjeksiyonu yapılmıştır.

Enjeksiyondan sonra günde bir kere 1mg/kg anakinra, enjeksiyondan 3 gün önce önleyici olarak plesebo veya 7 gün sonrasında tedavi amaçlı uygulanmıştır. Anakinra'nın kemik üzerindeki etkileri IL-1β, TNF-α, IL-6 ELISA ile ölçülmüştür. Çalışmalar sonucunda anakinra uygulamasının IL-1R sinyalleşmesinin bloke edici aktivitesi sayesinde 24 saat sonunda IL-1β konsantrasyonunun %50 azaldığı, TNF-α konsantrasyonunun 4 saat sonra %80 azalıp, 24 saat sonunda taban çizgisine geri döndüğü ve IL-6 konsantrasyonunda ise değişim görülmediği saptanmıştır. Çalışmanın nihai sonucunda ise IL-1R antagonisti olan anakinra'nın günlük uygulamasının göğüs kanseri kemik metastazını önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (Holen vd., 2016).

Meme kanseri metastazının birincil anatomik bölgesi olan kemik, mezenkimal kök hücreler (MSC) bakımından baskın bir hücre popülasyonuna sahiptir. Sasser ve diğerleri MSC'lerin ER+ (MCF-7) ve ER- (MDA-MB-231) insan meme kanseri hücre hatları üzerindeki etkilerini incelemiştir. Yaptıkları çalışmalarda ER+ hücre hatları (MCF-7)'nın IL-6 seviyeleri saptanamamışken, ER- hücre hatlarının (MDA-MB-231, 2067 pg/mL) IL-6 seviyeleri ölçülmüştür. hMSC'in ortalama 3-7 ng/mL IL-6 ürettiği için 5 ng/mL IL-6 varlığında MCF-7'nin büyüme oranını değerlendiren Sasser ve diğerleri, tek başına IL-6'nın ortama eklenmesi ile hücre büyümesinin arttığını ancak 100 pg/mL ya da altındaki IL-6 konsantrasyonunun büyümeyi etkilemediğini bulmuştur (Sasser vd., 2007).

Yaşlanmanın tümör hücrelerinde metastaza neden olabileceğine dair kanıtlardan yola çıkan Ortiz-Montero ve diğerleri, yaşlanma ile ilişkili bir inflamatuar ortamın meme kanseri hücrelerinde tümörijenik ve farklılaşma potansiyelini etkileyip etkilemediğini araştırmıştır. IL-6 ve IL-8'in agresif meme kanseri hücre hatları tarafından (MDA-MB-231) salgılanmasını baz alarak bu sitokinleri salgılamayan MCF-7 hücrelerini kullanmışlardır. Bunun için MCF-7 hücrelerini yaşlanma koşullu ortamda (SCM) IL-6 ya da IL-8 ile işleme tabii tutmuş ve EMT yolizi açısından değerlendirmişlerdir. Ayrıca SCM'de geliştirilen ve geliştirilmeyen MCF-7 hücre hatlarının süpernatanlarından IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α miktarları BD Cytometric Bead Array kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda SCM'nin kanser ilerlemesinde rol oynayan IL-6 ve IL-8 bakımından oldukça zengin olduğu görülmüştür (Ortiz-Montero vd., 2017).

Meme kanseri hastalarında serum IL-12 ve IL-8 düzeylerinin önemini araştıran Derin ve diğerleri yapmış oldukları çalışmalara patolojik olarak doğrulanmış göğüs karsinomu olan 48 hastayı dahil etmişlerdir. 21 sağlıklı kişi kontrol grubu olarak kaydedilmiş ve hastaların serum örnekleri başlangıçta ve kemoterapi sonrasında alınarak kaydedilmiştir.

Alınan kan örnekleri solid faz sandviç ELIZA deneyi sonunda ELIZA okuyucu (Rayto, RT-1904C) ile ölçülmüş ve sonuçlar pg/mL olarak ifade edilmiştir. Deney sonuçlarında kontrol grupları ise meme karsinomalı hastalar arasında IL-8 seviyelerinde anlamlı farklılıklar görülmemiştir. Hastalarda IL-8 seviyesi ortalama 32.4 pg/mg iken, kontrol grubunda bu değer 35 pg/mg ($p=0.365$) olarak ölçülmüştür ve kemoterapi sonrası hastalardaki bu değer 36 pg/mg ($p=0.124$) olarak ölçülmüştür ancak anlamlı bir değer elde edilememiştir. Bunun yanında elde edilen verilerde sadece IL-8 düzeyleri metastatik olan hasta grubunda daha yüksek ölçülmüştür ($p=0.047$) (Derin vd., 2007).

Meme kanseri hastalarının kan serumlarındaki IL-6, IL-8 ve IL-10 konsantrasyonunu, hastalığın ilerlemesi ile ilişkisini inceleyen Kozowski ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada 45 kadın hastayı ve kontrol grubu olarak 25 sağlıklı kadını analiz etmişlerdir. Serum örneklerinde IL-6, IL-8 ve IL-10 konsantrasyonları ELISA'lar ile belirlenmiş olup, elde edilen verilere göre IL-6 serum konsantrasyonu hastalarda kontrol grubuna oranla %86.7, IL-8 %80 ve IL-10 %77.8 oranında artmıştır. Ancak istatistiksel anlamlılık sadece IL-6'da görülmüş olup, IL-8 ve IL-10 serum konsantrasyonları hastalığın evresi ile anlamlı bir şekilde ilişkilendirilememiştir. Yine de elde edilen veriler sonucunda IL-6, IL-8 ve IL-10 seviyelerinin yüksekliği ile meme kanserinin klinik evresinin ilişkili olduğunu ve IL-10'un hem immün hücresel tip yanıtı hem de IL-6 IL-8 üretebilen ve malignitenin ilerlemesine yol açan çok fonksiyonlu bir sitokin olduğu ve ilerlemiş meme kanseri hastalarında IL-6, IL-8 ve IL-10 serum konsantrayonunun artmış olduğunu görmüşlerdir (Kozlowski vd., 2003).

MILLIPLEX test kiti kullanarak 41 sitokin seviyesini Milliplex Analiz 5.1 kullanarak analiz eden Chen ve diğerleri bu deneyler için MDA-MB-231, MCF-7, MCF-10A, T-47D ve BT-474 hücre hatlarını kullanmıştır. Elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda MCF-7 için IL-1β seviyesi <2.770 pg/mL, IL-6 seviyesi <2.280 pg/mL, IL-8 seviyesi <1.750 pg/mL, IL-10 seviyesi 1.080 pg/mL ve TNF-α seviyesi <2.560 pg/mL ölçülürken, MDA-MB-231 için IL-1β seviyesi <2.770 pg/mL, IL-6 seviyesi 4583.250 (±119.634), pg/mL IL-8 seviyesi 5568.250 (±291.235) pg/mL, IL-10 seviyesi 9.503 (± 0.792) pg/mL ve TNF-α seviyesi 7.275 (±0.179) pg/mL olarak ölçülmüştür (Chen vd., 2019).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser tedavisi ve süreci hastalar için yıpratıcı bir süreç olup, çoğunlukla tedavi sonrası dönemlerde depresyon görülmektedir. Yapılan araştırmalar meme kanserine yakalanan hastaların yaklaşık dörtte birinde tanıdan sonraki dönemde depresyon görüldüğünü desteklemektedir. Meme kanseri, dünyada özellikle kadınlar arasında görülen ve görülme sıklığı açısından değerlendirildiğinde en sık karşılaşılan ikinci kanser türünü oluşturmaktadır.

Depresyonun tedaviyi olumsuz etkileyebileceğine, fiziksel semptomları arttırabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Tüm bunlar göz önüne alındığında, tedavi ve sonrasını takip eden dönemlerde hastalara antidepresan tedavisinin uygulanması gerekebilmektedir. Yapılan çalışmalarda birçok antidepresan türünün farklı kanser türlerine karşı göstermiş olduğu etkiler araştırılmıştır. Tez kapsamında yapmış olduğumuz bu çalışmada SSRI grubunda olan essitalopram oksalat'ın meme kanseri ko-kültür modelindeki sitotoksik, apoptotik ve immünolojik etkilerini araştırdık.

GR- bakterilerin hücre duvarı bileşini olan LPS'nin monosit ve makrofaj hücrelerinde çeşitli sitokinlerin salgılanmasını sağladığı yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. Biz de bu tez çalışmasında ko-kültür modeli oluşturmak için THP-1 insan monositik lösemi hücre hattını *E.coli* LPS'si ile stimüle ederek çeşitli sitokinlerin (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α) salgılanmasını sağladık.

Meme kanseri hücre ko-kültür modelini oluştururken hem ER+ hem de ER- meme kanseri hücre hatlarını kullanıp, farklı östrojen reseptörüne sahip meme kanseri hücre hatlarının essitalopram oksalata karşı göstermiş oldukları etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirdik. Bunun için ER+ meme kanseri hücre hattı olarak MCF-7 ve ER- meme kanseri hücre hattı olarak MDA-MB-231 hücre hattını deneylerimizde kullandık.

Yapılan literatür taramalarında MDA-MB-231 hücre hattının ER-, PR- ve HER2- olması nedeniyle TNBC olarak adlandırıldığı ve bu nedenle ER+, PR+ ve HER2- meme kanseri hücre hattı olan MCF-7'ye oranla çok daha agresif bir yapıda olduğu görülmektedir. Bu farklılıklarından yola çıkarak tercih ettiğimiz iki farklı meme kanseri hücre hattı ile oluşturduğumuz meme kanseri ko-kültür modellerini, hem essitalopram oksalata hem de pozitif kontrol olarak kullandığımız tamoksifene karşı vermiş oldukları sitokin yanıtlarını karşılaştırdık.

Tamoksifenin özellikle MCF-7 gibi ER+ yapıdaki meme kanseri türlerinde tercih edilen bir kemoterapötik olması, MDA-MB-231 gibi ER- hücrelerin vereceği yanıtı

değerlendirmek açısından önemli bir tercihti. Bu sayede farklı östrojen reseptörlerine sahip meme kanseri hücre hatlarının tamoksifene karşı vermiş oldukları tepkileri de değerlendirmiş olmaktayız.

Maddelerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini araştırmak için öncelikli olarak MTT testi (MCF-7 ve MDA-MB-231 için) ve MTS testi (THP-1) kullanılmıştır. MTT testleri MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için konsantrasyon aralığı belirlenmesi amaçlı yapılmış olup, sitotoksisite sonuçlarından elde ettiğimiz IC_{50} değerlerini xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi RTCA DP kullanarak belirledik. MTT ve MTS deneyleri sırasında paralelliği korumak için bütün hücreler aynı konsantrasyon aralığında maddelerle muamele edilmiş, RTCA DP'de ise MTT deney sonuçları göz önüne alınarak MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde uygun ve aynı konsantrasyonlar aralığında deney kurulmuştur.

Elde ettiğimiz MTT sonuçlarına göre MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri hem essitalopram oksalat hem de tamoksifen için 125-3.90625 µM aralığında anlamlı sonuçlar vermiş olup, RTCA DP'de tamoksifen için 125-3.90625 µM aralığında, essitalopram oksalat için ise 30-7.5 µM konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. RTCA DP ile elde edilen sonuçlar RTCA DP Software 1.2.1 programı tarafından otomatik olarak hesaplanmış olup tamoksifen için MCF-7'nin IC_{50} değeri 54.6 µM, essitalopram oksalat için IC_{50} değeri ise 13.7 µM olarak bulunmuştur. MDA-MB-231 hücrelerinde ise tamoksifenin IC_{50} değeri 58.4 µM ve essitalopram oksalatın IC_{50} değeri 10.9 µM olarak hesaplanmıştır.

Tamoksifen ve essitalopram oksalat ile yapılan RTCA DP sonuçlarına göre, tamoksifen MCF-7 hücrelerinde MDA-MB-231 hücrelerine oranla daha sitotoksik iken, essitalopram oksalatın MDA-MB-231 hücrelerinde daha sitotoksik olduğunu gördük.

MTT testleri ile elde edilen sonuçlara göre Hassan ve diğerleri tamoksifenin MCF-7 için IC_{50} değerini 4.509 µg/mL (Hassan vd., 2018), Kamaludin ve diğerlerinin yaptığı çalışmalarda 30 µM (Kamaludin vd., 2013), Li ve diğerleri 7.29 µM (Li vd., 2018), Mutee ve diğerleri 11.84 µg/mL (Mutee vd., 2012), Seeger ve diğerleri 27 µM ve MDA-MB-231 için 18 µM (Seeger vd., 2003), yine Petinari ve diğerleri MCF-7 için 12.59 µM (Petinari vd., 2004), Rajput ve diğerleri MCF-7 için 9.06±0.29 µM ve MDA-MB-231 için 13.05±0.91 µM (Rajput vd., 2013), Nigjeh ve diğerleri MDA-MB-231 için 8.35±1.41 µg/mL (Nigjeh vd., 2018) olarak bulmuştur. Görüldüğü üzere IC_{50} değerleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bunun nedeninin hücre kültürü çalışmalarında deneyleri

etkileyen hücre pasajı, kültür ve stoklama koşulları gibi nedenler olduğunu düşünmekteyiz. Bizim de her iki hücre hattı için de elde ettiğimiz IC_{50} değerleri literatür de karşılaştığımız sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Literatür taramalarında Xu ve diğerlerinin çalışmalarında tamoksifenin MCF-7 ile yapılan RTCA DP çalışmalarında 10^{-7} M konsantrasyonu tedavide önemli bir fark yaratmazken, daha yüksek konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerini büyümesini inhibe ettiği görülmüştür (Xu vd., 2019). Yetkin doktora tezinde yapmış olduğu RTCA DP çalışmasında, MCF-7 hücrelerinin tamoksifen için IC_{50} değerinin 22 µM olduğunu görmüştür (Yetkin, 2019). Cansaran-Duman ve diğerleri ise MDA-MB-231 hücre hattını kullanarak yapmış oldukları RTCA DP'de tamoksifenin IC_{50} değerini 1.26E-05M olarak bulmuştur (Cansaran-Duman vd., 2020). xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi oldukça güvenilir, saatlik veri üretebilen ve pahalı bir sistemdir. Bu nedenle literatürde bu sistem kullanılarak yapılmış deney sonuçlarına rastlamak çok mümkün olmamaktadır.

Literatür taramalarında tamoksifenin düşük dozlarda etkili olduğu görülmektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada tamoksifenin MCF-7 üzerindeki sitotoksik etkisi MDA-MB-231'den daha fazladır ve 10^{-7} M'dan yüksek konsantrasyonlarda etkili olduğu görülmektedir.

Essitalopram oksalat ile yapılan çalışmalara bakıldığında, literatürde MCF-7 ile çalışmalar bulunmamakla birlikte Arunasree'nin MDA-MB-231 ile yaptığı bir çalışmada essitalopramın IC_{50} değeri 392.24 µM olarak bulmuştur (Arunasree vd., 2010). Elde edilen bu sonuç MTT sitotoksisite testi sonucunda elde edilmiş olup, deney sonuçları anlık olarak değil, 24 saat sonunda değerlendirilmiştir. RTCA DP ile yapmış olduğumuz deneylerde elde ettiğimiz sonuçlar anlık değerlendirmelerle alınıp otomatik olarak hesaplanan değerler olduğundan, daha kesin sonuçlar vermektedir. Essitalopram oksalat'ın meme kanseri hücre hatlarında RTCA DP ile elde edilen herhangi bir sonucuna literatürde rastlanmamıştır.

Yapmış olduğumuz çalışmada IC_{50} değerlerini bulmuş olduğumuz tamoksifen ve essitalopram oksalatın MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini de değerlendirdik. Bunun için AnnexinV-PI boyalarını ve akış sitometri cihazını kullandık. Elde ettiğimiz sonuçları canlı, nekroz, erken ve geç apoptoz (apoptotik hücreler) olarak değerlendirdik. Buna göre tamoksifenin MCF-7 için IC_{50} değerinin apoptotik etkileri canlı, nekroz ve apoptoz sırasıyla %62.0, %5.1 ve %23, MDA-MB-231

için IC_{50} değerinin apoptotik etkileri ise yine sırayla %63.7, %4.5 ve %31.9'dur. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri karşılaştırıldığında, kontrol gruplarına göre canlı hücre ve nekrotik hücreler bakımından hemen hemen aynı iken, apoptotik hücreler MDA-MB-231'de 1.7 kat daha fazladır.

Essitalopram oksalat ile yapılan apoptoz deneyinde ise canlı, nekroz ve apoptotik hücre yüzdeleri MCF-7 hücreleri için sırasıyla %82.5, %4.7 ve % 13.5'dir. MDA-MB-231 için ise sırasıyla %89.6, %8.2 ve %2.2'dir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri karşılaştırıldığında, kontrol gruplarına göre canlı hücreler hemen hemen aynı olup nekrotik hücreler MDA-MB-231 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine göre 2.2 kat fazla ve apoptotik hücreler ise MCF-7'de MDA-MB-231'e göre 2.5 kat daha fazladır.

Tamoksifenin her iki hücrede de nekrotik etkileri (MCF-7 1.4 kat, MDA-MB-231 1.6 kat) çok yüksek olmayıp, apoptotik etkileri MCF-7'de kontrolün 5.9 katı ve MDA-MB-231'de 10.3 katıdır. Essitalopram oksalat ise MCF-7 hücrelerindeki nekrotik etkileri (1.3 kat) yüksek olmayıp MDA-MB-231'de kontrolün 2.8 katı kadardır. Apoptotik etkileri ise MCF-7'de kontrolün 2.5 katı ve MDA-MB-231'de 1.4 katı kadardır. Bu sonuçlara baktığımızda essitalopram oksalatın nekrotik etkileri MCF-7 hücrelerinde tamoksifen ile benzerken, MDA-MB-231 hücrelerinde tamoksifene oranla daha fazladır. Apoptotik etkileri ise MCF-7 ve MDA-MB-231'de tamoksifen kadar etkili değildir.

Nekroz, hücrelerin parçalanması ve membran lipitlerinin ortama saçılması sonucu inflamatuar etkiye sebep olması nedeniyle olmasını istemediğimiz bir durumdur. Apoptozda ise hücreler küçülerek programlı bir şekilde ölür ve bu sayede ortama membran lipitleri saçılmaz ya da inflamatuar yanıt oluşmaz.

Literatür taramalarında Mutee ve diğerlerinin yapmış olduğu çalışmada tamoksifen ile muamele edilen MCF-7 hücrelerindeki apoptotik etki canlı, nekroz/geç apoptoz ve erken apoptoz etkileri sırasıyla %52.2, %5.5 ve %41.3 şeklindedir (Mutee vd., 2012). Yaacob ve diğerlerinin yaptığı çalışmada 24 saat 2.5 µM tamoksifen ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde %27 ve 48 saat sonunda ise %40 apoptoz görülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinde ise 2.5 µM tamoksifenin yaklaşık %11 ve 5 µM tamoksifenin ise %25'e kadar apoptozu indüklediği görülmüştür (Yaacob vd., 2014). Zhang ve diğerlerinin yaptığı çalışmalarda 10^{-8} M tamoksifenden fazla uygulanan tamoksifenin MCF-7 hücrelerinde apoptotik etkiye sahip olduğu, zamana ve konsantrasyona bağlı olarak tamoksifenin apoptozu indüklediği bulunmuştur (Zhang vd., 1999). Salami ve Karami-Tehrani'ye göre MCF-7 hücrelerinde tamoksifen ile muamelede apoptotik etki 24 saatte

pik değerine ulaşmaktadır (Salami ve Karami-Tehrani, 2003). Literatür taramalarında tamoksifenin zamana ve konsantrasyona bağlı olarak apoptotik etkiyi indüklediği, yapılan çalışmalarla desteklenmektedir. Bunun yanında yapılan çalışmalarda tamoksifenin apoptotik etkilerinin yüksek olduğu görülmektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan tamoksifen miktarı (IC_{50}) apoptotik etki göstermiş olup, nekrotik etkisi yüksek değildir.

Oluşturduğumuz ko-kültür modelinde öncelikli olarak THP-1 hücreleri LPS ile stimüle edilmiş ve farklı sitokinlerin ortama salınması sağlanmıştır. Yapılan deneyde THP-1 hücreleri kontrol grubu %3.8 IL-1β, %7.7 IL-6, %14.2 IL-8, %9.7 IL-10 ve %12.7 TNF-α salgılamıştır. 100 ng/mL LPS ile stimüle edildikten sonra IL-1β 11.2 kat artarak %42.4'e, IL-6 2.6 kat artarak %20.1'e, IL-8 3.1 kat artarak %44.4'e, IL-10 2.3 kat artarak %22.1'e ve TNF- α 2.4 kat artarak %30.9'a yükselmiştir.

Literatür taramalarında THP-1 hücrelerini LPS ile stimüle eden Chanput ve diğerleri da IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF-α seviyelerine bakmış, sonuç olarak IL-8 seviyesinin çarpıcı derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır. Bunun yanında, TNF-α ve IL-10 dışındaki sitokinlerin inkübasyon süresi boyunca birikmeye devam ettiğini kaydetmişlerdir (Chanput vd., 2010). Bu verilere bakıldığında, kontrol grubuna kıyasla en fazla salgılanan sitokin IL-1β olmuştur ve diğer bütün sitokinlerin salgılanması LPS stimülasyonu sonrasında artmıştır.

MCF-7 hücreleri kontrol grubu IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF-α'yı sırasıyla %6.2, %18.5, %20.2, %11.0 ve %19.9 salgılarken ko-kültür modeli kontrol %10.4, %10.3, %56.1, %33.3 ve %44.2 olarak salgılamıştır. Bu verilere göre IL-6 dışındaki bütün sitokinler ko-kültür modelinde artış göstermektedir. Tamoksifenin IC_{50} değeri ile muamele edilen MCF-7 ko-kültür modelinde ise sitokinler sırasıyla %5.9, %19.2, %18.7, %12.6 ve %21.1 şeklinde değişmiştir. Burada da görüldüğü üzere IL-6 dışındaki sitokinler tamoksifen ile muamele edildikten sonra daha az salgılanmıştır. Essitalopram oksalat IC_{50} değeri ile muamele edilen MCF-7 ko-kültür modelinde ise sitokinler sırasıyla %2.8, %11.1, %15.6, %10.6 ve %12.1 olarak ölçülmüştür. Ko-kültür kontrol grubuna göre IL-6 dışındaki sitokinlerde azalma söz konusudur.

MCF-7 ko-kültür modelinde essitalopram oksalat ve tamoksifeni karşılaştırdığımız zaman tamoksifen IL-1β'nın salgılanmasını 1.76 kat azaltırken essitalopram oksalat 3.71 kat azaltmıştır. IL-6 seviyesi ise tamoksifen ile muamele edildikten sonra 1.86 kat artarken essitalopram oksalat ile muamele edildikten sonra 1.07 kat artmıştır. IL-8

seviyesi tamoksifen ile tedaviden sonra 3 kat azalırken essitalopram ile tedaviden sonra 3.59 kat azalmıştır. IL-10 seviyesi tamoksifen ile muameleden sonra 2.64 kat ve essitalopram oksalat ile muameleden sonra 3.14 kat azalmıştır. TNF-α seviyesi ise tamoksifenden sonra 2.09 kat azalırken essitalopram oksalat ile muameleden sonra 3.65 kat azalmıştır. Tüm bu verilere bakıldığında MCF-7 hücrelerinde essitalopram oksalatın tamoksifene oranla IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF-α'yı daha iyi inhibe ettiği yani anti-inflamatuar etki gösterdiği görülmektedir.

MDA-MB-231 hücreleri kontrol grubu IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF-α'yı sırasıyla %4.2, %6.4, %17.9, %6.3 ve %7.4 salgılarken ko-kültür modeli kontrol %18.1, %9.4, %66.7, %31.5 ve %48.6 olarak salgılamıştır. Bu verilere göre bütün sitokinler ko-kültür modelinde artış göstermektedir. Tamoksifenin IC_{50} değeri ile muamele edilen MDA-MB-231 ko-kültür modelinde ise sitokinler sırasıyla %4.9, %13.8, %16.3, %10.3 ve %24.0 şeklinde değişmiştir. Görüldüğü üzere IL-6 dışındaki sitokinler tamoksifen ile muamele edildikten sonra daha az salgılanmıştır. Essitalopram oksalat IC_{50} değeri ile muamele edilen MDA-MB-231 ko-kültür modelinde ise sitokinler sırasıyla %2.1, %15.9, %16.2, %8.8 ve %11.8 olmuştur. Ko-kültür kontrol grubuna göre IL-6 dışındaki sitokinlerde yine azalma söz konusudur.

MDA-MB-231 ko-kültür modelinde essitalopram oksalat ve tamoksifeni karşılaştırdığımız zaman tamoksifen IL-1β'nın salgılanmasını 3.7 kat azaltırken essitalopram oksalat 8.61 kat azaltmıştır. IL-6 seviyesi ise tamoksifen ile muamele edildikten sonra 1.46 kat artarken essitalopram oksalat ile muamele edildikten sonra 1.7 kat artmıştır. IL-8 seviyesi tamoksifen ile tedaviden sonra 4.09 kat azalırken essitalopram ile tedaviden sonra 4.11 kat azalmıştır. IL-10 seviyesi tamoksifen ile muameleden sonra 3.05 kat ve essitalopram oksalat ile muameleden sonra 3.57 kat azalmıştır. TNF-α seviyesi ise tamoksifenden sonra 2.03 kat azalırken essitalopram oksalat ile muameleden sonra 4.11 kat azalmıştır. Tüm bu verilere bakıldığında MDA-MB-231 hücrelerinde essitalopram oksalatın tamoksifene oranla IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF-α'yı daha iyi inhibe ettiği yani anti-inflamatuar etki gösterdiği görülmektedir.

Literatüre bakıldığında IL-1β aktivitesi bloke edildikten sonra MCF-7 ve MDA-MB-231-IV hücrelerinde IL-1β konsantrasyonu azalmış, TNF-α konsantrasyonu 4 saat sonra azalmış ve tekrar taban çizgisine geri dönmüş, IL-6'da ise bir değişim gözlenmemiştir (Holen vd., 2016). Burada IL-1β'nın meme kanseri hücrelerinde IL-6 ve TNF-α konsantrasyonlarını etkilemediği görülmektedir. Bunun yanında MSC'lerin MCF-

7 ve MDA-MB-231 üzerine etkilerini inceleyen Sasser ve diğerleri MCF-7'de IL-6 seviyesi saptamazken MDA-MB-231'de IL-6 seviyelerini ölçmüştür. Sasser ve diğerleri yaptıkları çalışmada IL-6'nın tek başına hücre büyümesini arttırdığını ancak 100 pg/mL ya da altındaki IL-6'nın büyümeyi etkilemediğini bulmuştur (Sasser vd., 2007). MCF-7 hücrelerini SCM'de IL-6 ya da IL-8 ile işleme tabii tutan Ortiz-Montero ve diğerleri yaptıkları çalışmalar sonunda hem SCM'de geliştirilen hem de geliştirilmeyen MCF-7 hücrelerinin süpernatanlarından IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF-α miktarlarını ölçmüş ve IL-6 ile IL-8'in oldukça zengin olduğunu görmüşlerdir (Ortiz-Montero vd., 2017). Derin ve diğerleri yaptıkları çalışmalarda kemoterapi gören hastalarda IL-8 düzeylerinin metastatik olan hastalarda daha yüksek olduğunu ölçmüşlerdir (Derin vd., 2007). Kozlowski ve diğerlerinin yaptığı çalışmalarda ise IL-6, IL-8 ve IL-10'un yüksekliği ile meme kanserinin klinik evresi ile ilişkili olduğunu görmüşlerdir. Bunun yanında IL-10'un hem immün hücresel tip yanıt ürettiğini hem de IL-6 ve IL-8 üreterek malignitenin ilerlemesine yol açabileceği sonucuna ulaşmışlardır (Kozlowski vd., 2003). Chen ve diğerlerinin yapmış olduğu çalışmada ise MCF-7 hücrelerinde en fazla IL-6 seviyesi ölçülürken MDA-MB-231'de ise en fazla IL-8 seviyesi ölçülmüştür (Chen vd., 2019).

Tümörleri IL-1β üreten hastaların genelde daha kötü prognoza sahip olduğu ve meme kanseri hastalarında yüksek oranda nüks ile korelasyon gösterdiği literatürde geçmektedir. Yapılan çalışmalarda IL-1β ve TNF-α üretiminin bloke edilmesinin tümörü besleyen kan damalarının gelişimini engellediği ve bu sayede de tümör gelişiminin engellendiğine dair veriler bulunmaktadır.

Yapmış olduğumuz ko-kültür çalışmasında tamoksifen ve essitalopram oksalat hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerinde IL-1β salgılanmasını azaltmıştır, ancak essitalopram oksalat IL-1β seviyesini tamoksifene oranla çok daha yüksek oranda azaltmıştır.

IL-6'nın tümör büyümesini desteklediği ve IL-1β ile birlikte östrojen üretimi yoluyla meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu uyardığı hipotezi öne sürülmüştür. Ancak yapılan çalışmalarda ER+ hücrelerde ER- hücrelere oranla daha az IL-6 olduğu görülmüştür. Bunun yanında IL-6'nın hücrelerde yaşlanmaya neden olarak EMT'yi ve bu sayede metastazı indüklediği görülmüştür. IL-6 kanser hücrelerinin daha agresif bir yapıya bürünmesini sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda bunu destekleyen bazı sonuçlar bulunmaktadır. Bunlardan biri de MCF-7 hücrelerinin yaşlanma koşullu ortamda daha

agresif bir özellikler göstermesi ve MCF-7 hücrelerinin bu ortamda salgıladığı IL-6 seviyesinin artmasıdır.

Yapmış olduğumuz deneylerde tamoksifen ve essitalopram oksalat ile hücrelerin tedavisinden sonra ortamdaki IL-6 seviyesinde bir azalma görülmemiştir, aksine tamoksifen essitalopram oksalata oranla daha yüksek oranda IL-6 salgılanmasına sebep olmuştur.

LPS ile stimüle olmuş hücresel yapılar tarafından üretilen IL-8, tümörlerde damarlanmayı indükleyen bir moleküldür ve bu nedenle tümörü teşvik edici özelliği bulunmaktadır. Çoğunlukla ER ve HER2 ekspresyonu ile belirlenen meme kanserlerinde rol oynayan IL-8, yüksek oranda eksprese edilir ve ER+/- her iki meme kanserinde de metastazı arttırmaktadır. Diğer yandan MCF-7 gibi düşük seviyede HER2 eksprese eden meme kanserlerinde, HER2'nin yeniden ekspresyonu daha yüksek IL-8 ekspresyonuna sebep olabilmektedir. Yapılan çalışmalar meme kanserinin klinik evrelerinde IL-8 seviyesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Yaptığımız ko-kültür çalışmasında hem tamoksifen hem de essitalopram oksalat IL-8 seviyesinin azalmasını sağlamıştır. Essitalopram oksalatın etkisi tamoksifene göre daha etkili görünse de aradaki fark çok fazla değildir.

Hücresel bağışıklığın kontrol edilmesinde görevli olan IL-10 meme kanserinde bağışıklığın baskılanmasında rol oynamakla birlikte anti-tümör yanıt oluşturulmasında da rol oynayabilmektedir. Meme kanseri hastalarında sıklıkla artmış IL-10 seviyesi tespit edilmektedir ve yüksek seviyedeki IL-10, IL-6'yı baskılayarak tümör büyümesini inhibe edebilmektedir. Ancak daha yüksek seviyelerdeki IL-10 kötü prognozla ilişkilidir. Literatürde ER+ tümörlere kıyasla ER- tümörlerde IL-10'un daha fazla eksprese edildiği ve PR+ hastalarda IL-10 seviyesinin daha az olduğu belirtilmektedir.

Deney sonuçlarına göre tamoksifen ve essitalopram oksalat IL-10 seviyelerini her iki hücrede de azaltmıştır.

Göğüs tümörlerinde yüksek oranda eksprese edilen TNF-α LPS'ye yanıt olarak tümör hücreleri tarafından serbest bırakılmaktadır. TNF-α'nın inhibisyonu kimyasal olarak indüklenen meme tümör oluşumuna karşı koruyucudur. Literatüre göre; TNF-α tümörün büyümesini desteklemektedir, ancak meme kanseri hücreleri arasında farklılıklar gösterdiğine dair veriler de bulunmaktadır.

Yaptığımız ko-kültür çalışmasında hem tamoksifen hem de essitalopram oksalat TNF-α seviyesini azaltmıştır. Bu durum essitalopram oksalatta daha yüksek oranda gerçekleşmiştir.

Bütün bu literatür bilgilerine ve sonuçlara bakıldığında yapmış olduğumuz deney sonuçları literatürle desteklenmektedir. Ancak IL-6 seviyelerinin madde uygulamasından sonra hala yüksek olması literatür ile uyuşmamaktadır.

Sonuç olarak essitalopram oksalatın iki farklı meme kanseri ko-kültür modelindeki etkilerini inceledik ve elde ettiğimiz sonuçlara göre essitalopram oksalat hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 için tamoksifenden daha sitotoksik bir etkiye sahip olduğunu bulduk. Bunun yanında apoptotik etkilere bakıldığında essitalopram oksalatın nekrotik etkileri tamoksifene oranla daha fazla olup, apoptotik etkilerinin daha düşük olduğunu gözlemledik. Nekroza uğrayan hücrelerin inflamatuar yanıt oluşturması istenilen bir durum olmayıp, apoptozun az olması essitalopram oksalatın tamoksifen kadar etkili bir ilaç olmadığını göstermektedir. Bunun yanında ko-kültür modeli ile baktığımız immün sistem yanıtları (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF-α) essitalopram oksalatta daha iyi sonuçlar vermiştir. Bununla birlikte essitalopram oksalata maruz bırakılan MCF-7 hücrelerindeki sitokin seviyeleri MDA-MB-231'e oranla daha düşük ölçülmüştür. Bunun nedeni MDA-MB-231 hücrelerinde nekrozdan kaynaklı inflamatuar yanıt oluşmuş olması olabileceği gibi, essitalopram oksalatın ortamda oluşturduğu immün yanıtta olabilir. Yine de bütün bu veriler doğrultusunda essitalopram oksalatın meme kanseri hastalarında (ER+/-) benzer etkiler gösterdiği söylenebilir.

Bu tez kapsamında yapılan deneylerde meme kanseri tedavisi sırasında sıklıkla tercih edilen bir antidepresan olan essitalopram oksalatın MCF-7 ve MDA-MB-231 sitotoksik, apoptotik ve immünolojik etkilerini araştırdık. Literatürde essitalopram oksalatın MCF-7 ve MDA-MB-231 üzerindeki etkilerine dair yeterli veri bulunmamaktadır. Bu nedenle essitalopram oksalatın etkilerine dair daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir. Bu nedenle bu tezin SSRI mekanizmasına sahip essitalopram oksalatın meme kanseri üzerindeki etkilerine dair katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKÇA

Abul, K.A., Lichtman, H.A. ve Pillai, S., (2017). Cytokines. *Cellular and Molecular Immunology (9.Baskı),* Elsevier Health Science.

Ahmad, A., (2013). Pathways to Breast Cancer Recurrence. *ISRN Oncology, (2013), 290568.*

Auwerx, J., (1991). The Human Leukemia Cell Line, THP-1: A Multifacetted Model For The Study of Monocyte-Macrophage Differentiation. *Experientia 47 (1991),* 22-31.

Artigas, F., Nutt, J.D. ve Shelton, R., (2002). Mechanism of Action of Antidepressants. *Psychopharmacology Bulletin*, 36 (2), 123-132.

Arunasree, K.M., (2010). Anti-Proliferative Effects of Carvacrol on A Human Metastatic Breast Cancer Cell Line, MDA-MB-231. *Phytomedicine*, 17 (8-9), 581-588.

Ashbury, E.J., Levesque, E.L., Beck, A.P., Aronson, J.K., (2012). Selective Serotonin Reuptake Inhibitör (SSRI) Antidepressants, Prolactin and Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 2 (117).

Banzi, R., Randazzo, C., Sterzi, R., Tedesco, D., Moja, L., (2015). Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) and Serotonin Norepinephrine Reuptake Inhibitors (SNRIs) for The Prevention of Tension-Type Headache in Adults (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews,* 4 (4), CD002919.

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

Bayramgürler, D. ve Demirsor Odyakmaz, E., (2013). Mast Hücreleri ve Aktivasyonu. *Türkderm*, 47 (1), 37-40.

Bilgehan, H., (1993). *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi*. (6.Baskı). Barış Fakülteler Kitabevi, İzmir.

Cansaran-Duman, D., Tanman, Ü., Yangın, S., Atakol, O., (2020). The Comparison of miRNAs That Respond to Anti-Breast Cancer Drugs and Usnic Acid for The Treatment of Breast Cancer. *Cytotechnology*, 72 (6), 855-872.

Chanput, W., Mes, H., Vreeburg, R.A.M., Savelkoul, H.F.J., Wichers, J., (2010). Transcription Profiles of LPS-Stimulated THP-1 Monocytes and Macrophages: A Tool to Study Inflammation Modulating Effects of Food-Derived Compounds. *Food & Function,* 1 (3), 254-61.

Chen, K., Satlof, L., Stoffels, G., Udithi, K., Ziluck, N., Lema, M., Poretsky, L., Avtanski, D., (2019). Cytokine Secretion in Breast Cancer Cells - MILLIPLEX Assay Data. *Journal Data in Brief,* 28, 104798.

Chen, V.C-H., Hsieh, Y-H., Chen, L-J., Hsu, T-C., Tzang, B-S., (2017). Escitalopram Oxalate Induces Apoptosis in U-87MG Cells Andautophagy in GBM8401 Cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine,* 20 (10), 1-12.

Comşa, Ş., Cimpean, M.A. ve Raica, M., (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research,* 35, 3147-3154.

Connelly, L., Barham, W., Onishko, H.M., Sherrill, T., Chodosh, L.A., Blackwell, T.S., Yull, F.E., (2011). Inhibition of NF-kappa B Activity in Mammary Epithelium Increases Tumor Latency and Decreases Tumor Burden. *Oncogene,* 30 (12), 1402–1412.

Dean, L., (2019). Tamoxifen Therapy and CYP2D6 Genotype. *Medical Genetics Summaries [İnternet]*, PMID: 28520357

Demirel D., (1995). Flow Sitometrik DNA Analizinin Temel Prensipleri. *Türk Pataloji Dergisi,* 11 (2), 64-65.

Derin, D., Oğus Soydinç, H., Güney, N., Taş, F., Çamlıca, H., Duranyıldız, D., Yasasever, V., Topuz, E., (2007). Serum IL-8 and IL-12 Levels in Breast Cancer. *Medical Oncology,* 24 (2), 163-168.

Dikmen, M., Cantürk, Z. ve Öztürk, Y., (2011). Escitalopram Oxalate, A Selective Serotonin Reuptake Inhibitor, Exhibits Cytotoxic And Apoptotic Effects In Glioma C6 Cells. *Acta Neuropsychiatrica,* 23 (4), 173–178.

Dunphy, C.H., (2004). Applications of Flow Cytometry and Immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine,* 128 (9) ,1004-1022

Edwardson, D.W., Boudreau, J., Mapletoft, J., Lanner, C., Kovala, A.t., Parissenti, A.M., (2017). Inflammatory Cytokine Production in Tumor Cells Upon Chemotherapy Drug Exposure or Upon Selection for Drug Resistance. *PLoS One,* 12 (9), e0183662.

Elmore, S., (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology,* 35 (4), 495-516.

Esquivel-Velazquez, N., Ostoa-Saloma, P., Palacios-Arreola, M.I., Nava-Castro, K.E., Castro, J.I., Morales-Montor, J., (2015). The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 35 (1), 1-16.

Ferguson, M.J., (2001). SSRI Antidepressant Medications: Adverse Effects and Tolerability. *Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry,* 3 (1), 22-27.

Frick, L.R. ve Rapanelli, M., (2013). Antidepressants: Influence on Cancer and Immunity? *Life Sciences*, 9 (10), 525-532.

Galecki, P., Mossakowska-Wojcik J. ve Talarowska, M., (2017). The Anti-inflammatory Mechanism of Antidepressants – SSRIs, SNRIs. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 80 (C), 291-294.

Ghoncheh, M., Pournamdar, Z. ve Salehiniya, H., (2016). Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention,* 17 (3), 43-46.

Gilfillan, A.M. ve Beaven, M.A., (2011). Regulation of Mast Cell Responses in Health and Disease. *Critical Reviews Immunology,* 31, 475-529.

Güllü, H.İ. ve Akalın, İ., (2005). Metastaz Biyolojisi. *Üroonkoloji Bülteni*, 4, 16-19.

Gürek, S., Hocaoğlu, Ş., Tomruk Sütbeyaz, S., Aykaç Çebiçci, A., (2014). Tümör Nekroz Faktör-α Tedavisi ve Bruselloz: Olgu Sunumu. *J. PMR Sci 2015,* 18, 44-48.

Goldman, A.S. ve Prabhakar, B.S., (1996). *Immunology Overview.* Medical Microbiology, Bölüm 1. (4. Yayın). Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7795/#_NBK7795_pubdet_ (Erişim Tarihi: 01.02.2020)

Gordon, S., (2003). Alternative Activation of Macrophages. *Nature Reviews Immunolology,* 3 (1), 23-35

Hamed, E.A., Zakhary, M.M., Maximous, D.W., (2012). Apoptosis, Angiogenesis, Inflammation, and Oxidative Stress: Basic Interactions in Patients With Early and Metastatic Breast Cancer. *Journal Cancer Research and Clinical Oncology*, 138 (6), 999–1009.

Hamidullah, Changkija, B., Konwar, R., (2012). Role of Interleukin-10 in Breast Cancer. *Breast Cancer Research an Treatment,* 133 (1), 11-21.

Hassan, F., Mohammed, G., EHiti, G.A., Alshanon, A., Yousif, E., (2018). Cytotoxic Effects of Tamoxifen in Breast Cancer Cells. *Saudi Medical Journal,* 38 (4), 359-365.

Hedges, W.D. ve Woon, M.F., (2007). An Emerging Role for Escitalopram in The Treatment of Obsessive-Compulsive Disorder. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 3 (4), 455-461.

Hefti, M.M., Hu, R., Knoblauch, W.N, Collins, C.L, Haibe-Kains, B., Tamimi M.R, Beck, H.A, (2013). Estrogen Receptor Negative/Progesterone Receptor Positive Breast Cancer Is Not A Reproducible Subtype. *Breast Cancer Research.* 15, R68.

Holen, I., Lefley, D.V., Francis, S.E., Rennicks, S., Bradbury, S., Coleman, R.E., Ottewell, P., (2016). IL-1 Drives Breast Cancer Growth and Bone Metastasis In Vivo. *Ontotarget,* 7 (46), 75571-75584.

Jennigs, L., (2018). Antidepressants. *Clinical Psychopharmacology for Neurologists*, 4, 45-71.

Jiang, X. ve Shapiro, J.D., (2014). The Immune System and Inflammation in Breast Cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382 (1), 673-68.

Juurlink, D., (2016). Revisiting The Drug Interaction Between Tamoxifen and SSRI Antidepressants. *The BMJ*, 354, i5309.

Kanev, M.O. ve Gökalp Muranlı, F.D., (2016). Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. *SAÜ Fen Bilimleri Dergisi,* 20 (1), 33-38.

Kamaludin, R., Froemming, G.A., Ibahim, M.J., Narimah, A.H.H., (2013). Cell Apoptotic Determination by Annexin V-FITC Assay in Apigenin and Rutin-Induced Cell Death in Breast Cancer Cells. *The Open Conference Proceedings Journal*, 4, 205.

Kanarya Vardar, M., Tezcan, B., Belli, H., Öztürk, H.N., Adalı Aker, D., (2017). Essitalopram Kullanımı Sonrasında Doza Bağlı Gelişen Spontan Ekimotik Lezyonlar: Olgu sunumu. *Anadolu Psikiyatri Dergisi,* 18 (5), 503-506.

Kanev, M.O. ve Gökalp Muranlı, F.D., (2015). Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. *SAÜ Fen Bilimleri Dergisi* 20 (1), 33-38.

Kelly, C., Juurlink, D., Gomes, T., Duong-Hua, M., Pritchard, K., Austin, P., Paszat, L., (2009). Risk of Death Due to Breast Cancer in Women Treated with Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Antidepressants and Tamoxifen. *Cancer Research*, 69 (24).

Kozlowski, L., Zakrzewska, I., Tokajuk, P., Wojtukiewicz, MZ., (2003). Concentration of Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) and Interleukin-10 (IL-10) in Blood Serum of Breast Cancer Patients. *Rocznikii Akademii Medycznej Bia1ymstoku,* 48, 82–84.

Kuwahara, J., Yamda, T., Egashira, N., Ueda, M., Zukeyama, N., Ushio, S., Masuda, S., (2015). Comparison of the Anti-tumor Effects of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors as Well as Serotonin and Norepinephrine Reuptake Inhibitors in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin,* 38, 1410–1414.

LaRosa, D.F. ve Orange, J.S., (2007). 1.Lymphocytes. *Journal Allergy and Clinical Immunology,* 121 (2), 364-369.

Lash, L.T., Cronin-Fenton, D., Ahern, P.T., Rosenberg, L.C., Lunetta, L.K., Silliman, A.R., Hamilton-Dutoit, S., Garne, J.P., Ewertz, M., Sorensen, H.T., Pedersen, L., (2010). Breast Cancer Recurrence Risk Related to Concurrent Use of SSRI Antidepressants and Tamoxifen. *Acta Oncologica*, 49, 305-312.

Li, J., Lu, M., Jin, J., Lu, X., Xu, T., Jin, S., (2018). miR-449a Suppresses Tamoxifen Resistance in Human Breast Cancer Cells by Targeting ADAM2. *Cellular Physiology and Biochemistry,* 50, 136-149.

Li, Y., Yang, D., Yin, X., Zhang, X., Huang, J., Wu, Y., Wang, M., Yi, Z., Li, H., Li, H., Ren, G., (2020). Clinicopathological Characteristics and Breast Cancer–Specific Survival of Patients With Single Hormone Receptor–Positive Breast Cance. *JAMA Network Open,* 3 (1), e1918160.

Lippman, M., Bolan, G. ve Huff, K., (1976). The Effects of Estrogens and Antiestrogens on Hormone Responsive Human Breast Cancer in Long-Term Tissue Culture. *Cancer Research*, 36, 4595-4601.

Mandrioli, R., Protti, M. ve Mercolini, L., (2018). New-Generation, Non-SSRI Antidepressants: Therapeutic Drug Monitoring and Pharmacological Interactions. Part 1: SNRIs, SMSs, SARIs. *Current Medicinal Chemistry*, 25 (7), 772-792.

Mariantonietta, C., ELİZA, M., Maritna, N., Silvia, S., Phuong, D., Raffaele, V., Evandro, A., (2014). Aromatase Inhibitors: A New Reality for the Adjuvant Endocrine Treatment of Early-Stage Breast Cancer in Postmenopausal Women. *Recent Advances in Medicinal Chemistry,* 1, 99-130.

Mayer, G., (Tarihsiz). İmmünoloji – Bölüm onüç Sitokinler ve İmmünoregülasyon. (Çev: E. Yula). http://www.microbiologybook.org/Turkish-immunol/immunolchapter13turk.htm (Erişim Tarihi: 31.03.2016).

Merendino, R.A., Arena, A., Capozza, A.B., Chillemi, S., Mesiti, M., (1996). Serum Levels of Interleukin-10 in Patients Affected by Breast Cancer. *Immunology Letters,* 53 (1), 59–60.

Miller, A.M., Zheng, Y., Gadde, S., Pfirschke, C, Zope, H., Enfblom, C., Kohler, H.R., Iwamoto, Y., Yang, S.K., Askvold, B., Kolishetti, N., Pittet, M., Lippard, J.S., Farokhzad, C.O., Weissleder, R., (2015). Tumour-Associated Macrophages Act As

A Slow-Release Reservoir of Nano-Therapeutic Pt(IV) Pro-Drug. *Nature Communications*, 6, 8692.

Mirabdollahi, M., Javanmard, S.H., Sadeghi-Aliabadi, H., (2019). In Vitro Assessment of Cytokine Expression Profile of MCF-7 Cells in Response to hWJ-MSCs Secretome. *Advanced Pharmaceutical Bulletin,* 9 (4), 649-654.

Mohammed, F., Rashid-Doubell, F., Taha, S., Cassidy, S., Fredericks, S., (2020). Effects of Curcumin Complexes on MDAMB-231 Breast Cancer Cell Proliferation. *International Journal Oncology,* 57 (2), 445-455.

Mossman T., (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods,* 65 (1-2), 55-63.

Mutee, A.F., Salhimi, S.M., Ghazali, F.C., Al-Hassan, F.M., Lim, C.P., Ibrahim, K., Asmawi, M.Z., (2012). Apoptosis Induced in Human Breast Cancer Cell Line by *Acanthaster planci* Starfish Extract Compared to Tamoxifen. *African Journal Pharmacy and Pharmacology* 6 (3), 129-134.

Nakasone, S.E., Hurvitz, A.S. ve McCann, E.K., (2018). Harnessing The Immune System in The Battle Sgainst Breast Cancer. *Drugs in Context*, 7, 212520.

Nicolini, A., Carpi, A. Ve Rossi, G., (2006). Cytokines in Breast Cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews,* 17 (5), 325-337.

Nigjeh, S.E., Yeap, S.K., Nordin, N., Kamalideghan, B., Ky, H., Rosli, R., (2018). Citral Induced Apoptosis in MDA-MB-231 Spheroid Cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine,* 18 (1), 56.

Okada, M., Suzuki, A., Mizuno, K., Asada, Y., Ino, Y., Kuwayama, T., Tamokoshi, K., Mizutani, S., Tomoda, Y., (1997). Effects of 17β-estradiol and Progesterone on

Migration of Human Monocytic THP-1 Cells Stimulated by Minimally Oxidized Low-density Lipoprotein In Vitro. *Cardiovascular Research,* 34 (3), 529-35.

Ortiz-Montero, P., Londono-Vallejo, A. Ve Vernot, J.P., (2017). Senescence-Associated IL-6 and IL-8 Cytokines Induce A Self- and Crossreinforced Senescence/Inflammatory Milieu Strengthening Tumorigenic Capabilities in The MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Cell Communication and Signaling,* 15, 17.

Osborne, C.K., (1998). Tamoxifen in The Treatment of Breast Cancer**.** *The New England Journal of Medicine,* 339 (2), 1609-1618.

Qui, S., Waaijer, S.J.H., Zwager, M.C, de Vries, E.G.E., Van der Vegt, B., Svhröder, C.P., (2018). Tumor-Associated Macrophages in Breast Cancer: Innocent Bystander or Important Player?. *Cancer Treatment Reviews,* 70, 178-189.

Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reuteligsperger, C., Haanen, C., (1998). Early Features of Apoptosis Detected by Four Different Flow Cytometry Assays. *Apoptosis*, 3 (2), 115-121

Ögmundsdottır, M.H., Petursdottır, I., Gudmundsdotrrı, I, (1995). Interactions Between The Immune System And Breast Cancer. *Acta Oncologica*, 34 (5), 647-650.

Öktem, S., Özhan, M.Ö. ve Özol, D., (2001). Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi,* 2 (1), 91-95.

Pan, H., Gray, R., Braybrooke, J., Davies, C., Taylor, C., McGale, P., Peto, R., (2017). 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence After Stopping Endocrine Therapy at 5 Years. *The New England Journal of Medicine,* 377 (19), 1836-1846.

Pazarbaşı, A. ve Kasap, M., (2003). Kanser Genetiği*. DergiPark,* 12 (4), 328-340.

Petinari, L., Khon, L.K., Ernesto de Varvalho, J., Candelaria Genari, S., (2004). Cytotoxicity of Tamoxifen in Normal and Tumoral Cell Lines and Its Ability to

Induce Cellular Transformation In Vitro. *Cell Biology International,* 28 (7), 531-539.

Poh, R.A., ve Ernst, M., (2018). Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside. *Frontiers in Oncology*, 8, 49.

Rajput, S., Kumar, B.N.P., Sarkar, S., Das, S., Azab, B., Santhekadur, P.K., Das, S.K., Emdad, L., Sarkar, D., Fisher, P.B, Mandal, M., (2013). Targeted Apoptotic Effects of Thymoquinone and Tamoxifen on XIAP Mediated Akt Regulation in Breast Cancer. *PLoS One.* 8 (4), e61342.

Riss, T.L, Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellmann, S., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L., (2016). Assay Guidance Manual: Cell Viability Assays. https://www.ncbi.nlm.nih.gov /books/NBK144065/?report=reader#!po=1.16279, Erişim tarihi; 21.12.2016.

Saçu D., (2008). *Deneysel olarak fibrosarkoma oluşturulan ratların serumlarında interlökin-6 ve tümör nekrosis faktör alfa düzeylerinin belirlenmesi.* Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Salami, S. ve Karami-Tehrani, F., (2003). Biochemical Studies of Apoptosis Induced by Tamoxifen in Estrogenreceptor Positive and Negative Breast Cancer Cell Lines. *Clinical Biochemistry* 36 (4), 247-253.

Sarrouilhe, D. ve Mesnil, M., (2018). Serotonin and Human Cancer: A Critical View. *Biochimie,* 161, 46-50.

Sarrouilhe, D., Clarhaut, J., Defamie, N., Mesnil, M., (2015). Serotonin and Cancer: What Is the Link?. *Current Molecular Medicine*, 15, 62-77.

Sasser, A.K., Sullivan N.J., Studebaker A.W., Hendey, L.F., Axel, A.E., Hall, M.B., (2007). Interleukin-6 Is A Potent Growth Factor for ER-α-Positive Human Breast Cancer. *The FASEB Journal,* 21 (13), 3763-3770.

Seeger, H., Huober, J., Wallwiener, D., Mueck, A.O., (2003). Inhibition of Human Breast Cancer Cell Proliferation With Estradiol Metabolites Is As Effective As With Tamoxifen. *Hormone and Metabolic Research,* 36 (5), 277-280.

Sherr, J.C., (2004). Principles of Tumor Suppression. *Cell*, 116, 205-219.

Shuster, J.L., Stern, T.A. ve Greenberg, D.B., (1992). Pros and Cons of Fluoxetine for The Depressed Cancer Patient. *Oncology (Williston Park),* 6 (11), 45-50.

Sitges, M., Gomez, D.C. ve Aldana, I.B., (2014). Sertraline Reduces IL-1β and TNF-α mRNA Expression and Overcomes Their Rise Induced by Seizures in the Rat Hippocampus. *Plos One,* 9 (11), e11665

Standish, J.L., Sweet, S.E., Novack, J., Wenner, A.C., Bridge, C., Nelson, A., Martzen, M., Torkelson, C., (2008). Breast Cancer and The Immune System. *Journal of the Society for Integrative Oncology*, 6 (4), 158-168.

Stewart, A.D., Yang, Y., Makowski, L., Troester, A.M., (2012). Basal-Like Breast Cancer Cells Induce Phenotypic and Genomic Changes in Macrophages. *Molecular Cancer Research,* 10 (6), 727-738.

Subik, K., Lee, J., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., Xing, L., Hug M., Bonfiglio, T., Hicks, G.D., Tang, P., (2010). The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research,* 4, 5-41.

Sun, T., Qin, Y. ve Zhong W., (2016). Epithelial-Mesenchymal Transition and its Regulation in Tumor Metastasis. *IntechOp*en. 217-239.

https://www.intechopen.com/books/tumor-metastasis/epithelial-mesenchymal-transition-and-its-regulation-in-tumor-metastasis (Erişim Tarihi: 19.06.2020).

Sweeney, E.E., McDaniel, E.R., Maximov, Y.P., Fan, P., Jordan, V.C., (2012). Models and Mechanisms of Acquired Antihormone Resistance in Breast Cancer: Signifi Cant Clinical Progress Despite Limitations. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 9 (2), 143–163.

Tekeli, A. ve Özenci, H., (1997). Doğal Öldürücü Hücreler. Flora Dergisi. 2 (2), 138-145.

Todoroviç-Rakovic, N. ve Milovanovic, J., (2013). Interleukin-8 in Breast Cancer Progression. *Journal of Interferon & Cytokine Research,* 33 (10), 563-570.

Tokur, O. ve Aksoy, A., (2017). In Vitro Sitotoksisite Testleri. Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 6 (1), 112-118.

Tsai, J-H., Kuo, C-H., Yang, P., Cheng, K-H., Wang, P-W., Chen, C-C., Hung, C-H., (2014). Effects of Antidepressants on IP-10 Production in LPS-Activated THP-1 Human Monocytes. *International Journal of Molecular Sciences,* 15 (8), 13223-13235.

Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K., (1980). Estabilishment and Characterization of A Human Acute Monocytıc Leukemia Cell Line (THP-1). *International Journal of Cancer*, 26, 171-176.

Tunalı Y., (2015). *İmmünoloji*. Bursa: DORA Basın-Yayım Dağıtım Ltd. Şti.

Ünal, T., (2012). Neoplazi. http://dent2.ege.edu.tr/dosyalar/kaynak/301_patoloji/12.pdf (Erişim Tarihi: 11.01.2020)

Villas, B.H., (1998). Flow Cytometry: An Overview. *Cell Vision: The Journal of Analytical Morphology,* 5 (1), 56-61.

Ward, R., Sims, H.A., Lee, A., Lo, C., Wynne, L., Yusuf, H., Gregson Hannah, Lisanti P. Michael, Sotgia Federica, Langberg Göran, Lamb Rebecca, (2015). Monocytes and Macrophages, Implications for Breast Cancer Migration and Stem Cell-Like Activity and Treatment. *Oncotarget,* 6 (16), 14687-14699.

WHO, World Health Organization, (12.09.2018). Lastest Global Cancer Data: Cancer Burden Rises to 18.1 Million New Cases and 9.6 Million Cancer Deaths in 2018. *Basın bülteni.* https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf (Erişim Tarihi: 12.09.2018)

World Cancer Research Found, (2017). Diet, Nutrition, Physical Activity and Breast Cancer. https://www.wcrf.org/sites/default/files/Breast-Cancer-2017-Report.pdf (Erişim Tarihi: 25.10.2020)

Xu, Z., Zheng, X., Xia, X., Wang, X., Luo, N., Huang, B., Pan, X., (2019). 17β-estradiol at Low Concentrations Attenuates The Efficacy of Tamoxifen in Breast Cancer Therapy. *Environmental Pollution,* 225 (2019), 113228.

Yaacob, N.S., Kamal, N.N.N.M. ve Norazmi, M.N., (2014). Synergistic Anticancer Effects of A Bioactive Subfraction of *Strobilanthes crispus* And Tamoxifen on MCF-7 and MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Lines. *BMC Complementary & Alternative Medicine,* 14, 252.

Yetkin, D., (2019). *Meme Kanseri Hücre Hattında Tamoksifen ve Vitamin D Kombinasyonunun Apoptozz ve Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin İncelenmesi.* Doktora Tezi. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Zhang, G., Kimijima, I., Onda, M., Kanno, M., Sato, H., Watanabe, T., Tsuchiya, A., Abe, R., Takenoshita, S., (1999). Tamoxifen-Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells Relates to Down-Regulation of bcl-2, But Not bax and bcl-XL, without Alteration of p53 Protein Levels. *Clinical Cancer Research,* 5 (10), 2971-2977.

http-1: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/htb-22.aspx?geo_country=tr#characteristics (Erişim Tarihi: 17.10.2018)

http-2: http://www.mcf7.com/ (Erişim Tarihi: 21.11.2018)

http-3: https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf (Erişim Tarihi: Haziran 2017)

http-4: https://www.drugs.com/monograph/tamoxifen-citrate.html (Erişim Tarihi: 04.11.2019)

http-5: https://www.drugs.com/drug-class/selective-estrogen-receptor-modulators.html (Erişim Tarihi: 03.12.2020)

http-6: https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8587.00.pdf (Erişim Tarihi: 27.04.2018)

http-7: https://www.breastcancer.org/treatment/hormonal/serms/tamoxifen#:~:text=Tamoxifen%20can%3A,positive%20breast%20cancers%20before%20surgery (Erişim Tarihi: 28.03.2020)

http-8: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/021323s047lbl.pdf (Erişim Tarihi: 28.10.2020)

http-9: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/escitalopramoxalate4144321986108211?lang=en&region=TR (Erişim Tarihi: 10.11.2020)

http-10: https://www.breastcancer.org/research-news/20110118-3 (Erişim Tarihi: 18.01.2011)

http-11: https://avys.omu.edu.tr/storage/app/public/oktay.genc/127106/İmmün-Sistemin-Tanıtımı.pdf (Erişim Tarihi: 30.10.2020)

http-12: http://bizdosyalar.nevsehir.edu.tr/37e65b238b9b3a814b09915e8b11a006/2-sinif-immun-sistemin-yapisi.pdf.Erişim (Erişim Tarihi: 19.10.2020).

http-13: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/protocols/biology/roche/metabolization-of-mtt.png (Erişim Tarihi: 27.11.2020).

http-14: https://www.researchgate.net/profile/Omer_Anakok/publication/322065602/figure/fig6/AS:575773254078471@1514286449629/Structures-of-MTS-tetrazolium-salt-and-its-formazan-product-from-CellTiter-96R-AQueous_W640.jpg (Erişim Tarihi: 11.12.2020)

http-15: https://aubibam.anadolu.edu.tr/tr/cihaz-ve-donanımlar/xcelligence-gerçek-zamanlı-hücre-analiz-sistemi-real-time-cell-analysis-system (Erişim Tarihi: 22.11.2020)