

HİLAL ÇAP

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2021



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**YENİ SENTEZLENEN AMİNO ANTRAKİNON
TÜREVİNİN ANTİKANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

HİLAL ÇAP

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. BAŞAK VAROL**

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
BİYOFİZİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde bana her aşamada destek olan sevgili danışman hocam Doç. Dr. Başak VAROL'a, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Muhammet BEKTAŞ'a, deneysel çalışmalarımda laboratuvarında çalışma imkanı sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Ebru HACIOSMANOĞLU'na, MSc. Kemal Alper ÖNSÜ ve MSc. Recep ÜSTÜNSOY ile tüm İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

“Amino ve Tiyo Antrakinin Türevlerinin sentezlenmesi ve Karakterizasyonu” isimli doktora çalışmasında Amino antrakinin maddesini sentezleyen İÜC Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim dalı Doktora öğrencisi Kamala ASGAROVA'ya, sevgili tez danışmanı Prof. Dr. Nihal ONUL ile Dr. Funda ÖZKÖK'e teşekkür ederim.

Akım sitometri deneylerinde bana yardımcı olan Abdullah YILMAZ ile nanopartikül sentezinde yardımcı olan MSc. Erdi BULUŞ'a, istatistik analizler için yardımcı olan Rabia KESİCİ ve bana her zaman destek olan değerli aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36733

İÇİNDEKİLER

BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	1
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	3
ÖZET	4
ABSTRACT	5
1. GİRİŞ VE AMAÇ	6
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1.Kanser Biyolojisi.....	8
2.2. Meme Kanseri	9
2.2.1. Meme Kanseri Moleküler Mekanizması	10
2.2.2. HER2 Pozitif Meme Kanserinin Moleküler Özellikleri.....	12
2.2.3. Meme Kanserinin Sınıflandırılması	13
2.2.3.1. Histolojik Alt Sınıflar	14
2.2.3.2. Moleküler Alt Sınıflar	14
2.2.4. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri	16
2.2.4.1. Kemoterapi	16
2.2.4.2. Cerrahi	17
2.2.4.3. Radyasyon Tedavisi	17
2.2.4.4. Hedefe Yönelik Tedavi	17
2.2.4.5. Hormon Tedavisi.....	18
2.2.4.6. İmmünoterapi	18
2.3. MTX	19
2.4. Apoptoz	19
2.4.1. Apoptoz ve Kanser Gelişimi	20
2.4.2. Meme Kanserinde Apoptoz.....	20
2.4.3. Normal Memede Apoptoz	21

2.4.4. Meme Kanseri Gelişimi Tarihinde Apoptoz	22
2.4.5. Kemoterapi İle Apoptozdaki Değişiklikler	22
2.4.6. Meme Kanseri Apoptozla İlgili Proteinler Ve Tedavisi	23
2.5. AA	24
2.6. Nanopartiküller ve Kanseri Tedavisindeki Rollerini	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. GEREÇLER	27
3.1.1. KİMYASAL MADDELER	27
3.1.2. KİTLER	27
3.1.3. CİHAZLAR	28
3.2. YÖNTEMLER	29
3.2.1. Hücrelerin Çoğaltılması	29
3.2.2. Hücrelerin Dondurulması ve Çözülmesi	29
3.2.3. Hücrelerin Sayılması ve Ekilmesi	29
3.2.4. AA hazırlanması	30
3.2.5. Hücre Canlılık Testi	30
3.3. İyonik Jelleşme Metodu İle Nanopartikül Elde Edilişi	31
3.4. Akım Sitometri İle Apoptoz Tayini	32
3.4.1. Akım Sitometri Cihazı Kalibrasyon Ayarlarının Yapılması	32
3.4.2. MCF-7 ve HUVEC Hücrelerinde Apoptoz Tayini	32
3.5. İstatistik Analizler	33
4. BULGULAR	34
4.1. NP Haline Getirilen Moleküllerin SEM ile Görüntülenmeleri	34
4.2. Sitotoksite Analizleri	36
4.2.1 MCF-7 ve HUVEC Hücrelerine MTX ve MTX-NP Formlarının Etkisi	36
4.2.1.1 MCF-7 Hücrelerine MTX ve MTX-NP Etkisi	36
4.2.1.2 HUVEC Hücrelerine MTX ve MTX-NP Etkisi	38
4.2.2 MCF-7 ve HUVEC Hücrelerine AA ve AA-NP Formlarının Etkisi	40
4.2.2.1. MCF-7 Hücrelerine AA ve AA-NP Formlarının Etkisi	40
4.2.2.2. HUVEC Hücrelerine AA ve AA-NP Formlarının Etkisi	42

4.2.3.MCF-7 ve HUVEC Hücrelerine MTX+AA ve (MTX+AA)-NP Formlarının Etkisi	44
4.2.3.1.MCF-7 Hücrelerine MTX+AA ve (MTX+AA)-NP Formlarının Etkisi	44
4.2.3.2.HUVEC Hücrelerine MTX+AA ve MTX+AA-NP Formlarının Etkisi	46
4.3. AKIM SİTOMETRİ İLE APOPTOZ TAYİNİ	48
4.3.1. MCF-7 Hücrelerinin AA ve AA-NP varlığında Akım Sitometri ile Apoptoz Analizleri	49
4.3.2. HUVEC Hücrelerinin AA ve AA-NP varlığında Akım Sitometri ile Apoptoz Analizleri	53
4.3.3. MCF-7 Hücrelerinin MTX+AA ve (MTX+AA)-NP varlığında Akım Sitometri ile Apoptoz Analizleri	56
4.3.4. HUVEC Hücrelerinin MTX+AA ve (MTX+AA)-NP varlığında Akım Sitometri ile Apoptoz Analizleri	60
4.4. İSTATİSTİK ANALİZLER	64
4.4.1. MTT Analizleri için İstatistik Analiz	64
4.4.2. Akım Sitometri için İstatistik Analiz	64
5. TARTIŞMA	65
KAYNAKLAR	69
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	81
ÖZGEÇMİŞ	82

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4-1: MCF-7 hücrelerinde AA-NP'nin 48 saat noktasal grafiklerinin detaylı gösterimi.....	51
Tablo 4-2: MCF-7 hücrelerinde MTX+AA'nın 24 saat noktasal grafiğinin detaylı gösterimi.....	57
Tablo 4-3: MCF-7 hücrelerinde 48 saat (MTX+AA)-NP noktasal grafiğinin detaylı gösterimi.....	58
Tablo 4-4: HUVEC hücrelerinde 48 saat (MTX+AA)-NP noktasal grafiğinin detaylı gösterimi.....	62

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1:Amino antrakinon maddesinin yapısı.....	25
Şekil 4-1:Boş nanopartikül SEM görüntüsü.	34
Şekil 4-2:30 µM MTX + 30 µM AA SEM görüntüsü.	35
Şekil 4-3:30 µM AA SEM görüntüsü.	35
Şekil 4-4:30 µM MTX SEM görüntüsü.	35
Şekil 4-5:MCF-7 hücrelerinde MTX ve MTX-NP 24 saat MTT analizleri.	37
Şekil 4-6:MCF-7 hücrelerinde MTX ve MTX-NP 48 saat MTT analizleri.	37
Şekil 4-7:HUVEC hücrelerinde MTX ve MTX-NP 24 saat MTT analizleri.	39
Şekil 4-8:HUVEC hücrelerinde MTX ve MTX-NP 48 saat MTT analizleri.	39
Şekil 4-9:MCF-7 hücrelerine AA ve AA-NP'nin 24 saat MTT analizleri.	41
Şekil 4-10:MCF-7 hücrelerinde AA ve AA-NP 48 saat MTT analizleri.....	41
Şekil 4-11:HUVEC hücrelerinde AA ve AA-NP 24 saat MTT analizleri.....	43
Şekil 4-12:HUVEC hücrelerinde AA ve AA-NP 48 saat MTT analizleri.....	43
Şekil 4-13:MCF-7 hücrelerinde 30 µM MTX+AA ve 30 µM (MTX+AA)-NP 24 saat MTT analizleri.	45
Şekil 4-14:MCF-7 hücrelerinde 30 µM MTX+AA ve (30 µM MTX+AA)-NP 48 saat MTT analizleri.	45
Şekil 4-15:HUVEC hücrelerinde 30 µM MTX+AA ve (30 µM MTX+AA)-NP 24 saat MTT analizleri.	47
Şekil 4-16:HUVEC hücrelerinde 30 µM MTX+AA ve 30 µM MTX+AA-NP 48 saat MTT analizleri.....	47
Şekil 4-17:MCF-7 Kontrol hücrelerin Annexin V(-) , PI(-) akım sitometri ile analizi..	48
Şekil 4-18:MCF-7 hücrelerinde AA'nın 24 saat noktasal grafikleri..	50
Şekil 4-19:MCF-7 hücrelerinde AA-NP'nin 48 saat noktasal grafikleri	51
Şekil 4-20:MCF-7 Hücrelerinde 24 Saat AA ve 48 saat AA-NP apoptoz oranları.	52
Şekil 4-21:HUVEC hücrelerinde AA'nın 48 saat noktasal grafiği.....	54
Şekil 4-22:HUVEC hücrelerinde AA-NP 48 saat noktasal grafiği.....	55
Şekil 4-23:HUVEC hücrelerinde 48 saat AA ve AA-NP maddesinin apoptoz oranları.....	55
Şekil 4-24:MCF-7 hücrelerinde MTX+AA'nın 24 saat noktasal grafikleri.	57

Şekil 4-25:MCF-7 hücrelerinde 30 μ M MTX-NP ve (30 μ M MTX+AA)-NP maddesinin 48 saat noktasal grafiği.	58
Şekil 4-26:MCF-7 hücrelerinde 24 Saat MTX+AA ve 48 saat MTX +AA)-NP maddesinin apoptoz oranları.	59
Şekil 4-27:HUVEC hücrelerinde 30 μ M MTX+AA varlığında Akım sitometri ile apoptoz analizleri.....	61
Şekil 4-28:HUVEC hücrelerinde AA-NP , MTX-NP ve (30 μ M MTX+AA)-NP 48 saat noktasal grafiği.	62
Şekil 4-29:HUVEC hücrelerinde farklı değerlerde 48 saat 30 μ M MTX+AA'nın apoptoz oranları..	63



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AA	Amino antrakinon
AR	Androjen Reseptörü
BRCA1	Meme kanseri, tip 1 duyarlılığı proteini
BRCA2	Meme kanseri, tip 2 duyarlılığı proteini
CDMEM	Complete DMEM
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FACS	Floresan Aktive Hücre Ayırıcı
FBS	Fetal sığır serumu
FITCH	Floresin izotiyosiyonat
FSC	Hücre büyüklüğü (Forward Scatter)
HER2-	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HR +	Hormon Reseptörü pozitif
HR -	Hormon Reseptörü negatif
HUVEC	İnsan göbek damarı endotel hücreleri (CRL-1730)
MCF-7	Meme kanseri hücresi-7 (HTB-22)
MTX	Mitoksantron
NP	Nanopartikül
PBS	Fosfat tuzu tamponu
PI	Propidyum iyodür
PS	Penisilin streptomisin
SSC	Hücre granülitesi (Side Scatter)
SEM	Taramalı elektron mikroskobu

ÖZET

ÇAP, H. (2021). Yeni Sentezlenen Amino Antrakinin Türevinin Antikanser Etkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik AD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Meme kanseri tedavisinde kullanılan geleneksel kemoterapötik ajanlarının çoğu sistematik toksisiteye neden olmaktadır. Bu amaçla sitotoksik etkileri düşük, anti kanser etkileri yüksek yeni nesil olarak adlandırılan ilaç adayı moleküller ile yapılan çalışmalar son yıllarda önem kazanmıştır. Amino antrakininler (AA) ve türevleri antikanser ilacı olarak günümüzde kullanılmaktadırlar. Meme kanseri standart tedavisinde kullanılan en yaygın AA örneklerinden biri olan Mitoksantron (MTX) sitotoksik antibiyotik sınıfına dahildir. Bu tez çalışmasında yeni özgün olarak sentezlenen AA türevi molekülün İnsan meme kanseri hücreleri (MCF-7) ile İnsan damar kordonu endotel hücreleri (HUVEC) üzerine bağımsız ve standart tedavide kullanılan MTX ile olan sinerjistik etkisi değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda, sitotoksik testleri MTT yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler analiz edilerek hücrelerin %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonları (IC_{50}) hesaplanmıştır. Apoptotik analizler akım sitometri yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Deneyler sırasında biyoyararlanımı üst seviyeye taşımak amacı ile AA ve MTX uygun konsantrasyonlarda ayrı ayrı ve birlikte enkapsüle edilmiştir. Nanopartikül (NP) haline getirilen bu türev ve ilaç kombinasyonları ile de tüm deneyler tekrarlanarak sitotoksik testleri ve apoptotik analizler yapılmıştır. Yapılan deneylerde 24 saat sonunda enkapsüle edilen AA ve MTX'in kapsüle edilmeyen formlara göre kontrollü ilaç salınımından dolayı hem sitotoksik hem de apoptoz açısından değerlendirdiğimizde etkinliklerinin azaldığı görülmüştür. 48 saat sonunda ise etkinliklerinin kapsülsüz formlara oranla arttığı izlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlarda AA'nın kontrol olarak kullanılan HUVEC hücrelerinde yüksek sitotoksik etki göstermesi ilacın sinerjistik etkinliğini ön plana çıkarmaktadır. Tüm bu çalışmaların bundan sonra yapmayı planladığımız *in vivo* deneyler için temel oluşturacağını ve meme kanseri tedavisinde yeni ilaç adayı molekül geliştirilmesine önemli bir katkı sağlayacağını öngörmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, AA, MTX, NP, İlaç adayı molekül,

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36733

ABSTRACT

ÇAP, H. (2021). Investigation Of The Anti-Cancer Effect Of A New Synthesized Amino Anthracinone Derivative. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Biophysics, MSc. Thesis. İstanbul. 2021.

Many of the traditional chemotherapeutic agents used in the treatment of breast cancer(BC) cause systemic toxicity. For this purpose, studies conducted with drug candidate molecules called new generation with low cytotoxic effects and high anti-cancer effects have gained importance in recent years. Amino anthroquinones (AA) and its derivatives are widely used for the cancer treatment today. One of the most common examples of AA used in BC standard therapy, mitoxantrone (MTX) is included in the cytotoxic antibiotic class. In this thesis study, the synergistic effect of the newly synthesized AA-derived molecule on human BC cells (MCF-7) and Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) . For this hence In this direction, cytotoxicity tests were carried out by MTT method and the obtained data were analyzed and the inhibition concentrations IC_{50} at which the cells were 50% viable were calculated. Apoptotic analyzes were performed using flow cytometry method. During the experiments, AA and MTX were encapsulated individually together at appropriate concentrations in order to maximize bioavailability. Cytotoxicity tests and apoptotic analyzes were performed by repeating all experiments with these derivatives and drug combinations were encapsulated . At the end of 48 hours, it was observed that their effectiveness increased compared to the unencapsulated forms. In the results we obtained, the cytotoxic effect of AA in HUVEC cells used as control highlights the synergistic effect of the drug. We anticipate that all these studies will form the basis for future in vivo experiments and will make an significant contribution to the development of new drug candidate molecules in BC treatment.

Key Words: BC, AA, MTX, Drug candidate molecule

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 36733

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile meydana gelen bir hastalıktır. Meme kanseri ise; meme dokusundaki hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla oluşan ve dünya üzerinde kanser ölümlerinde ikinci olarak başta gelen kanser türüdür (2). Meme kanseri kadın popülasyonu arasında en sık görülen kanser türüdür (3). Meme kanseri metastaz yapabilme yeteneğine sahiptir. Bu sebeple kanserin iyileşmesi ve tedavisinde kemoterapötik ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır (4). Kemoterapötik ajanların önemli yan etkileri bulunmaktadır. Kanser hücreleri ile birlikte sağlıklı hücreler üzerinde de sitotoksik özellik gösterirler. Yan etkilere örnek olarak karaciğer, akciğer ve böbrek hasarları ayrıca kalp yetmezliği gösterilmektedir (5, 6). Kemoterapötik ajanların kullanımında yan etkilerin önüne geçebilmek için nanoteknoloji çok yönlü çözümler sunar. İlacın biyolojik bariyerleri aşarak kanserli hücrelere ulaşmasını sağlar (7). Nanokapsülasyon ilacın vücut içerisinde kontrollü salınımı ve hedef dokuya iletimi için yan etkilerin ortadan kaldırılması aşamasında gereklidir (8). Nanopartiküller, enkapsüle edilen ilaçların veya ilaç adayı moleküllerin terapötik etkilerini arttırması, enzimatik yıkımdan korumaları ve kan dolaşımında uzun süre kalmalarını sağlar (9). Biyoyararlanımı en üst seviyeye taşımak amacı ile bu tez çalışmasında AA türevleri nanopartikül haline getirilerek *in vitro* deneylerde kullanıldı. Nanokapsülasyon meme kanserinde, hedefli ilaç taşımada ve kanser tedavisinde uygun ve kullanışlı bir yöntemdir (10). Yeni sentezlenmiş, özgün AA türevi maddenin, insan meme kanseri hücresi olan MCF-7 üzerindeki etkileri araştırıldı. Bu çalışma ile yeni bir antikanser ilaç adayı molekül elde etmeyi hedeflemekteyiz. Birçok AA türevi madde kemoterapik ajan olarak kullanılabilir. AA'ların iyi bilinen örneklerinden biri, kemoterapötik ajan olan mitoksantron ile 1-(4-(4-hydroxyphenyl)piperazin-1-yl)anthracene-9, 10-dione yeni sentezlenen özgün AA türevinin meme MCF-7 hücrelerine olan sitotoksik etkileri *in vitro* kültür koşullarında gözlemlendi.

Apoptoz, fizyolojik ve patolojik koşullarda ortaya çıkan fizyolojik bir hücresel süreçtir. Apoptozun altında yatan mekanizmanın anlaşılması, birçok hastalığın patogeneğinde önemli rol oynar. Bazılarında sorun, dejeneratif hastalıklarda olduğu gibi çok fazla apoptozdan kaynaklanırken, diğerlerinde apoptozun meydana gelmemesi sonucu hastalık ortaya çıkar. Kanser, apoptozun meydana gelmediği durumlardan biridir

ve hücreler apoptoz özelliğini kaybederek malign özellik kazanırlar. Apoptoz mekanizması karmaşıktır ve birçok yol içerir. Etkilenen hücrelerin malign transformasyonuna, tümör metastazına ve anti kanser ilaçlara karşı direnç yol açan bu yollar boyunca herhangi bir noktada sorun meydana gelebilir. Sorunun nedeni apoptoz olmasına rağmen, apoptoz, birçok tedavi stratejisinin popüler bir hedefi olduğu için kanser tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır (11). Akım sitometri ile henüz nükleer değişiklikler oluşmadan membrandaki erken değişiklikler sırasında bile apoptoz ölçülebilmektedir. Apoptoz geliştiğinde hücre membranının normalde iç kısmında bulunan fakat apoptoz ile hücre yüzeyine çıkan fosfatidilserine bağlanma özelliği gösteren Annexin V ile hücrelerde apoptoz tayini yapılabilmektedir (12). Bu tez çalışmasında yeni sentezlenen özgün AA türevinin etkisini bağımsız olarak MTX ile karşılaştırmalı ve sinerjistik etkiyi gözlemleyebilmek adına da birlikte MCF-7 hücrelerine uygulayarak apoptotik analizleri akım sitometri yöntemi ile inceledik. Tez çalışmasından elde edilen deneysel deneyim ve veriler hem meme kanseri tedavisindeki moleküler mekanizmaların aydınlatılması hem de bu amaçla yeni ilaç adayı moleküllerin geliştirilmesine önemli bir temel oluşturacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Kanser Biyolojisi

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile ortaya çıkan, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında oluşan kompleks bir hastalıktır. Dünyadaki ölümlerin büyük bir bölümü kanser hastalığı sebebi ile meydana gelmektedir (12). Karsinogenez süreci, hücresel fenotipte, büyük ölçüde, terminal olarak farklılaşmamış hücrelerde meydana gelen genetik değişiklikleri içerir. Kanser hücrelerinin büyüme yetenekleri sağlıklı hücrelere göre farklılık gösterir ve proliferasyon üzerindeki olağan kontrollere yanıt vermezler kanser hücreleri kontakt inhibisyon özelliğini kaybetmiş hücrelerdir. Bu hücreler programlı hücre ölümü olan apoptozdan da kaçarak ve çoğunun, bölünmesi sürekli olarak devam eder. Tüm bunların yanında düzenli bir oksijen ve besin kaynağı sağlamak için kan damarlarının oluşumunu uyarabilirler, normal dokuları istila edebilirler ve kanser hücreleri bağışıklık sistemini etkisiz hale getirirler (13).

Kanser hücreleri bir dizi değişiklik geçirmiş hücrelerdir. Bu değişiklikler hücrelerde kalıtsal bozukluklar meydana getirir. Kanser hücrelerinde bazı belirgin özellikler vardır (14).

- Büyümeyi uyarıcı sinyallerde bağımsızlığın gelişmesi
- Büyüme engelleyici (anti-büyüme) sinyallere karşı duyarsızlık
- Programlanmış hücre ölümünden kaçınma (apoptoz)
- Sınırsız çoğaltma potansiyeli
- Sürekli anjiyogenez
- Doku istilas

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, dünya çapında en yaygın üç kanserden biridir (15). Meme kanseri, kadınlarda en çok teşhis edilen malignite ve kansere bağlı ölümlerin en sık nedenidir (16).

Her sekiz kadından biri meme kanseri olma riskini taşır (17). Hala lokalize formda iken meme kanseri tespit edilen hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı % 98 olmak ile birlikte Evre III'te % 72 ve Evre IV' te sadece % 22' dir (18, 19). Erkeklerde ise meme kanseri riski zamanla artış göstermektedir (20). Meme kanseri gelişimi için risk faktörleri arasında; obezite, fiziksel egzersiz eksikliği, alkol kullanmak, menopoz sırasında hormon tedavisi, iyonlaştırıcı radyasyon, ilk adet kanamasında erken yaş, hayatın geç döneminde hamilelik veya hiç çocuk sahibi olmamak, ileri yaş, ailede meme kanseri öyküsü sayılabilir. Vakaların yaklaşık % 5-10' u, genetik bir yatkınlığın sonucudur, BRCA1 ve BRCA2 buna dahildir. Erkek meme kanseri gelişimi için en ilgili risk faktörü, BRCA2 genindeki bir mutasyondur. Erkek meme kanseri, androjen reseptörü (AR) dahil olmak üzere neredeyse tamamen hormon reseptörü pozitifdir (21). Çoğu vaka, erkeklerde böyle bir malignitenin varlığından haberdar olmama ve ilgili risk faktörleri konusunda bilgisizlik nedeniyle geç ortaya çıkar. Ek olarak, meme kanseri olan erkekler ikinci bir kanser geliştirme açısından özel risk altındadır (22).

Meme kanseri tipik olarak tümör küçük olduğunda semptom göstermez. Göğüs kanseri belirtileri memede bir yumru, meme şeklinde bir değişiklik, deride çukurlaşma, meme ucundan gelen sıvı (özellikle kanlıysa), ters çevrilmiş meme başı veya kırmızı veya pullu bir cilt yapısını içerebilir (23).

Meme kanseri hastalarında metastaz söz konusu olabilir. Hastalarda kemik ağrısı, şişmiş lenf düğümleri, nefes darlığı, veya sarı cilt görülebilir (24).

Göreceli hayatta kalma oranları, normal yaşam beklentisini hesaba katarak, tanıdan sonra belirli bir süre kanserinden kurtulacak hastaların yüzdesinin bir tahminidir. Kanser hastalarının hayatta kalması, kanser teşhisi konmamış aynı yaş ve ırktaki insanların hayatta kalması ile karşılaştırılır.

Göreceli sağkalım oranları, tüm kadınların ortalama deneyimine dayandığından ve bireysel prognozu tahmin etmediğinden dikkatle yorumlanmalıdır çünkü meme

kanserinin sağkalımını etkileyen birçok hasta ve tümör özelliği hesaba katılmaz. Ek olarak, uzun vadeli sağkalım oranları, yıllar önce teşhis ve tedavi edilen hastalardan elde edilen verilere dayanmaktadır ve bu nedenle, erken teşhis ve tedavide daha yeni gelişmeleri yansıtmamaktadır.

En son verilere göre, meme kanseri teşhisi konan kadınlar için göreceli sağkalım oranları:

- % 91 teşhisten 5 yıl sonra
- % 84 teşhisten 10 yıl sonra
- % 80 teşhisten 15 yıl sonra

Tanı anındaki evre, prognozu etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Meme kanseri için beş yıllık bağıl sağkalım oranları:

- Lokalize hastalık için % 99
- Bölgesel hastalık için % 86
- Metastatik hastalık teşhisi konan hastalar için %27 (25)

Meme kanseri alt tipi (HR / HER2)

Meme kanseri sağkalımını ayrıca tümör alt tipine göre değişir. Beş yıllık göreceli sağkalım oranları:

- HR + / HER2- için % 92
- HR + / HER2 + için % 89
- HR- / HER2 + için % 83
- HR- / HER2- için % 77

Önemli olarak, yakın zamanda yapılan bir çalışma, tüm meme kanseri alt tiplerinde evre I meme kanseri teşhisi konan hastalarda 4 yıllık göreceli sağkalımın % 95 veya daha fazla olduğunu buldu (26).

2.2.1. Meme Kanseri Moleküler Mekanizması

Genler, bir hücrenin sağlıklı kalması ve normal çalışması için ihtiyaç duyduğu çeşitli proteinlerin kodlarını içerir. Bazı genler ve yaptıkları proteinler, göğüs kanserinin nasıl davrandığını ve belirli bir tedaviye nasıl yanıt verebileceğini etkileyebilir. Bir

doku örneğinden alınan kanser hücreleri, hangi genlerin normal ve anormal olduğunu görmek için test edilebilir. Genlerin kodladığı proteinler de test edilebilir. Ek olarak, meme kanseri üzerinde çalışan araştırmacılar, yüksek riskle ilişkili 300' den fazla yaygın genetik varyant belirlemişlerdir (27). Meme kanseri ile ilişkili genlerden bazıları aşağıda verilmiştir.

BRCA1 ve BRCA2 tümör baskılayıcı proteinleri üreten genlerdir (28). İnsanlar tarafından kodlanan BRCA1 geni (29) omurgalı türlerinde yaygındır. Bu genler DNA'nın onarımından sorumludur (30).

BRCA1 ve BRCA2 genleri birbiriyle ilişkili olmayan proteinleri kodlarlar (31). Ancak her ikisi de normalde göğüs ve diğer doku hücrelerinde eksprese edilir ve burada hasarlı DNA' yı onarmaya yardımcı olur veya DNA onarılamazsa hücreleri yok ederler. DNA çift sarmalı üzerinde kırılmaların hatasız onarımında önemli bir rolle kromozomal hasarın onarımında rol oynarlar (32). BRCA1 veya BRCA2' nin kendisi bir BRCA mutasyonu nedeniyle hasar görürse, hasarlı DNA düzgün bir şekilde onarılmaz ve bu meme kanseri riskini artırır (33). Baskın alel, normal, tümör baskılayıcı bir işleve sahipken, bu genlerdeki yüksek kalıtsal mutasyonlar, meme kanseri riskinin artmasıyla bağlantılı olarak tümör baskılayıcı işlev kaybına neden olur (34).

PALB2 - BRCA1 ve BRCA2' den sonra, PALB2 şu anda en yaygın üçüncü meme kanseri genidir. PALB2, "BRCA2 İş Ortağı ve Yerelleştiricisi" nin kısaltmasıdır (35). Başka bir deyişle, DNA hasarını onarmak ve böylece meme kanserinin gelişmesini önlemek için BRCA2 geni ile ortak çalışır (36). Mutasyona uğramış bir PALB2 genine sahip kadınların tahmini % 35'i, 70 yaşına kadar meme kanseri geliştirecektir (37). PALB2 geninin sonradan yapılan çalışmalarda BRCA1 ile etkileşime girdiği de gösterilmiştir (38). Ailesel meme kanseri ile ilgili önceki çalışmalar, PALB2' deki işlev kaybı mutasyonları ile ilişkili olarak, mutasyonsuz taşıyıcılar arasındaki riskten iki ile dört kat daha yüksek risk tahminleri vermiştir (39, 40).

CHEK2 - "Kontrol Noktası Kinaz 2" veya CHEK2, tümör büyümesini baskılamaya yardımcı olan bir protein oluşturur. Mutasyona uğramış bir CHEK2 genine sahip olmak, kadınlarda meme kanseri riskini iki katına çıkarır. Erkeklerde erkek meme kanserinin oluşma olasılığını 10 kat daha fazla yapar.

CDH1 - CDH1 veya "CaDHerin 1", hücre gruplarının organize dokular oluşturmak için birbirine yapışmasına yardımcı olan bir tümör baskılama genidir. CDH1 genindeki bir mutasyon, lobüler meme kanseri veya memenin süt üreten lobüllerinde başlayan kanser riskini artırabilir. Gen normalde hücrelerin birbirine tutunmasını yardımcı olduğundan, bir mutasyon aynı zamanda daha kolay bireysel kanser hücreleri kopyalamak için çalışabilir ve meme tümörü yapabilir. yerleşimli malign tümörün vücudun diğer bölgelerine yayabilir.

PTEN - "Fosfataz ve TENsin homologu" (PTEN) geni, hücre bölünmesi oranını kontrol ederek tümör büyümesini önlemeye yardımcı olur. Ayrıca hasarlı hücrelerin kanserli hale gelmeden önce kendi kendini yok etmesine neden olur. CDH1 gibi, PTEN de hücrelerin birbirine yapışmasına yardım etmede rol oynar ve bu da kanserin yayılmasını önlemeye yardımcı olabilir.

STK11 - "Serin / Treonin Kinaz 11" başka bir tümör baskılayıcıdır. STK11 gen mutasyonları Peutz-Jeghers sendromuna neden olur. Peutz-jeghers sendromu Gastrointestinal sistemi etkileyen, bağırsaklarda ve midede hamartomalar denilen iyi huylu polip oluşumuna neden olan genetik bir hastalıktır. Peutz-Jeghers sendromu, meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türü için artan bir risk taşır.

TP53 - P53 olarak da bilinen (ve takma adı "genomun koruyucusu") "Tümör Proteini p53", bir hücrenin DNA'sının hasar gördüğünü tanır. Daha sonra ya bir DNA onarım genini (BRCA1 gibi) etkinleştirir ya da hücrenin kendi kendini yok etmesine neden olur. TP53 mutasyona uğramışsa, hasarlı DNA onarılmayacak ve hücre yaşamaya devam edecek, belki de bir kanser hücresi haline gelecektir. Bazı TP53 mutasyonları kalıtsal olsa da, çoğu bir kişinin yaşamı boyunca meydana gelir ve yalnızca kanserli hale gelen hücrelerde bulunur (41, 42).

2.2.2. HER2 Pozitif Meme Kanserin Moleküler Özellikleri

HER2' yi aşırı ifade eden gruptaki karsinomlar, HER2' nin kromozom 17'nin yakınında bulunan ve HER2 amplikonunun bir parçası olarak koordineli olarak amplifiye edilen GRB7 (büyüme faktörü reseptörü-bağlanmış proteinler örneğin tirozin-protein kinaz erbB-2) gibi diğer genler ile birlikte çoğaltılmasını gösterir (43, 44, 45). Daha önce de belirttiğimiz gibi HER2+ moleküler alt sınıfı daha kötü prognoza rağmen, neoadjuvan tedavi ve kemoterapide daha iyi yanıt verme eğilimindedirler. Endokrin tedaviye de daha duyarlılardır. 2017 yılında yapılan bir araştırmaya göre son

30 yıldır yapılan HER2 pozitif çalışmaları hem erken hem de ileri meme kanserlerinde önemli ilerleme kaydetmiştir. Bu başarılarla rağmen, HER2 pozitif meme kanserinden kaynaklanan sürekli yüksek ölümler, yeni tedaviler ve kombinasyonlar için sürekli, yoğun klinik araştırmaları gerektirmektedir (46).

Bu tez çalışmasında HER2 pozitif meme kanseri hücreleri olan; MCF-7 hücreleri üzerinde çalışma yapılmıştır.

MCF-7 hücreleri HER2 (ErbB2) onkogen amplifikasyonuna sahip değildir. Ancak HER2 çalışması için modellerin azlığı ve ER ile HER2 arasındaki potansiyel çapraz konuşma göz önüne alındığında, Osborne ve Benz, HER2' yi aşırı ifade eden MCF-7 hücreleri üretti (47).

Bu hücreler, anti-HER2 inhibitörlerinin büyümeyi nasıl engellediğini incelemek için mükemmel bir model olmuştur ve klinik çalışmalarda tercüme edilen ve doğrulanan bulgular olan çoklu anti-HER2 tedavilerinin aktivitesini doğrulamıştır (48).

2.2.3. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Kanser gelişimi ve ilerlemesinin altında yatan biyoloji karmaşıktır. Yüksek verimli teknolojilerden elde edilen son bulgular, meme kanserinde altta yatan genetik değişiklikler ve biyolojik olaylar ile ilgili önemli bilgiler ekledi. Bilgiler, meme kanseri hastalarının yönetimini etkileyen yeni tedavi stratejileri ve hasta sınıflandırmalarına ilişkin öngörüler sağlar (49).

Meme kanserleri, kanserin çevre dokuya yayılıp yayılmamasına göre invaziv olmayan ve invaziv olan meme kanserleri olarak ikiye ayrılır. Ayrıca İnflamatuvar meme kanseri ve metastatik meme kanseri de vardır.

İnvaziv olmayan meme kanserleri: Kanser olduğu yerde kalmış ve çevre dokuya yayılmamıştır. Eğer süt kanallarında (duktus) oluşmuş ve çevre dokulara yayılmamış ise orijinal yerinde Duktal karsinom (DCIS), süt bezlerinde (lobül) oluşmuş ve çevre dokulara yayılmamış ise yerinde Lobüler karsinom (LCIS), adını almaktadır (50). 2012 ve 2016 yılları arasındaki tüm meme kanserlerinin %16' sı DCIS' tir (51).

İnvaziv olan meme kanserleri: Kanser olduğu yerden çevre dokuya ilerlemiştir. Süt kanallarından (duktuslar) başlayan tipine İnvaziv duktal karsinom, süt bezlerinden (lobüller) başlayan tipine İnvaziv lobüler karsinom denilir (52). Genellikle meme kanserlerinin %81' i invaziv meme kanseridir.

Diğer yandan DCIS, tüm DCIS'lar ilerleme göstermese de, ilerleme gösteren DCIS invaziv kanserin öncüsüdür. Aslında, DCIS bazen o kadar yavaş büyür ki tedavi olmasa bile hasta sağlığını etkilemez. Uzun süreli çalışmalar, tedavi edilmemiş DCIS'li hastaların sadece % 20-53'ünün nihayetinde invaziv meme kanseri teşhisi konduğunu bulmuştur (53, 54).

İnflamatuvar meme kanseri, meme derisinin şişmesi ve kızarıklığı ile karakterize, nadir görülen ancak agresif bir meme kanseri türüdür. Metastatik meme kanseri ise evre 4 meme kanseri olarak sınıflandırılır. Kanser vücudun diğer bölgelerine yayılmıştır. Bu genellikle akciğerleri, karaciğeri, kemikleri veya beyni içerir. Bu tümörlerin biyolojik davranışları hakkında çelişkili veriler olmasına rağmen, birçoğu sarkoma benzeri davranışla agresif bir klinik seyir sergiler.

Meme kanseri tarihsel olarak tek bir hastalık olarak anılsa da, risk faktörleri, sunum, tedaviye yanıt ve sonuçlar açısından farklılık gösteren dört ana moleküler alt tip ve en az 21 farklı histolojik alt tipten (kanserin ortaya çıktığı doku tipi) oluşan bir grup hastalık olarak kabul edilmektedir.

2.2.3.1. Histolojik Alt Sınıflar

Meme kanserinin histolojisi temel olarak, kanser hücrelerinin boyutuna, şekillerine ve düzenlenme biçimlerine dayanır.

İnvaziv meme kanserlerinin % 75'inden fazlası artık histolojik olarak kategorize edilmektedir (55).

En yaygın özel histolojik alt tip, invaziv meme kanserlerinin yaklaşık % 15'ini temsil eden invaziv lobüler karsinomdur (55). Tübüler, müsinöz, cribriform ve papiller karsinom, genellikle olumlu prognozlarla ilişkilendirilen nadir meme kanseri alt tipleridir (56). Tübüler karsinom, tüm invaziv meme karsinomlarının % 3 ila % 5'ini oluşturur. Mükemmel prognoza sahip düşük dereceli bir kanserdir ve genellikle yaşlı kadınlarda görülür.

2.2.3.2. Moleküler Alt Sınıflar

Meme kanseri moleküler alt tipleri, şu anda standart klinik uygulama olmayan maliyetli ve karmaşık bir süreç olan gen ekspresyon analizi ile belirlenir. Bununla birlikte, bu alt tipler biyolojik belirteçlerin (östrojen reseptörü [ER], progesteron reseptörü [PR] ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 [HER2] reseptörü) (ER,

PR, HER2 vs.) kanserin reseptör veya tümör belirteci durumunu klinik değerlendirmesi için rutin yöntemler kullanılarak da gözlemlenebilir (57). Hormon reseptörü pozitif (HR +) kanserler, ER veya PR veya her ikisi için pozitif test yapan kanserlerdir. Kanserin derecesi ve proliferasyon (hücre bölünme hızı) hakkındaki bilgiler de bazen alt tip belirlemek için kullanılır.

Dört ana moleküler alt tip aşağıda açıklanmaktadır.

Luminal A (HR+/HER2-): Bu, en yaygın meme kanseri türüdür ve diğer alt türlere göre daha yavaş büyüyen ve daha az agresif olma eğilimindedir. Luminal A tümörleri, kısmen en iyi prognozla ilişkilidir çünkü bunlar genellikle hormonal tedaviye yanıt verirler (58,59).

Luminal B (HR+/HER2+): HR + olmasına ek olarak, bu alt tip başlangıçta klinik olarak HER2 için her zaman pozitif olarak karakterize edildi, ancak son zamanlarda protein Ki67 (çok sayıda aktif olarak bölünen hücrenin bir göstergesi) veya HER2 için oldukça pozitif olarak tanımlandı. Luminal B meme kanserleri, luminal A' dan daha yüksek dereceli olma eğilimindedir bunun sebebi sadece ER' leri ve / veya PR' leri ifade etmekle kalmaz, aynı zamanda aşırı HER2' yi ifade etmeleridir bu nedenle daha kötü sonuçlanır (58,59).

Bazal benzeri (HR-/HER2-): Bu kanserler, ER, PR ve HER2 (ER-, PR- ve HER2-) ekspresyonundan yoksundur bu nedenle üçlü negatif olarak da adlandırılır (60). Üçlü negatif meme kanserlerinin çoğunluğu (yaklaşık % 75), gen ekspresyon profili ile tanımlanan bazal benzeri alt tipe girer (61,62).

Üçlü negatif meme kanserleri, kısmen, tedavideki ilerlemelerin diğer moleküler alt tiplerin gerisinde kalması nedeniyle, diğer alt tiplere göre daha kötü prognoza sahiptir (63,64). Bu kanserler, ABD' deki beyaz kadınlara kıyasla siyah kadınlarda iki kat daha fazla görülüyor ayrıca menopoz öncesi kadınlarda ve BRCA1 gen mutasyonu olanlarda daha yaygındır (65). Üçlü negatif meme kanseri kendi içerisinde altı gruba ayrılır. Bazal benzeri 1 (BL1), bazal benzeri 2 (BL2), immünomodülatör (IM), mezenkimal benzeri (M), mezenkimal sap benzeri (MSL), lüminal androjen reseptörü (LAR) (66). (tablo 1)

HER2 ile zenginleştirilmiş (HR- / HER2 +): HER2 geni bazen neu proteinleri olarak da adlandırılır. Bu gen HER2 proteinlerini üretir. Normalde HER2 reseptörleri,

sağlıklı bir göğüs hücresinin nasıl büyüdüğünü, bölündüğünü ve kendi kendini onardığını kontrol etmeye yardımcı olur. Ancak HER2 genindeki bir mutasyon kendisinin çok fazla kopyasını oluşturur (HER2 gen amplifikasyonu olarak bilinir). Tüm bu ekstra HER2 genleri, göğüs hücrelerine çok fazla HER2 reseptörü (HER2 proteini aşırı ekspresyonu) meydana getirir. Bu, göğüs hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde büyümesini ve bölünmesini sağlar (67). Meme kanserinin en yaygın tipidir ve gelişmiş ülkelerde menopoz öncesi kadınlarda görülen meme kanseri vakalarının % 60-70' ini oluşturur (68).

Geçmişte, bu alt tip en kötü prognoza sahipti; ancak HER2 + kanserleri için hedefe yönelik tedavilerin yaygın kullanımı, bu hastalar için sonuçları önemli ölçüde iyileştirmiştir (63, 69, 70).

2.2.4. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

Meme kanseri tedavi yöntemleri; kanserin moleküler karakteristik özelliklerine ve meme kanseri hastasının yaşına, tercih ettiği tedavi çeşidine, tedavinin olası yararlarına ve zararlarına göre değişiklik göstermektedir. Genel olarak altı tedavi seçeneği vardır ve çoğu tedavi planı aşağıdakilerin bir kombinasyonunu içerir: ameliyat, radyasyon, hormon tedavisi, kemoterapi, immünoterapi ve hedefe yönelik tedaviler. Bazıları yereldir, sadece tümörün etrafındaki alanı hedef alır. Bazıları ise sistemiktir ve tüm vücudunuzu kanserle savaşan ajanlarla hedef alır.

2.2.4.1. Kemoterapi

Geleneksel sitotoksik kanser kemoterapisi genellikle bağışıklığı baskılayıcıdır. (immünosupresif). Bu ilaçlar spesifik olmayan bir şekilde bağışıklık yanıtlarını azaltır. Diğer yandan, bağışıklık sisteminin tümör büyümesini ortadan kaldırmasına veya baskılamasına yardımcı olurlar (71, 72). Tedavi sayesinde kanser hücreleri metastaz yapamaz ve hastanın ölmesi önlenir. Sistemik kemoterapi (ilaçların kan dolaşımı yoluyla tüm vücutta dolaşması), yaygın malign hastalıklar için mevcut ana tedavi yöntemidir (73).

Kemoterapinin yararları bir çok faktöre bağlıdır. Bu faktörler arasında Tümörün tipi, derecesi, boyutu ile birlikte reseptörlerin türü ve durumu, dahil olan lenf düğümlerinin sayısı ve tutulum derecesi, kanserin vücudun başka yerlerine yayılma riski sayılabilir. Üçlü negatif meme kanseri ve HER2 pozitif meme kanseri kemoterapiye

karşı HR+ kanserlere göre daha duyarlıdır (74). Kemoterapi bazen sitotoksik özellik gösterebilir. Kemoterapinin sitotoksik etkilerini ortadan kaldırmak için nano kapsülasyon geliştirilmiştir.

Kemoterapi genellikle hormonal ve hedefe yönelik tedaviler gibi diğer tedavi yöntemleriyle birlikte kullanılır. Neoadjuvan kemoterapi (küçültücü kanser tedavisi) olarak adlandırılan, daha kolay ve daha güvenli bir şekilde tümörün çıkarılabilmesi için ameliyattan önce bir tümörü küçültmek için de kullanılabilir (75). Bununla birlikte, mitoksantron, doksorubisin ve siklofosamid dahil olmak üzere bazı sitotoksik kanser kemoterapötik ilaçları, sağlam doğuştan gelen ve uyarlanabilir anti-tümör bağışıklık tepkilerini etkinleştiren ve kemoterapinin etkinliğini büyük ölçüde artırma potansiyeline sahip olan bir immünojenik hücre ölümü yolu ile tümör hücrelerini öldürebilir (76).

2.2.4.2. Cerrahi

Kanser tedavisinde başarıyla kullanılan ilk yöntemdir. Birçok yaygın katı tümör için tek iyileştirici tedavidir. Başarılı bir cerrahi tedavinin en önemli belirleyicisi uzak metastaz olmamasıdır (77).

2.2.4.3. Radyasyon Tedavisi

Kanser tedavisinde kullanılan yerel bir yöntemdir. Radyasyon tedavisi radyoterapi olarak da adlandırılır. Kanser hücrelerini öldürmek için yüksek enerjili ışınlar kullanır. Sadece vücudun radyasyonla tedavi edilen bölümündeki hücreleri etkiler. Radyasyon tedavisi genellikle göğüs, göğüs duvarı veya koltuk altı bölgesinde kalan kanser hücrelerini yok etmek ve nüks riskini azaltmak için ameliyattan sonra kullanılır. Cerrahi yöntemi hemen hemen her zaman radyasyon tedavisi izlemektedir çünkü kanserin nüksetme riskini 10 yılda yaklaşık % 50 ve meme kanseri ölüm riskini 15 yılda neredeyse % 20 azalttığı gösterilmiştir (78). Ancak, çalışmalar, radyasyonun hormonal tedavi alan küçük, lenf nodu negatif, HR + kanserli 70 yaş ve üstü meme kanseri hastaları için sağkalımı iyileştirmediğini, ancak yerel nüks riskini azalttığını göstermiştir.

2.2.4.4. Hedefe Yönelik Tedavi

Kişiye özel gen analizlerinin yapılabilmesi ve kişisel gen profillerinin çıkarılmasıyla birlikte tespit edilen tümör mutasyonlarına özel, kişiselleştirilmiş ilaçların ve kanser tedavilerinin doğmasına imkan sağlamıştır. Bu tedavi, kanser

hücrelerinin nasıl büyüdüğünü, bölündüğünü ve yayıldığını kontrol eden proteinleri hedefleyen bir kanser tedavisi türüdür. ABD' deki tüm kadın meme kanserlerinin yaklaşık % 15' ini oluşturan HER2 + alt tipinin tedavisi için birden fazla ilaç mevcuttur. Onaylanmış ilk ilaç olan trastuzumab, HER2 proteinini doğrudan hedefleyen bir monoklonal antikordur (79). HER2 proteinini hedefleyen ve trastuzumab ile kombinasyon halinde veya trastuzumab artık çalışmıyorsa kullanılabilen birkaç yeni ilaç geliştirilmiştir. Tüm invaziv meme kanserleri, bu tedaviden fayda sağlayacak kadınları belirlemek için HER2 için test edilmelidir. CDK4 / 6, PARP ve PIK3 inhibitörleri gibi ek hedefli tedavi ilaçları, ilerlemiş hastalığı olan seçilmiş hastaların tedavisi için mevcuttur (80).

2.2.4.5. Hormon Tedavisi

Meme kanseri tedavisi kapsamında cerrahi operasyonları ve kemoterapileri tamamlamış hastalara, eğer tümörleri östrojen ve/veya progesterona duyarlı ise (tümörleri hormon reseptörü taşıyorsa) yapısal olarak bu hormonlara benzer ancak baskılayıcı özellikte hormon ilaçları (hormonoterapi) verilir. En yaygın hormon tedavisi ilacı Tamoksifen' dir. Hücrelerdeki östrojen şeklindeki açıklıkları tıkayarak östrojen kaynaklı kanserlerin büyümesini engeller (81). Genel olarak, hormon tedavisi ve kemoterapiyi birlikte kullanmanın faydaları, tek başına kullanmaktan çok daha büyük bir kombine etkiye sahiptir.

2.2.4.6. İmmünoterapi

İmmünoterapi ilaçları meme kanseri tedavisinin gelişmekte olan bir alanıdır. Bu ilaçlar, bir kişinin kendi bağışıklık sistemini kanser hücrelerini daha etkili bir şekilde tanıması ve yok etmesi için uyarır. Kontrol noktası inhibitörleri, bazı meme kanserlerini, özellikle üçlü negatif alt tipi tedavi etmek için tanımlanan bir tür immünoterapi ilacıdır. Bu kontrol noktalarını hedef alan ilaçlar, göğüs kanseri hücrelerine karşı bağışıklık tepkisinin yeniden kazanılmasına yardımcı olur. Atezolizumab, PD-L1 “kontrol noktası” nı hedefler ve tümörü PD-L1 proteinini oluşturan, ilerlemiş üçlü negatif meme kanseri olan hastalarda kemoterapi ilacı nab-paklitaksel ile birlikte kullanılabilir (82). Metastatik meme kanseri tedavisi için diğer immünoterapi ilaçları üzerine araştırma devam ediyor.

2.3. MTX

AA türevlerinin en yaygın örneği olan Amino mitoksantron isimli ilaç ilk olarak 1979 yılında sentezlenmiştir (83). MTX ($C_{22}H_{28}N_4O_6 \cdot 2Cl \cdot H$) sitotoksik antibiyotik sınıfına dahildir (84). İlacın anti tümör aktivitesinin yanında anti viral ve anti bakteriyel etkileri de mevcuttur (85). MTX başlıca meme, lösemi, akut miyeloid lösemi ve non-hodgkin, lenfoma kanserlerinin tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (86, 87). MTX ile yapılan çalışmalarda klasik kemoterapötik ajanların yanında düşük dozda sitotoksikite gözlemlendiği görülmüştür. MTX meme kanserine karşı en yaygın kullanılan AA'lardan biridir (88). İnsan meme kanseri MCF-7 hücreleri üzerinde birçok çalışma yapılmıştır (89, 90).

MTX, kötü prognozlu hastaların önemli bir kısmında hastalığı stabilize eder ve ayrıca objektif yanıtlarla sonuçlanabilir. Bölgesel uygulamayı takiben MTX, kötü huylu efüzyonların tedavisinde özellikle yararlı görünmektedir. ayrıca çeşitli diğer kombinasyon kemoterapötik rejimlerde de yararlı olduğu kanıtlanmıştır (91).

MTX'nun anti-kanser etkisi, DNA ile etkileşime girme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır, burada topoizomera II ile kovalent bir kompleks oluşturarak replikasyon sırasında DNA ipliklerinin yeniden birleşmesini engelleyebilir ve bu nedenle DNA çift iplikli kırılmaya neden olur (92, 93). Sonuç olarak MTX, DNA replikasyonunu ve RNA transkripsiyonunu inhibe eder ve ayrıca çeşitli aşamalarda hücre döngüsünü etkiler (94).

Geniş kullanımına rağmen MTX, doza bağlı bir şekilde geri dönüşü olmayan bir şekilde kardiyotoksikite, lökopeni, böbrek yetmezliği ve ekstremitelere neden olabilir (95, 96). Bu nedenlerden dolayı, yan etkilerini hafifletmek için dikkatli bir değerlendirmeye ihtiyacı vardır (97).

Ayrıca kemoterapik ilaçlar kombinasyon halinde de uygulanmaktadır. Yapılacak olan tez çalışmasında yeni sentezlenmiş olan AA türevi ile MTX'nun sinerjik etkisi de araştırılmıştır.

2.4. Apoptoz

Apoptozis veya Apoptoz, Yunanca: apoptosis yani "düşmek, ayrılmak" anlamına gelmektedir (98). Apoptoz; genetik sistemde kodlanmış kendi kendini yok etme (özyıkım; intihar) programını içeren mekanizmanın aktifleşmesiyle meydana gelmeye

başlar. Birçok hücre, fetal gelişim sırasında programlanmış hücre ölümüne veya apoptoza maruz kalır. Gelişim sırasında ölen hücrelerin öngörülebilir zaman süreci ve konumu, bir organizmanın yaşam döngüsü boyunca avantajlar sağlar. Apoptoz oldukça düzenlenmiş ve kontrollü bir süreçtir. Programlanmış hücre ölümü terimi bu kavramı belirtmek için kullanılabilir. Zamana ve konuma bağlı olarak, gelişim sırasında programlanmış hücre ölümünün temel rolleri - doku yayılması ve kapanması, vücut yarımlarının birleşmesi, lümen oluşumu, çatallanma, ilkel organların gerilemesi ve hücre farklılaşması vb. şeklinde gösterilebilir (99). Örnek olarak gelişme evresinde olan insan embriyosunda el parmak ve ayak parmaklarının ayrılması, parmaklar arasında bulunan hücrelerin apoptoza uğraması nedeniyle oluşur.

Kanser hücreleri genellikle bu mekanizmanın artık çalışmadığı hücrelerdir. Normalde apoptozla yok edilmeleri gereken hücreler yaşamı boyunca ortaya çıkan genetik anormalliklere rağmen hayatta kalırlar ve çoğalırlar.

2.4.1. Apoptoz ve Kanser Gelişimi

Apoptoz, tümör gelişimi ve diğer patolojik süreçler sırasında olduğu gibi, bir hücre hasar gördüğünde veya düzensiz hale geldiğinde de meydana gelebilir. Böylece, düzgün çalıştığı zaman vücut apoptozu kanser hücrelerinden kurtulmak için indükleyebilir. Apoptoz mekanizması ile ileride ortaya çıkabilecek sorunlar önlenir (100).

Bir mutasyon p53' ü inaktive eder, normalde apoptozu tetikleyebilen genini, ikinci mutasyon adı verilen bir proto-onkogeni etkiler. BCL-2, hücre intiharını engelleyen bir proteini kodlar. Mutasyona uğradığında, BCL-2 geni aşırı miktarda BCL-2 proteini üretir ve bu da apoptoz programının aktive olmasını engeller. B lenfositlerinden kaynaklanan kötü huylu lenfomalar bu BCL-2 davranışını sergiler. BCL-2 geninin değişmesi, geni kalıcı "açık" konumda tutan bir kromozomal translokasyondan kaynaklanır. BCL-2 değişikliği apoptoza erişimi tamamen engellerken, p53 işlevinin kaybı hücreleri yalnızca belirli intihar türlerinden korur.

2.4.2. Meme Kanseri Apoptoz

Normal meme gelişimi, hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki bir denge ile kontrol edilir ve tümör büyümesinin sadece kontrolsüz proliferasyonun değil, aynı zamanda azalmış apoptozun bir sonucu olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır.

Proliferasyon ve apoptoz arasındaki denge, kemoterapi, radyoterapi ve daha yakın zamanda hormonal tedavilere yanıt olarak tümörün genel büyümesini veya gerilemesini belirlemede çok önemlidir (101). Bunların tümü kısmen apoptozu indükleyerek etki eder (102, 103). Böylelikle apoptozun düzenlenmesini inceleyerek moleküler ve biyokimyasal düzeyde tümörlerin biyolojisini tanımlamak ve bunları klinik tedavilerde kullanmak mümkündür.

Genellikle apoptoz ve hücre çoğalması birlikte analiz edilir. Apoptoz ve proliferasyon arasındaki denge kavramı, bir tümördeki genel hücre ölümü ve proliferasyon indeksleri olarak mitotik ile apoptotik oranların araştırılmasıyla sonuçlanmıştır (104).

Meme kanseri tedavisinde apoptozu hedefleme; Meme kanserinin ilerleme sürecinde normal hücreler, genetik değişikliklerin bir sonucu olarak malign tiplere dönüşür. Bu, anjiyogenez, hücre döngüsü ve apoptoz gibi hücresel süreçlerin düzensizliğine yol açar (105). Bu nedenle, mevcut tedavi stratejileri kanserle savaşmak için bu yolları, özellikle apoptozu hedef alır (106). Hücrelerin hücresel hasarlı olduğu tespit edilirse apoptozu uğrarlar (107). Apoptoz, ölüm reseptör yolu ve mitokondriyal yol olarak adlandırılan ve sonuçta apoptoz indüksiyonuna yol açan kaspaz kaskadıyla yayılan iki ana yoldan oluşur (108). Karsinogenez sırasında apoptozdan kaçınma üç farklı mekanizma ile gerçekleşir: ölüm reseptörlerinin bozulmuş sinyalleri, kaspaz aktivitesi kaybı ve ayrıca anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arasında bozulmuş denge (109, 110). Kaspaz kaskadını hedefleyen Bcl-2 ailesi proteinleri ve ayrıca apoptoz sinyalleme ile ilişkili diğer faktörlerdir. Böylece antikanser terapötiklerinde apoptoz ana strateji haline gelmiştir (111).

2.4.3. Normal Memede Apoptoz

Meme, doğumdan sonra ergenlik ve gebelik olmak üzere iki ayrı fizyolojik durumda gelişimini tamamlayan birkaç organdan biridir. Bu aşamalar sırasında meme hücreleri çoğalmasında ve farklılaşmasında gözle görülür değişiklikler olur. Bcl-2 ailesinin apoptotik düzenleyici proteinlerindeki değişiklikler kısmen östrojen ve progesteronun etkisine bağlı olarak meydana gelir. Gelişmekte olan meme kanallarının uçlarındaki hücreler, hamileliğin başlangıcına kadar mitotik olarak hareketsiz kalır. Daha sonra, ek duktal dallanma ve lobüloalveolar büyüme ile hızlı epitel proliferasyonu meydana gelir. Emzirmeden sonra, evrime ve birincil yapıya dönüşe yol açan büyük

çaplı yeniden yapılanma ve apoptoz vardır (112). Hamileliğin yokluğunda, menopozla birlikte kademeli bir seri evrim sürecini takip edene kadar menstrüasyona (hormanol döngü içerisinde özellikle östrojen ve progesteron) paralel olarak dinlenme durumunun tekrar tekrar döngüsü vardır. Apoptotik değişikliklerin çoğu, terminal kanalın lobüler biriminde meydana gelir (113). Adet döngüsü boyunca döngüsel değişiklikler ve adet döngüsünün sonuna yakın bir apoptoz zirvesi. Birkaç gün önce bir çoğalma zirvesi meydana gelir. Meme bezi boyunca hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve ölümü arasındaki dengenin normal gelişim ve homeostaz için kritik olduğu açıktır.

2.4.4. Meme Kanseri Gelişimi Tarihinde Apoptoz

Epitel dokusunda karsinogenez sırasında genetik mutasyonlar birikir ve hücrel işlevlerde kayıp meydana gelir. Hücrelerin fenotipi normalden bir dizi kötü huylu lezyona, yüzeysel kansere ve nihayet invaziv hastalığa dönüşür . Genel olarak bu süreçler uzundur ve göğüs kanserinin klinik görünümünden 30 yıl öncesine kadar meydana geldiğine inanılmaktadır (114). Kanser oluşumunun ilk aşamalarında hücre döngüsünün apoptoz, proliferasyon ve düzenleyici biyobelirteçlerinde büyük değişiklikler vardır.

Invaziv meme kanseri olan doku ile çevresindeki normal meme epitelindeki hücreler incelendiğinde, invaziv meme kanseri dokusunda apoptozun azaldığı gözlemlenir (115). Mommers ve arkadaşları, invaziv karsinoma ile preinvaziv duktal karsinom karşılaştırıldığında mitotik: apoptotik indekslerde farklılıklar göstermiştir (116). Yerinde zayıf duktal karsinoma ile invaziv karsinom karşılaştırıldığında, farklılaşmış invaziv meme kanserlerinde apoptozda göreceli bir azalma görülmektedir. Daha iyi prognozlu, iyi farklılaşmış kanserlerde artan proliferasyon için apoptoz alternatif bir mekanizma olarak görülmektedir (117). Ayrıca düşük apoptoz seviyelerinin kötü prognostik özellik olduğu belirtilmektedir (118).

2.4.5. Kemoterapi İle Apoptozdaki Değişiklikler

Model sistemlerde, kemoterapiye yanıt olarak apoptozun yerleşik rolü, bunun meme kanserinin tedavileri üzerinde iyi bir öngörücü veya orta belirteci olmasının muhtemel olduğunu göstermektedir. Erken dönem meme kanserinde ameliyat öncesi kemoterapi, apoptozdaki değişikliklere eşlik eden ve tedaviye yanıtı belirleyebilen benzersiz bir *in vivo* insan modeline izin verir (119, 120). Ameliyat öncesi kemoterapi öncesinde, sırasında ve sonrasında alınan biyopsi örnekleri (veya ince iğne aspiratları)

yanıtı, nüksetmeyi veya sağkalımı tahmin edebilen biyobelirteçler veya biyobelirteçlerdeki değişiklikler açısından incelenebilir.

Kemoterapiye başladıktan sonraki 24 saat içinde meme tümörlerinde apoptozda ölçülebilir artışlar meydana gelir (121). Bu aynı zamanda hücre çoğalmasının azalmasıyla da ilişkilidir (122).

2.4.6.Meme Kanserinde Apoptozla İlgili Proteinler Ve Tedavisi

Hücre ölümüne giden yolun temel mekanizması, türler boyunca büyük ölçüde korunmuş birkaç kritik proteine indirgenebilir. İnsanlarda bu düzenleyiciler, çeşitli dokularda ayrı ayrı ifade edilen birçok homologa sahip çok genli aileler olarak bulunur. Bcl-2 ailesi (apoptoz inhibitörleri ve destekleyicileri içerir) ve p53 tümör baskılayıcı geni, göğüs kanserinde kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (123).

Bcl-2 gen ailesi, apoptozu teşvik edebilen veya inhibe edebilen proteinleri kodlar. Proapoptotik proteinler arasında Bax, Bak, Bad ve Bcl-x s bulunurken, Bcl-2 ve Bcl-x L antiapoptotiktir. İnsanlarda, Bcl-2 meme kanserlerinin yaklaşık %80' i olarak ifade edilir (124). Östrojen ve progesteron reseptörlerinin ekspresyonu ile ilişkilidir - meme kanserinde iyi prognostik özellikler. Bir apoptoz inhibitörü ile iyi prognostik özellikler arasındaki bu şaşırtıcı ilişki, negatif olanlara kıyasla Bcl-2 pozitif tümörlü hastaların sağkalımının artmasıyla doğrulanır. Bax proteini ile sonuç arasındaki büyük korelasyonlar gözlenmemiştir, ancak çalışmalar Bax'ta azalmaların metastatik meme kanserinde kemoterapiye zayıf yanıtla ilişkili olduğunu göstermiştir (123, 124). Daha yakın zamanlarda, apoptozu bloke eden çok işlevli bir protein olan BAG-1, erken evre meme kanserinde iyileşmiş hayatta kalma ile ilişkilendirilmiştir (125). Yine, bir inhibitör proteindeki bu görünüşte çelişkili bulgu, bu proteinlerin çalıştığı karmaşık mekanizmaları yansıtır: BAG-1' in, Bcl-2 ailesinin diğer üyeleri ve ayrıca ısı şoku proteinleri ve östrojen reseptörleri ile etkileşime girdiği bilinmektedir.

P53' ün protein ürünü, apoptoz, hücre döngüsü ve DNA' nın onarımında yer alan hücresel fonksiyonları kontrol eder (126). Bu gendeki mutasyonlar, kanserdeki en yaygın mutasyon olaylarıdır. Gendeki mutasyonlar veya p53 proteininin artmış ekspresyonu (bu genellikle proteinin stabilizasyonu ile sonuçlandığı için dolaylı bir mutasyon belirteci), bazı çalışmalarda meme kanserinin kötü prognozu ile ilişkilendirilmiştir (127).

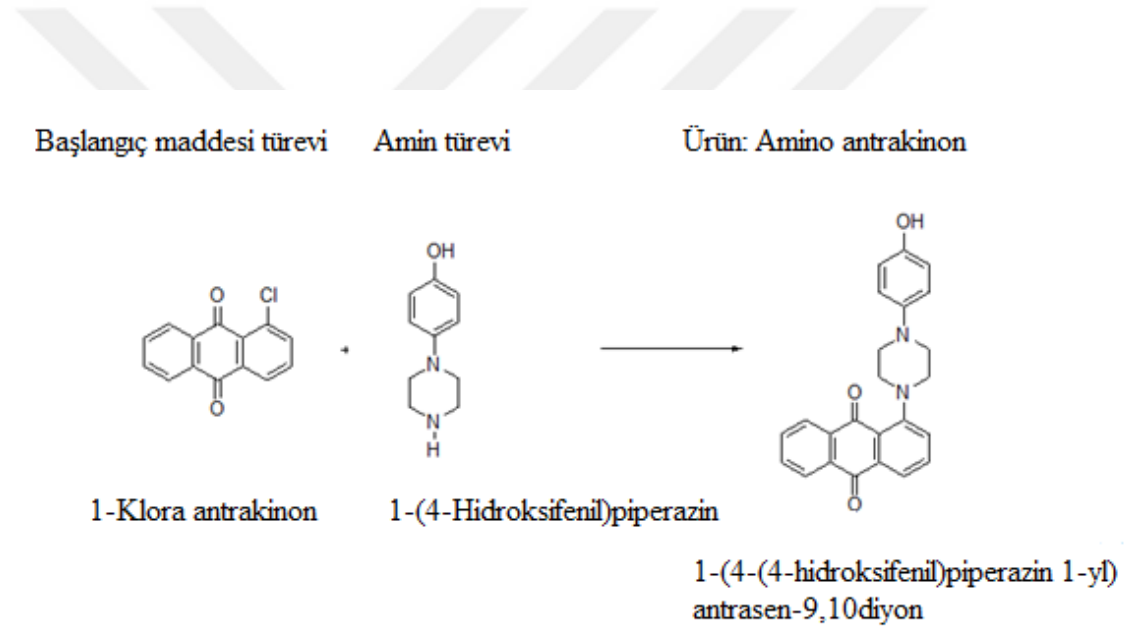
Apoptozla ilgili araştırılan yeni biyobelirteçler arasında kaspazlar, apoptozun temel hücre içi efektörlerini oluşturan proteolitik enzimler (“hücre ölümünün ana uygulayıcıları”) yer almaktadır. Şimdiye kadar insanlarda 11 kaspaz tespit edildi. Memelilerde yaklaşık 14 kaspaz tanımlanmıştır (128). Kaspazlar, hücre içi bir proteolitik kaskad yoluyla bölünme yoluyla aktive olan inaktif zimojenler olarak sentezlendiğinden, apoptotik yolun hem başlatıcıları hem de efektörleri olarak hareket edebilirler. Aktivasyon ve aktivitenin düzenlenmesi çeşitli seviyelerde gerçekleşir ve bazı durumlarda prokaspazları bloke eden Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyelerini içerir (129). İnsan göğsünden alınan kanserli dokudaki bu proteinler üzerinde sınırlı çalışma yapılmıştır, ancak kaspaz 3, 6 ve 8' in daha yüksek seviyelerde apoptoz ve histolojik derece ile ilişkili olduğuna dair göstergeler vardır (130). Apoptoz inhibitörleri olan yakın zamanda tanımlanan gen ailesinin de prediktif veya prognostik biyobelirteçler olarak büyük potansiyeli olabilir. Bu genler, çoğu durumda kaspazları doğrudan bağlayarak ve inhibe ederek apoptozu önleyen bir grup proteini (XIAP, cIAP1, cIAP2, NIAP ve insanlarda survivin) kodlar. XIAP, en güçlü inhibitörlerden biri olarak ortaya çıkmıştır ve akut miyeloid lösemide olumsuz bir prognostik belirteç olduğu gösterilmiştir.

2.5. AA

AA'lar ve türevleri meme kanseri üzerinde (MCF-7 hücrelerinde) çalışılmış ve anti kanser özellik gösterdikleri ortaya konulmuştur (131). Yeni sentezlenmiş AA türevi ile ilgili olarak kemoterapik kanser ilaçlarını inceleyecek olursak, AA'lar kanser ilacı olarak günümüzde kullanılmaktadırlar (132). Emodin, AA türevidir, hepatik karsinom üzerinde anti kanser özellik göstermektedir (133). Diğer yeni bir AA türevi IMP1338, p53' ten bağımsız S ve G2 / M hücre döngüsü durması ile insan kanser hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır (134). AA türevi olan BSU1051 kansere karşı etkili olmaktadır. AA türevi olan mitoksantron ileri meme kanserinde kullanılan bir ilaçtır (135). AA türevlerinin kanser mekanizmaları üzerinde anti kanser etkiler göstermeleri araştırmacıların giderek ilgisini çekmeye başlamıştır (136). Apoptoz (programlanmış hücre ölümü) , hücre döngüsünde görülen normal bir fizyolojik süreçtir (137). Hücreler apoptoz yeteneklerini kaybettiklerinde, sürekli bölünmeye başlarlar ve tümör oluşumu meydana gelir (138). Apoptoz mekanizmasındaki meydana gelen değişiklikler MCF-7 hücrelerinde apoptoz yeteneğinin kaybedilmesi ile insan meme

kanserine sebep olabilir (139). AA türevi olan DHAQC 2 apoptozu aktive ettiği kanıtlanmıştır. DHAQC 2 , MCF-7 hattında apoptoz indüksiyonunda potansiyel gösteren sentetik, sitotoksik ve seçici bir antrakinon türevidir (140). Akım sitometri yöntemi kullanılarak sonuca varılmıştır. Kanser tedavisi için yapılan birçok çalışmada AA'lar ve türevleri ile kanser üzerinde ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır (141).

Bu tez çalışmasında MCF-7 hücreleri üzerinde araştırılması yapılan AA kapalı formülü $C_{24}H_{20}N_2O_3$ şeklindedir ve molekül ağırlığı 384, 43 g/mol'dur. Başlangıç maddesi: 1-Kloro antrakinon. Amin türevi: 1-(4-Hidroksifenil) piperazin. Ürün (Amino antrakinon türevi): 1-(4-(4-hydroxyphenyl)piperazin-1-yl) anthracene-9,10-dione şeklindedir (Şekil 2-1).



Şekil 2-1:Amino antrakinon maddesinin yapısı.

2.6. Nanopartiküller ve Kanser Tedavisindeki Roller

Yeni ilaç adayı moleküllerin geliştirilmesinde biyoyaralanımını arttırmak için önemli yollardan biri, başka ajanlarla kombinasyon veya nanopartikülleri kullanmaktır. Nanopartiküller, enkapsüle edilen ilaçların veya ilaç adayı moleküllerin terapötik etkilerini arttırması, enzimatik yıkımdan korumaları, kontrollü salınım sağlamaları ve kan dolaşımında uzun süre kalmalarını sağlar. Tüm bunların yanında toksisitelerini azaltmakla birlikte spesifik olmayan bağlanmalarıda sınırlamaktadır (142). Ayrıca kemoterapi uygulanırken ilaçlar kombinasyon halinde de verilebilir. Tarihsel olarak, kombinasyon kemoterapisi birincil tedavi seçeneği olmuştur. Bununla birlikte,

kemoterapötikler, aralarında stabilite ve sulu çözünürlük ile ilgili problemleri içeren farmasötik sınırlamalara sahiptir. Benzer şekilde, doz sınırlayıcı toksisite, sağlıklı hücrelere özgü olmayan toksisite, saç dökülmesi, iştah kaybı gibi tipik yan etkiler olması önemli problemlerdir. Nanoteknoloji kanser tedavisinde, kemoterapi uygulanması sırasında meydana gelen olumsuzlukları önlemek için yeni çözümler sunar. Hedeflenen tedavi için geliştirilmiş partiküllerin üretilmesi yoluyla sistemik toksisiteyi en aza indirme potansiyeline sahiptir (143, 144). Bu tez çalışmasında yeni sentezlenmiş olan madde nanopartikül haline getirilerek uygulanmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kimyasal Maddeler

DMEM – F12 W/ stable Glutamine w/ Mm Hepes (Biowest)

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco)

FBS (Fetal Bovine Serumu) (Gibco)

Penicillin-Streptomycin (Gibco)

PBS (Phosphate Buffered Saline)

DMSO (Dimetil sülfoksit)

Mitoxantrone dihydrochloride (Sigma)

Distile su

MTT (Sigma)

Amino antrakinon (1-(4-(4-hydroxyphenyl)piperazin-1-yl)anthracene-9,10-dione)

Sodyum Aljinat (Sigma)

Kalsiyum klorür (Sigma)

Tween20 (Sigma)

Sülfaktat (Sigma)

Tripsin-EDTA (% 0.25) (Gibco)

Anneksin V bağlama tamponu (Exbio)

PI (Exbio)

Anneksin V-FITC (Exbio)

Hidrojen peroksit (H₂O₂)

3.1.2.Kitler

ApoFlowEx FITC Kit (Exbio)

3.1.3.Cihazlar

Distile su cihazı (GFL)

Etüv(Sanyo)

Flow Cihazı (ACEA biosciences, Inc. NovoCyte)

Derin dondurucu (-80 °C) NUARIRE)

Laminar Hava Akım Cihazı ELB 2472 (Heraus)

Manyetik Çalkalayıcı (BioSan)

Manyetik çalkalayıcı (Stuart)

Otoklav

Santrifüj (Hettich)

Santrifüj (nüve NF 200)

Santrifüj (nüve NF 1200R)

Liyofilizatör (Alpha 1-2 Dplus)

Sıvı Azot Tankı (34 XT Taylor-Wharton) Synergy HTX

Synergy HTX plate okuyucu (BioTek)

Ters Mikroskop (Olympus)

Vorteks (Biosan)

Enjeksiyon cihazı (IPS-2 inovenso)

FT/IR-6600 (JASCO)

V-750 Spektrofotometre (JASKO)

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Hücrelerin Çoğaltılması

Çalışmada kullanılan MCF-7 insan meme kanseri hücresi ve İnsan göbek damarı endotel hücreleri (HUVEC) % 10 FBS ve % 1 antibiyotik (100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin) içeren CDMEM içerisinde kültür flakslarına ekilerek 37 °C % 5 CO₂ 'de standart kültür koşullarında çoğaltıldı. Hücreler flask yüzeyini tam kaplayacak veya %80 kaplayacak duruma geldikten sonra hücre kazıyıcısı ile flask yüzeyinden kazındı ve 15 ml 'lik falkon tüp içerisine alındı ve 3000 devir/dakika' da 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvıları atıldı. Pelet haline gelen hücrelerin üzerine 1-2 ml yeni medyum eklendi ve çözelti oluşturuldu. Hücreler taze medyum bulunan flask içerisine çoğaltılmak üzere bırakıldı. Bu şekilde 2-3 günde bir kontrol edilen hücrelerin, belirli aralıklarla yeni pasajları yapıldı.

3.2.2. Hücrelerin Dondurulması ve Çözülmesi

Hücre kazıyıcısı ile kültür flaskından kazınan hücreler, 15 ml'lik santrifüj tüplerinde 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırılarak kriotüp içerisine alındı. Tüp içerisinde 1/9 oranında DMSO-FBS içerisine 5×10^6 hücre konuldu. Hücreler 24 saat -80°C'de bekletildikten sonra sıvı azot tankına (-196 °C) aktarıldı. Hücreler çözülmek için sıvı azottan çıkarıldı. İçerisine 2 ml CDMEM koyulan 15 ml'lik falkonların içerisine alındı. 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası üst sıvı atıldı . Pelet 1 ml CDMEM ile çözüldü ve kültür flasklarına alınarak etüve kaldırıldı.

3.2.3. Hücrelerin Sayılması ve Ekilmesi

Hücreler sayımı yapılmadan önce flask yüzeyini tamamen kaplayan MCF-7 hücrelerinin ve HUVEC üzerindeki medyum uzaklaştırıldı. Flask yüzeyi 3-4 ml PBS ile kaplandı iki dakika bekletildi ve PBS hücre ortamından uzaklaştırıldı. Hücrelerin yüzeyini kaplayacak şekilde 3 ml Trypsin EDTA eklendi. Hücreler 4 dakika 37° C'de % 5 CO₂ ' li inkübatörde bekletildi. Flask yüzeyine tutunan hücreler, 4 dakika sonra kontrol edildi ve hücrelerin flask içinde yüzer duruma geçtiği gözlemlendi. Hücreler ve tripsin EDTA karışımı içerisinde 3-4 ml yeni medyum bulunan 15 ml' lik falkon tüplerin içerisine alındı ve 3000 devir/dakika' da 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvıları

atıldı. Pelet haline gelen hücrelerin üzerine 1-2 ml yeni medyum eklendi ve çözelti oluşturuldu. Çözelti içerisinde 10 µl alındı ve thoma lamı üzerine koyuldu, hücre çözeltisinin üzeri lamel ile kapatıldı.

Canlı hücre sayısı = Bir karedeki hücre sayısı $\times$ Dilüsyon faktörü $\times 10^4$

formülü ile hesaplandı. MCF-7 hücreleri ve HUVEC , 96 kuyulu düz tabanlı platelere 200 µl içerisinde her kuyuda 5×10^3 hücre olacak şekilde ve 6 kuyulu düz tabanlı platelere her kuyuda 1 ml içerisinde 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi.

3.2.4. AA hazırlanması

Özgün AA molekülü İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Kimya bölümü, Organik Kimya Anabilim Dalı'nda yapılan ‘‘Amino ve Tiyo Antrakınon türevlerinin sentezlenmesi ve karakterizasyonu ‘’ isimli doktora tezi çalışmasında sentezlendikten sonra kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırıldı. Saflaştırılan amino antrakınon molekülünün kimyasal spektroskopik yöntemlerle (NMR , MS, FT-IR , UV vb.) analiz çalışmaları yapıldı.

3.2.5. Hücre Canlılık Testi

96 kuyulu düz tabanlı plakalara her kuyuda 200 µl CDMEM içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilen MCF-7 hücreleri 37°C’de % 5 CO₂’ li inkübatörde 24 saat bekletildi. Hücreler üzerine üçlü gruplar halinde MTX, AA ve MTX+AA maddelerinin uygulaması yapıldı. AA için 3, 15, 30, 75, 150 µM olacak şekilde artan konsantrasyonlar kullanıldı. MTX için 2, 4, 10, 20, 30, 40 µM olacak şekilde artan konsantrasyonlar kullanıldı. Literatür araştırmaları sonucu ve bu tez çalışmasında yapılan MTT testi sonuçlarından elde edilen veriler Graphpad programı ile analiz edildi. MTX IC₅₀ değerinin 30 µM olduğu saptandı (130). AA ve MTX’in sinerjistik etkisini gözlemleyebilmek için 30 µM MTX ile birlikte 3, 15, 30, 75, 150 µM AA sırası ile uygulandı. Madde uygulaması yapılan hücreler 24 saat 37° C’de % 5 CO₂’ li inkübatörde bekletildikten sonra, 200 µl medyumlu kuyuların içerisine 20 µl MTT eklenerek 4 saat süre ile inkübe edildi. 4 saatin sonunda kuyulardan medium uzaklaştırıldı ve 200 µl DMSO eklendi. 96 kuyulu plate 30 dakika çalkalayıcıda çalkalandı. Örneklerin absorbans değerleri 30 dk inkübasyon sonrasında plate okuyucuda 560 nm dalga boyunda ölçüldü. Yapılan deneyler kontrol amaçlı HUVEC hücreleri üzerinde aynı işlemler uygulanarak yapıldı. HUVEC hücreleri üzerinde AA,

MTX ve MTX+AA MCF-7 hücrelerindeki işlemlere paralel olacak şekilde uygulandı. AA, MTX ve MTX+AA konsantrasyonları NP içerisine alındı ve HUVEC ve MCF-7 hücreleri üzerinde MTT analizleri gerçekleştirildi.

3.3. İyonik Jelleşme Metodu İle Nanopartikül Elde Edilişi

1. Karışım: %2 Sodyum Arjinat, % 1 tween 20 sülfaktat, % 97 saf su olacak şekilde bir karışım oluşturuldu ve çalkalayıcıda 5 dakika çalkalandı.

2. Karışım: Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan kalsiyum klorür bir beher içerisinde %2 kalsiyum klorür % 96 su olacak şekilde hazırlandı ve çalkalayıcı ile karıştırıldı.

4' e 1 oranında 1.karışımından 40 ml, 2. karışımından 10 ml alınarak bir solüsyon oluşturuldu. Oluşan karışım manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi. Kapsüllenecek olan MTX ve AA belirli oranlarda stok çözeltiler haline getirildi. Stok çözelti enjektöre çekildi. Poliamid bağlantı hortumu ile enjeksiyon cihazı arasında bağlantı kuruldu. Hortum ucuna damlatma işlemi için 18G nozul takıldı. 50 ml' lik karışım içerisine enjektör içerisindeki kimyasal ajan saatte 5 ml olacak şekilde damlatıldı. Bu işlem ile nozul ucundan düşen her damla kapsül içine alınarak karışım içinde çalkalanmaya devam ettirildi. Karışım 63 µm paslanmaz çelik elekten geçirildi. Bu işlemden sonra oluşan karışım 15 ml'lik falkon tüpler içerisine alındı. Falkonların içerisine 14 ml'ye kadar kapsüllenmiş solüsyon eklendi. 3000 devir, 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı 7 ml çekilerek uzaklaştırıldı yerine 7 ml saf su eklendi. Yıkama işlemi 3 kez aynı şekilde tekrarlandı. Hazırlanan solüsyon 24 saat +4 °C buzdolabında bekletildi. 24 saat sonrasında liyofilizatöre alındı ve 2 gün boyunca dondurarak kurutma işlemi uygulandıktan sonra nanopartiküller hazır hale getirildi. FTIR ve UV analizleri ile etken maddelerin kapsüllere girdiği belirlendi. FTIR analizi ile korelasyon analizi yapılarak numunelerin birbiri içerisindeki durumları belirlenmiştir.

Ayrıca SEM analizi ile kapsüllenmiş nanopartiküller görüntülendi. Verimlilik analizleri yapılan maddeler 2,4 mg tartıldı ve 3 ml medyum içerisinde çözüldü. MTT testleri için hazır hale getirildi. Akım sitometri testleri için 12 mg tartıldı 15 ml medyum içerisinde çözüldü .

3.4. Akım Sitometri İle Apoptoz Tayini

3.4.1. Akım Sitometri Cihazı Kalibrasyon Ayarlarının Yapılması

Örneklerin akım sitometri cihazından geçirilmesinden önce , akım sitometri cihazının kalibrasyonu için canlı hücreler sadece yıkama işlemi yapıldı ve boya uygulanmadı. Hücrelere H₂O₂ uygulandı ve hücreler öldürüldü. Ölü hücrelerde yıkama işlemi yapıldı ve ayrı ayrı yalnız Anneksin V ve PI ile boyandı. Örnekler akım sitometri cihazından geçirildi ve kalibrasyon ayarları yapıldı.

3.4.2. MCF-7 ve HUVEC Hücrelerinde Apoptoz Tayini

MCF-7 hücreleri ve HUVEC 6 kuyulu düz tabanlı plakalara her kuyuda 5×10^5 olacak şekilde ekildi. MCF-7 hücreleri 37° C' de % 5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücreler üzerine 3, 15, 30, 75, 150 µM AA , 30 µM MTX ve 30 µM MTX ile birlikte sırası ile 3, 15, 30, 75, 150 µM AA ve NP şeklinde uygulandı. 24 saat sonrasında hücrelerin üst sıvısı uzaklaştırıldı. Her kuyuya 1 ml PBS eklendi ve 2 dk bekletildi. Kuyulardan PBS uzaklaştırıldı ve 1 ml tripsin EDTA eklendi. 37° C' de % 5 CO₂'li inkübatörde 3 dk bekletildi. Hücrelerin plate yüzeyinden kalktığı mikroskop altında gözlendikten sonra içerisinde 2 ml CDMEM-F12 bulunan 15 ml falkon tüplerin içerisine alındı . 5 dakika 3000 devir/dakika santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldı ve hücreler üzerine 1 ml soğuk PBS eklenerek hücreler FACS tüpleri içerisine alındı. FACS tüplerine içerisinde bulunan hücreler 5 dk 3000 devir/dakika santrifüj edildi. Soğuk PBS ile yıkama işlemi sonrası üst sıvı ulaştırıldı. Hücrelerin üzerine 100 µl 1 X Anneksin V bağlama tamponu eklendi . 5 µl Anneksin V ve 5 µl PI eklendi sonrasında hafifçe çalkalandı. Boyanan hücreler 15 dk karanlık ve oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası FACS tüpleri içerisine 100 µl 1 X Anneksin V bağlama tamponu eklendi ve akım sitometri cihazında okutuldu. NovoExpress programı kullanılarak sonuçların analizleri yapıldı.

MCF-7 ve HUVEC hücreleri 6 kuyulu düz tabanlı plakaların içerisine her kuyuda 1 ml içerisinde 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Nano kapsül haline getirilmiş maddelerin uygulaması için ekilen hücreler üzerindeki CDMEM F-12 uzaklaştırıldı ve 15 ml olarak hazırlanan nano kapsül stok çözeltisinden 1 ml hücreler üzerine eklendi . 48 saat sonrasında akım sitometri testi için aynı basamaklar uygulandı ve akım sitometri cihazında sonuçlar okutuldu ve analizler yapıldı.

3.5. İstatistik Analizler

SPSS (IBM SPSS STATISTICS 22.0) analiz programı kullanılarak deneylerin istatistik analizleri yapılmıştır. One Way Anova Testi kullanılmıştır. Testlerden elde edilen sonuçların ilk olarak ön koşul homojen dağılımı kontrol edilmiştir. Homojen dağılmadığı tespit edilen veriler için Tamhane Testi uygulanmıştır. İstatistik analizler MTT testleri ve akım sitometri analizlerinin her biri için uygulanmıştır.

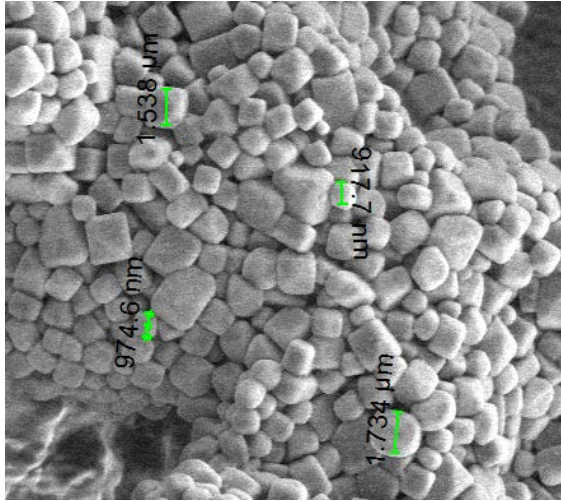
MTT testleri için IC₅₀ değerleri Graphpad programı kullanılarak hesaplanmıştır.



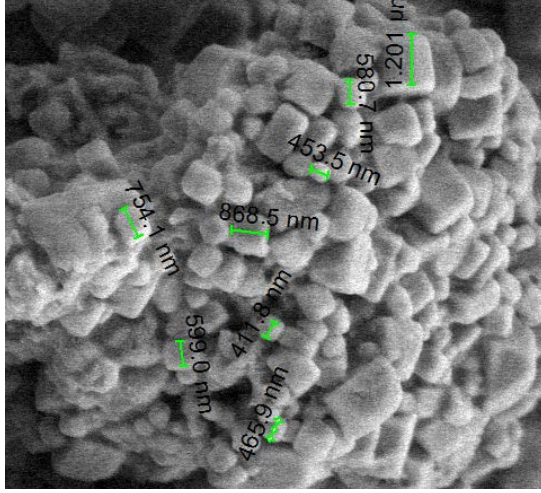
4. BULGULAR

4.1. NP Haline Getirilen Moleküllerin SEM ile Görüntülenmeleri

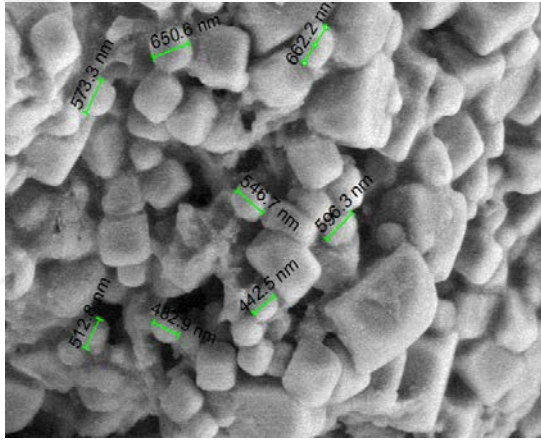
Nanokapsülleme işlemi küçük boyutlarından dolayı etken maddelerin taşınımını kolaylaştırır, suda çözünürlülük ve dayanıklılığının artmasını sağlar. İlaç salınımında kontrollü salınımın gerçekleşmesi sağlanır. Bu doğrultuda, Sodyum Aljinat ile İyonik Jelleşme Metodu ile Gereç ve Yöntemlerde belirtildiği şekilde ilk aşamada boş kapsüller oluşturulmuştur. Sonraki aşamada ise MTX, AA, MTX+AA enkapsüle edilerek SEM analizleri gerçekleştirildi. MTX 2, 4, 10, 20, 30, 40 μM , AA 3, 15, 30, 75, 150 μM ve 30 μM MTX ile birlikte sırası ile 3, 15, 30, 75, 150 μM AA birlikte kapsül içerisine alındı. SEM ile boş kapsüllerin boyutlarının 917.3 nm, 974.6 nm iken bazı kapsüllerin ise μm boyutlarında olduğu görüldü. Bazı boş NP'ler ise daha büyük μm boyutlarında izlendi (Şekil 4-1). (MTX+AA)-NP (Şekil 4-2), AA-NP (Şekil 4-3) ve MTX (Şekil 4-4) nanaopartikül haline getirilmeleri ile maddelerin sodyum aljinat yapısındaki kapsül içerisine alındığında kapsül yapısının boş yapıya göre daha küçüldüğü, boyutların 442,5 nm ile 662,2 nm arasında değiştiği görülmüştür.



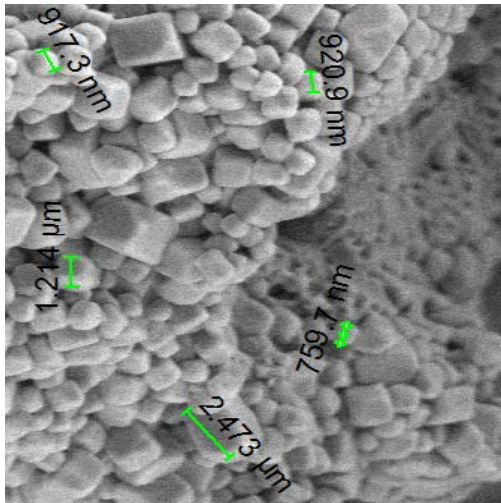
Şekil 4-1: Boş nanopartikül SEM görüntüsü.



Şekil 4-2: 30 µM MTX + 30 µM AA SEM görüntüsü.



Şekil 4-3: 30 µM AA SEM görüntüsü.



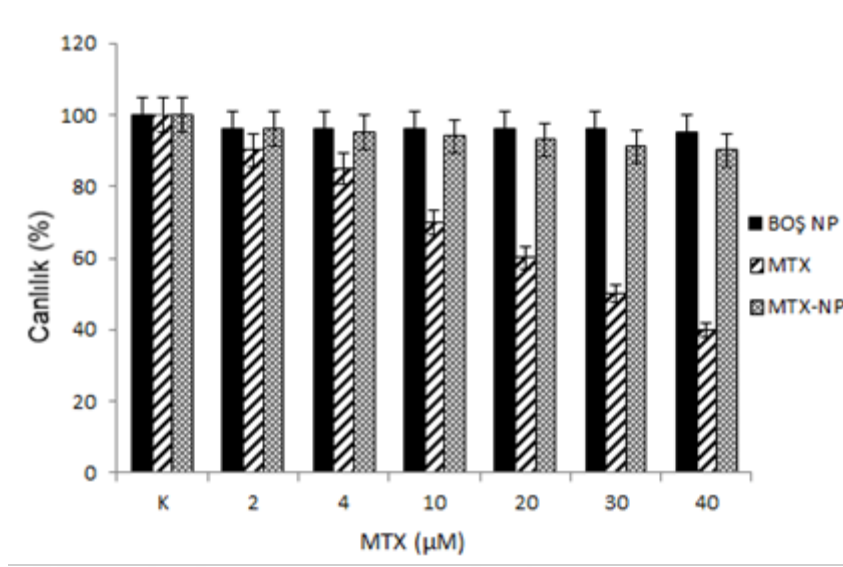
Şekil 4-4: 30 µM MTX SEM görüntüsü.

4.2. Sitotoksite Analizleri

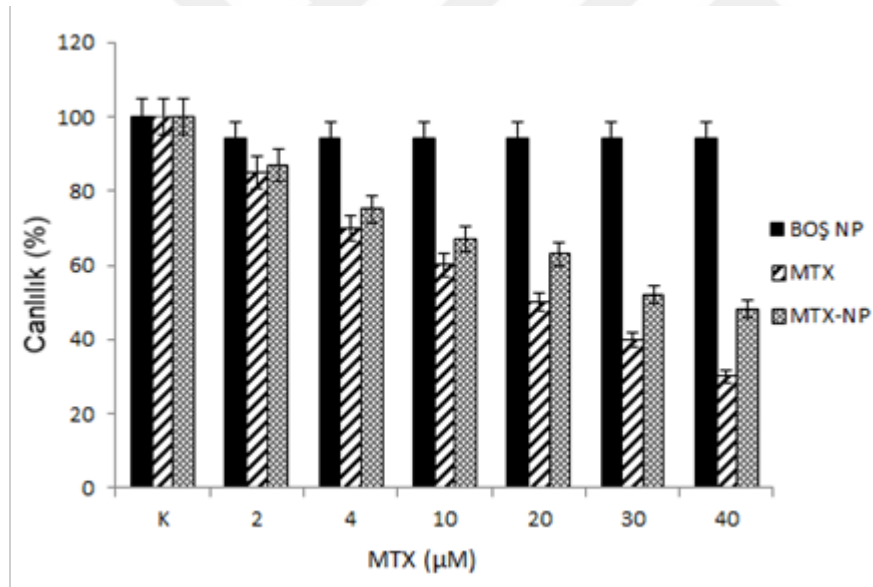
4.2.1 MCF-7 ve HUVEC Hücrelerine MTX ve MTX-NP Formlarının Etkisi

4.2.1.1 MCF-7 Hücrelerine MTX ve MTX-NP Etkisi

MCF-7 hücrelerine MTX ve MTX-NP formları 2, 4, 10, 20, 30, 40 μ M olacak şekilde artan konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat süre ile uygulandı. Sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile MTT testi yapıldı. Elde edilen veriler Graphpad analiz yöntemi ile değerlendirildi. 24 saat süre ile MCF-7 hücrelerine direkt artan konsantrasyonlarda MTX uygulandığında IC_{50} değeri 30 μ M olarak belirlendi. Nano partikül formunda MTX-NP'nin artan konsantrasyonlarında ise 24 saat sonunda ilacın kontrollü salınımdan dolayı önemli bir sitotoksik etki göstermediği görüldü (Şekil 4.5). 48 saat süre ile artan konsantrasyonlarda MTX ile inkübe edilen hücrelerde IC_{50} değeri 20 μ M olarak belirlendi. MTX -NP uygulandığında 48 saat sonunda hücre canlılığının en yüksek konsantrasyonda (40 μ M) kontrole göre % 50 azaldığı görüldü (Şekil 4.6).



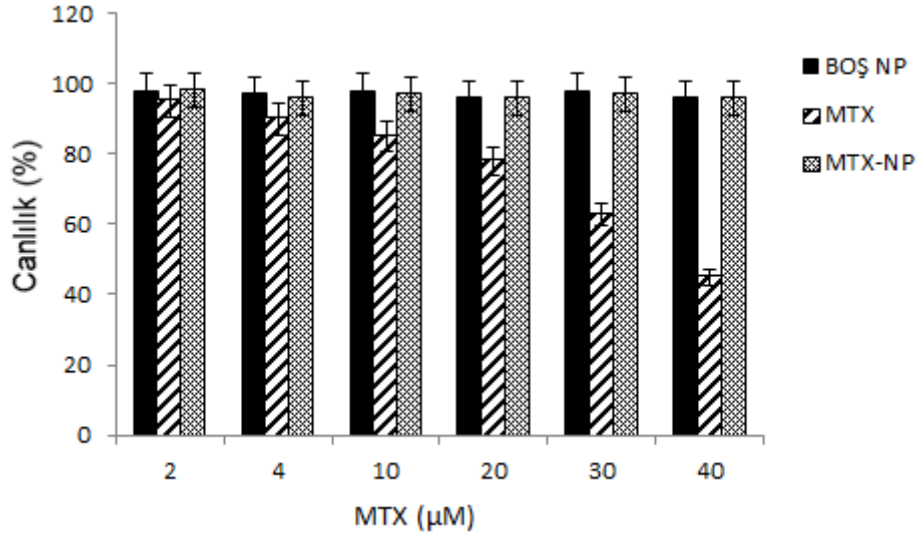
Şekil 4-5:MCF-7 hücrelerinde MTX ve MTX-NP 24 saat MTT analizleri.



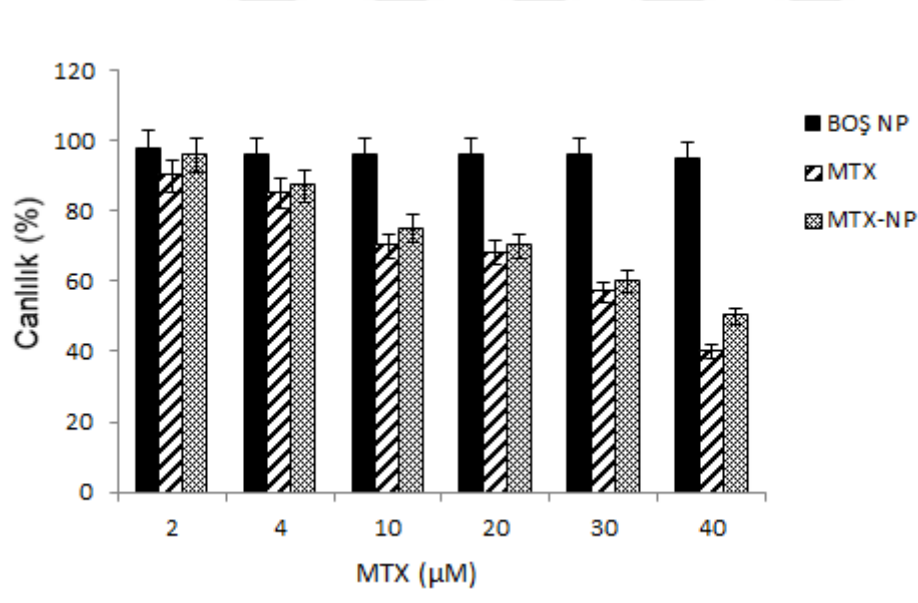
Şekil 4-6:MCF-7 hücrelerinde MTX ve MTX-NP 48 saat MTT analizleri.

4.2.1.2 HUVEC Hücrelerine MTX ve MTX-NP Etkisi

HUVEC hücrelerine MTX ve MTX-NP formları 2, 4, 10, 20, 30, 40 μ M olacak şekilde artan konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat süre ile uygulandı. Sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile MTT testi yapıldı. Elde edilen veriler Graphpad analiz yöntemi ile değerlendirildi. 24 saat süre ile HUVEC hücrelerine direkt artan konsantrasyonlarda MTX uygulandığında IC_{50} değeri 40 μ M olarak belirlendi. Nanopartikül formunda MTX'in artan konsantrasyonlarında ise MCF-7 hücrelerine benzer şekilde 24 saat sonunda önemli bir sitotoksik etki izlenmedi. (Şekil 4.7). 48 saat süre ile artan konsantrasyonlarda MTX ile inkübe edilen hücrelerde IC_{50} değeri 30 μ M olarak belirlendi. MTX-NP uygulandığında ise 48 saat sonunda hücre canlılığının en yüksek konsantrasyonda (40 μ M) kontrole oranla % 50 azaldığı görüldü (Şekil 4.8).



Şekil 4-7:HUVEC hücrelerinde MTX ve MTX-NP 24 saat MTT analizleri.

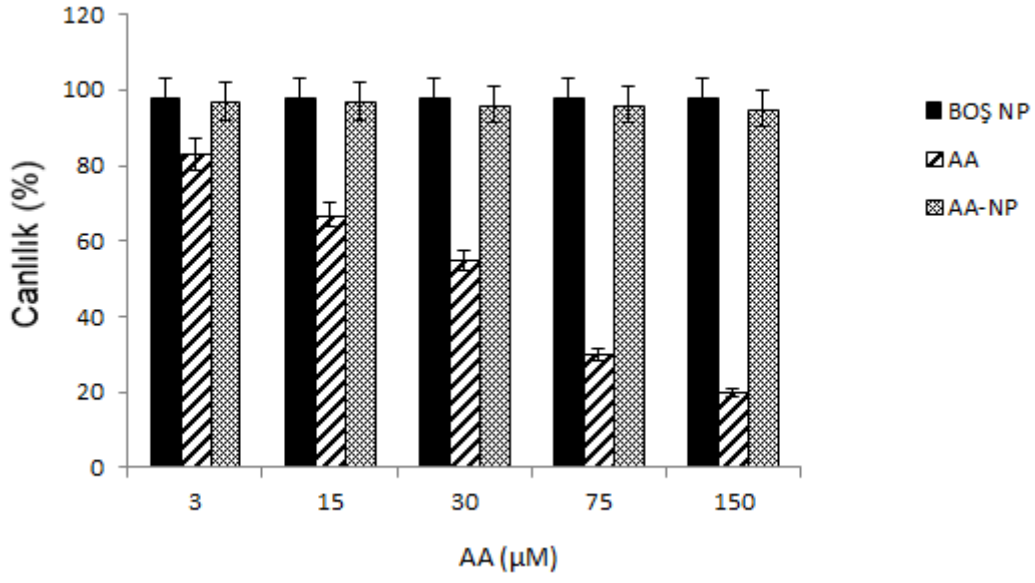


Şekil 4-8:HUVEC hücrelerinde MTX ve MTX-NP 48 saat MTT analizleri.

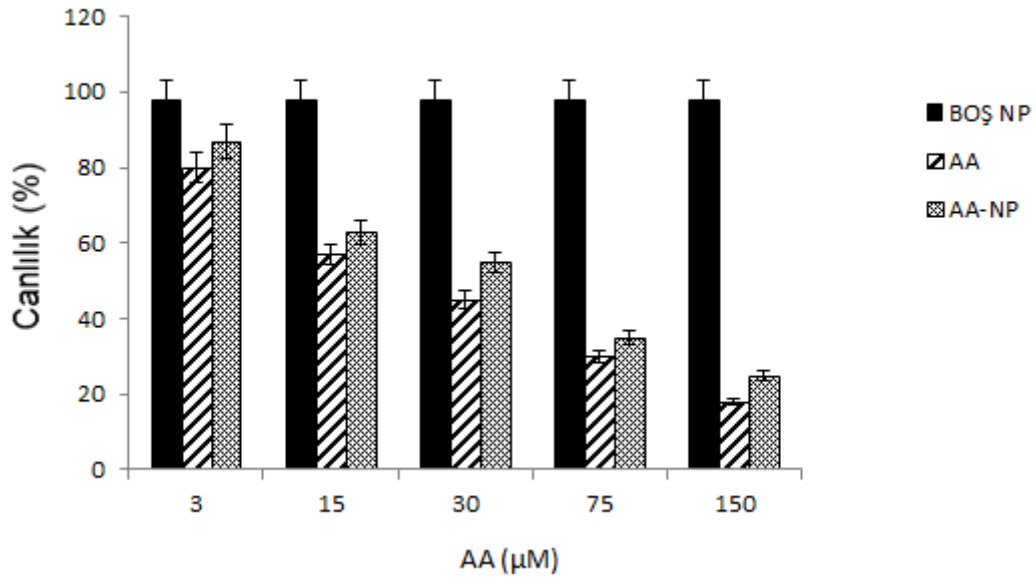
4.2.2 MCF-7 ve HUVEC Hücrelerine AA ve AA-NP Formlarının Etkisi

4.2.2.1.MCF-7 Hücrelerine AA ve AA-NP Formlarının Etkisi

MCF-7 hücrelerine AA ve AA-NP formları 3, 15, 30, 75, 150 μM olacak şekilde artan konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat süre ile uygulandı. Sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile MTT testi yapıldı. Elde edilen veriler Graphpad analiz yöntemi ile değerlendirildi. 24 saat süre ile MCF-7 hücrelerine direkt artan konsantrasyonlarda AA uygulandığında IC_{50} değeri 30 μM olarak belirlendi. AA-NP'nın artan konsantrasyonlarında ise 24 saat sonunda önemli bir sitotoksik etki göstermediği izlendi (Şekil 4.9). 48 saat süre ile artan konsantrasyonlarda AA ile inkübe edilen hücrelerde IC_{50} değeri 20 μM olarak belirlendi. AA-NP uygulandığında 48 saat sonunda hücre canlılığının en yüksek konsantrasyonda (150 μM) kontrole göre % 70 azaldığı görüldü (Şekil 4.10).



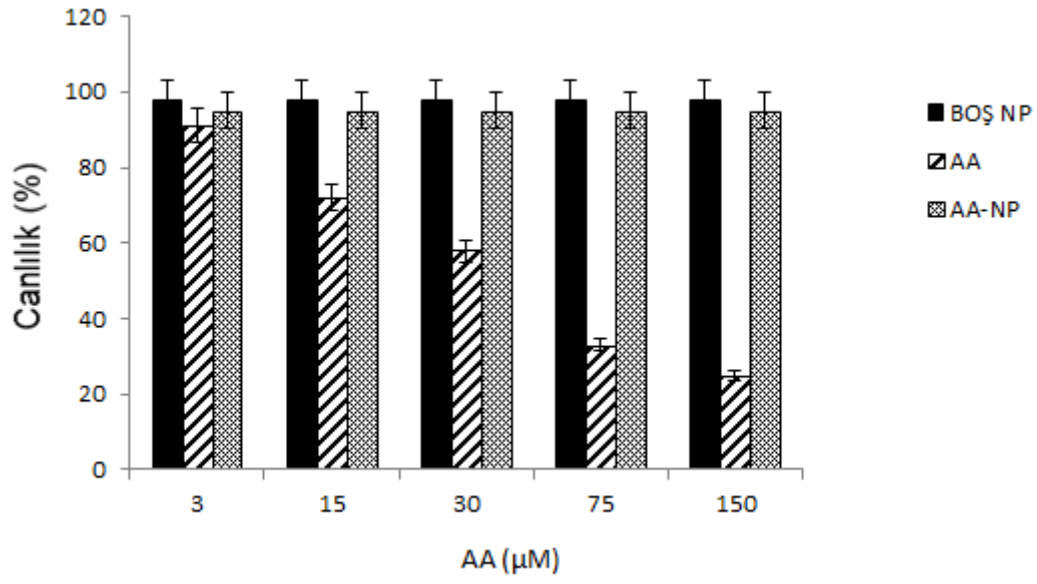
Şekil 4-9: MCF-7 hücrelerine AA ve AA-NP'nin 24 saat MTT analizleri.



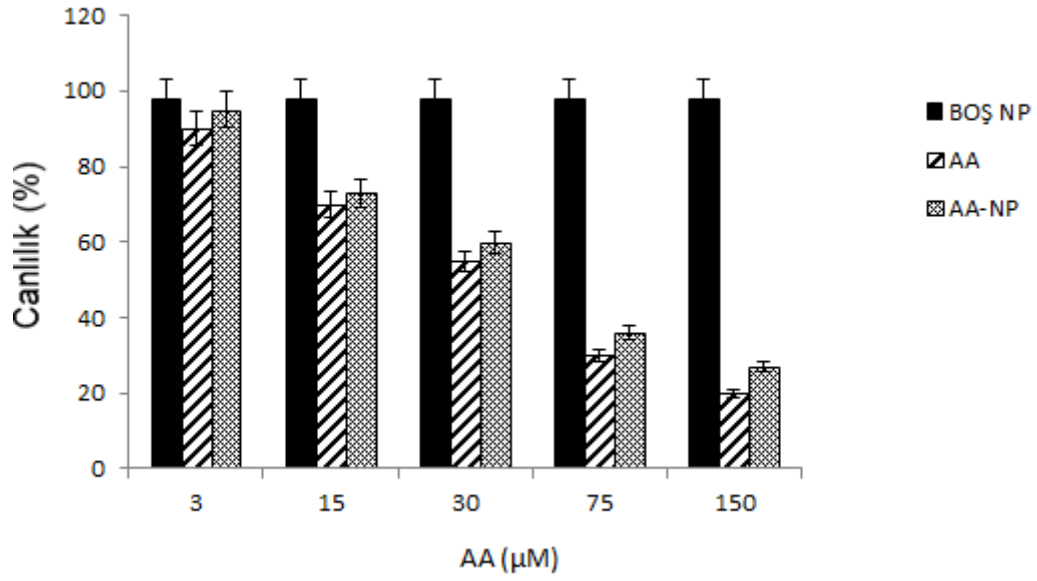
Şekil 4-10: MCF-7 hücrelerinde AA ve AA-NP 48 saat MTT analizleri.

4.2.2.2.HUVEC Hücrelerine AA ve AA-NP Formlarının Etkisi

HUVEC hücrelerine AA ve AA-NP formları 3, 15, 30, 75, 150 μM olacak şekilde artan konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat süre ile uygulandı. Sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile MTT testi yapıldı. Elde edilen veriler Graphpad analiz yöntemi ile değerlendirildi. 24 saat süre ile HUVEC hücrelerine direkt artan konsantrasyonlarda AA uygulandığında IC_{50} değeri 35 μM olarak belirlendi. AA-NP'nin artan konsantrasyonlarında ise 24 saat sonunda önemli bir sitotoksik etki göstermediği izlendi (Şekil 4.11). 48 saat süre ile artan konsantrasyonlarda AA ile inkübe edilen hücrelerde IC_{50} değerinin 30 μM olarak belirlendi. AA-NP uygulandığında 48 saat sonunda hücre canlılığının en yüksek konsantrasyonda (150 μM) kontrole göre % 80 azaldığı görüldü (Şekil 4.12).



Şekil 4-11:HUVEC hücrelerinde AA ve AA-NP 24 saat MTT analizleri.

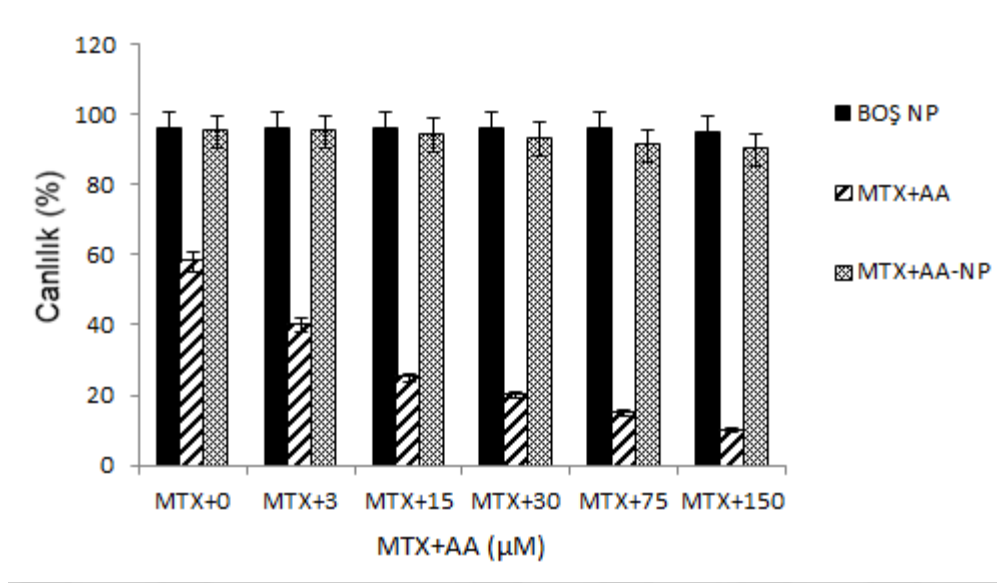


Şekil 4-12:HUVEC hücrelerinde AA ve AA-NP 48 saat MTT analizleri.

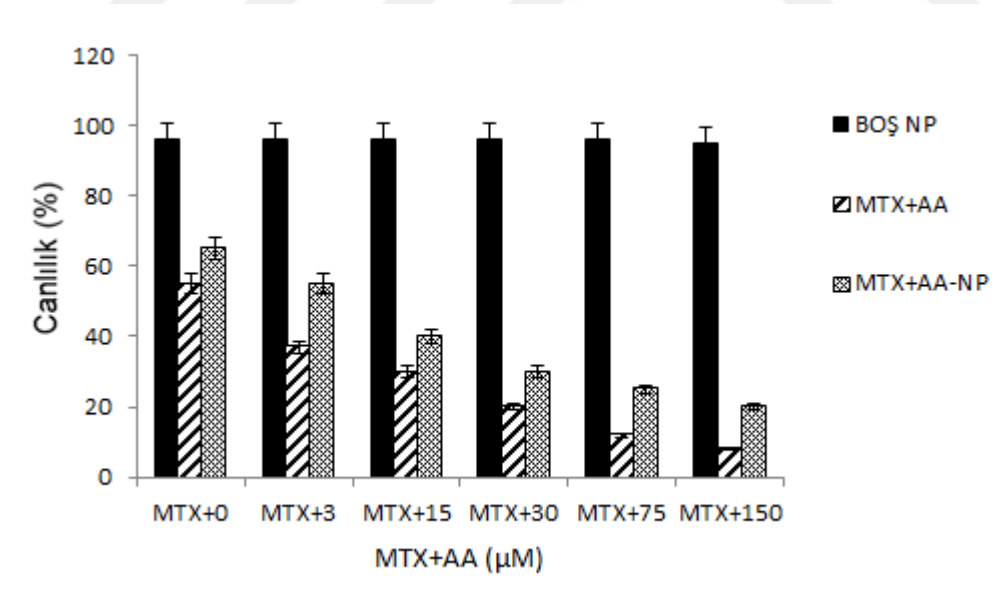
4.2.3.MCF-7 ve HUVEC Hücrelerine MTX+AA ve (MTX+AA)-NP Formlarının Etkisi

4.2.3.1.MCF-7 Hücrelerine MTX+AA ve (MTX+AA)-NP Formlarının Etkisi

MCF-7 hücrelerinde MTX ve AA'nın sinerjistik etkisini gözlemleyebilmek amacı ile 30 μ M MTX ile artan konsantrasyonlarda AA 3, 15, 30, 75, 150 μ M olacak şekilde 24 saat, (30 μ M MTX+AA)-NP ise 24 ve 48 saat süre ile uygulandı. Sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile MTT testi yapıldı. Elde edilen veriler Graphpad analiz yöntemi ile değerlendirildi. 24 saat süre ile MCF-7 hücrelerine 30 μ M MTX ile artan konsantrasyonlarda AA uygulandığında kontrole göre canlılığın en yüksek konsantrasyonda % 80 oranında azaldığı görüldü. (30 μ M MTX+AA)-NP'nin 24 saat sonunda önemli bir sitotoksik etki göstermediği izlendi (Şekil 4-13). 48 saat süre ile 30 μ M MTX ile artan konsantrasyonlarda AA ile inkübe edilen hücrelerde canlılığın %90 oranında azaldığı görüldü. MTX +AA-NP uygulandığında 48 saat sonunda hücre canlılığının yaklaşık % 80 azaldığı görüldü (Şekil 4-14).



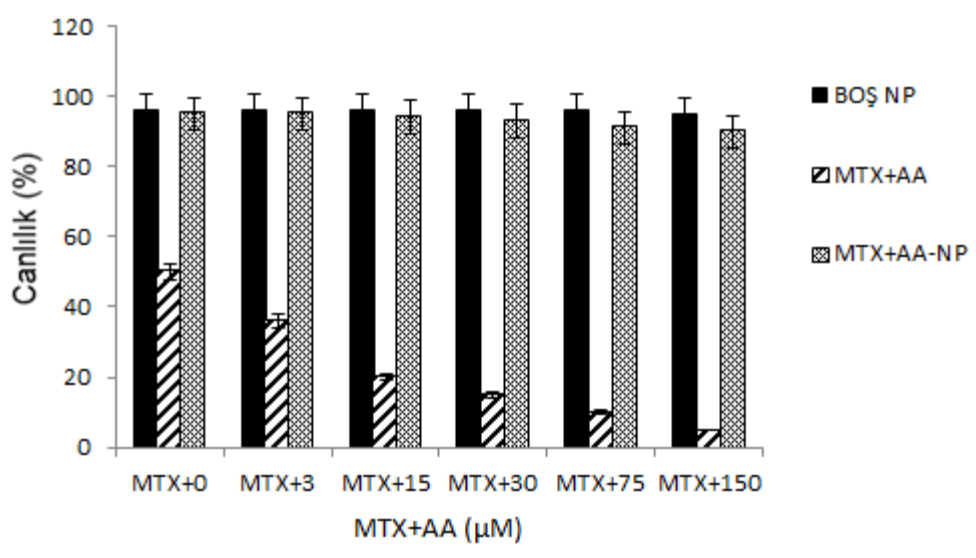
Şekil 4-13:MCF-7 hücrelerinde 30 µM MTX+AA ve 30 µM (MTX+AA)-NP 24 saat MTT analizleri.



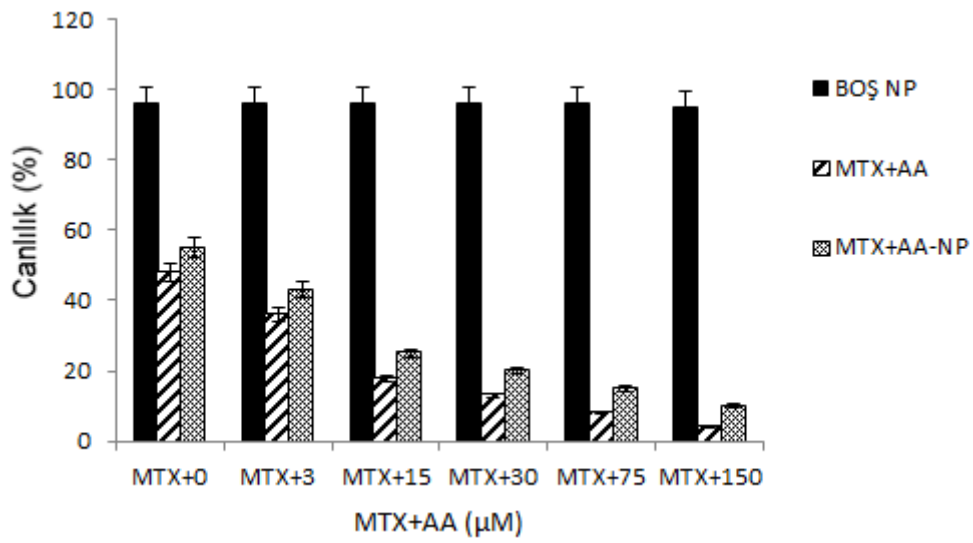
Şekil 4-14:MCF-7 hücrelerinde 30 µM MTX+AA ve (30 µM MTX+AA)-NP 48 saat MTT analizleri.

4.2.3.2.HUVEC Hücrelerine MTX+AA ve MTX+AA-NP Formlarının Etkisi

HUVEC hücrelerinde MTX ve AA'nın sinerjistik etkisini gözlemleyebilmek amacı ile 30 μ M MTX ile artan konsantrasyonlarda AA 3, 15, 30, 75, 150 μ M olacak şekilde 30 μ M MTX+AA 24 saat, (30 μ M MTX+AA)-NP ise 24 ve 48 saat süre ile uygulandı. Sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile MTT testi yapıldı. Elde edilen veriler Graphpad analiz yöntemi ile değerlendirildi. 24 saat süre ile HUVEC hücrelerine 30 μ M MTX ile artan konsantrasyonlarda AA uygulandığında kontrole göre canlılığın en yüksek konsantrasyonda % 90 oranında sitotoksik etki gösterdiği görüldü. (30 μ M MTX+AA)-NP'nin 24 saat sonunda önemli bir sitotoksik etki göstermediği izlendi (Şekil 4-15). 48 saat süre ile 30 μ M MTX ile artan konsantrasyonlarda AA ile inkübe edilen hücrelerde canlılığın % 95 oranında azaldığı görüldü. MTX +AA-NP formu uygulandığında 48 saat sonunda hücre canlılığının yaklaşık % 90 azaldığı görüldü (Şekil 4-16).



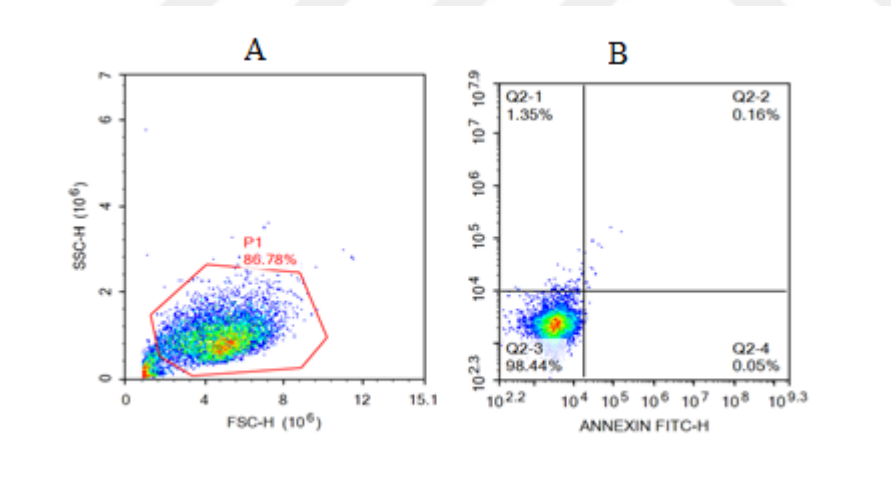
Şekil 4-15:HUVEC hücrelerinde 30 µM MTX+AA ve (30 µM MTX+AA)-NP 24 saat MTT analizleri.



Şekil 4-16:HUVEC hücrelerinde 30 µM MTX+AA ve 30 µM MTX+AA-NP 48 saat MTT analizleri.

4.3. AKIM SİTOMETRİ İLE APOPTOZ TAYİNİ

Akım sitometri cihazında canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz geçiren hücrelerin belirtilmesi için yapılan analizlerin sonuçları, hücrelerin farklı bölgelerde ifade edildiği noktasal grafiklerle incelendi. Hücreler üzerinde yapılan boyama işlemleri sonrasında, dört bölüme ayrılmış olan nokta grafik histogramını incelediğimizde, sol alt köşede boyanmamış canlı hücreler, sağ alt köşede yalnız Annexin V ile boyanmış olan erken apoptotik hücreler, sağ üst köşede Annexin V ve PI ile boyanmış geç apoptotik hücreler, sol üst köşede ise yalnızca PI ile boyanmış tamamen ölü hücreler görülür. Bu bilgiler ile birlikte yapılan kalibrasyon çalışmaları için, her bir deney öncesinde boyasız canlı hücreler (MCF-7 ve HUVEC) cihazdan geçirildi. Hücrelerin kapılanma şekli ile (Şekil 4-17.A), sadece canlı hücrelerin kapılandığı bölgenin noktasal grafiği (Şekil 4-17.B) üzerinde gösterilmiştir. Bununla birlikte MCF-7 ve HUVEC hücreleri H_2O_2 ile işlem gördü. İşlem sonrası Annexin V ve PI ile boyandı. Annexin V ile boyanmış apoptotik hücreler ve PI ile boyanmış nekrotik hücreler akım sitometri cihazından geçirildi kalibrasyon işlemlerinin doğruluğu tespit edildi.

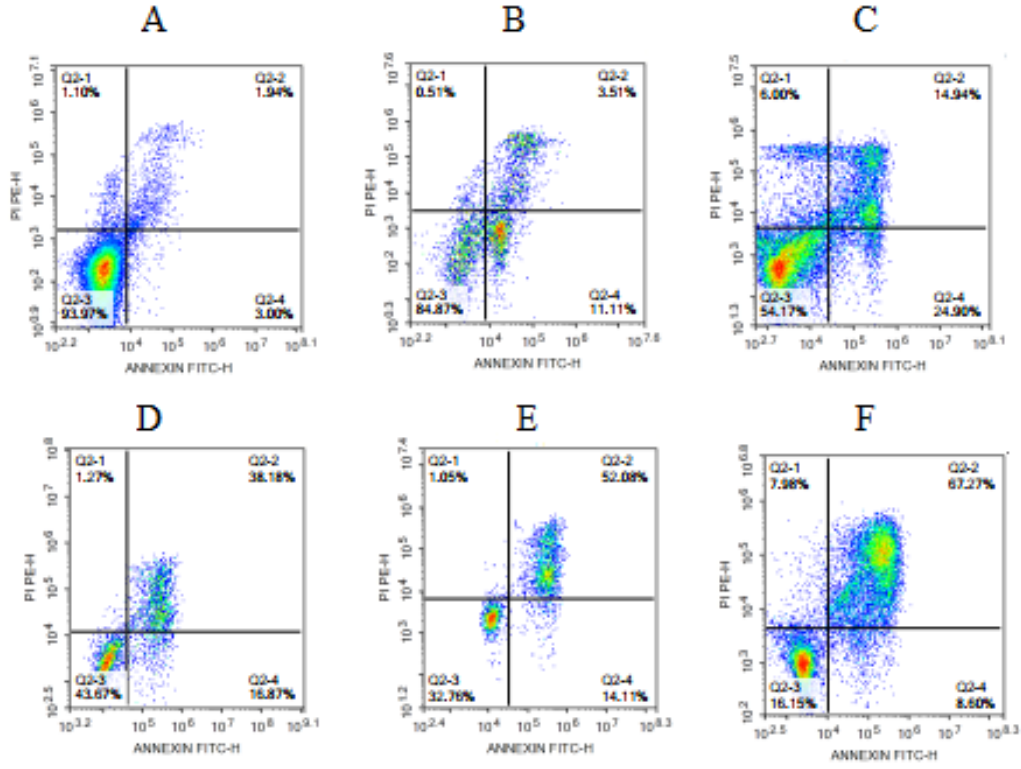


Şekil 4-17: MCF-7 Kontrol hücrelerin Annexin V (-), PI (-) akım sitometri ile analizi. (A) Hücre büyüklüğü ve hücre granülitesi parametre görüntülerinin kapılanması. (B) canlı hücrelerin kapılandığı bölgenin noktasal grafiği.

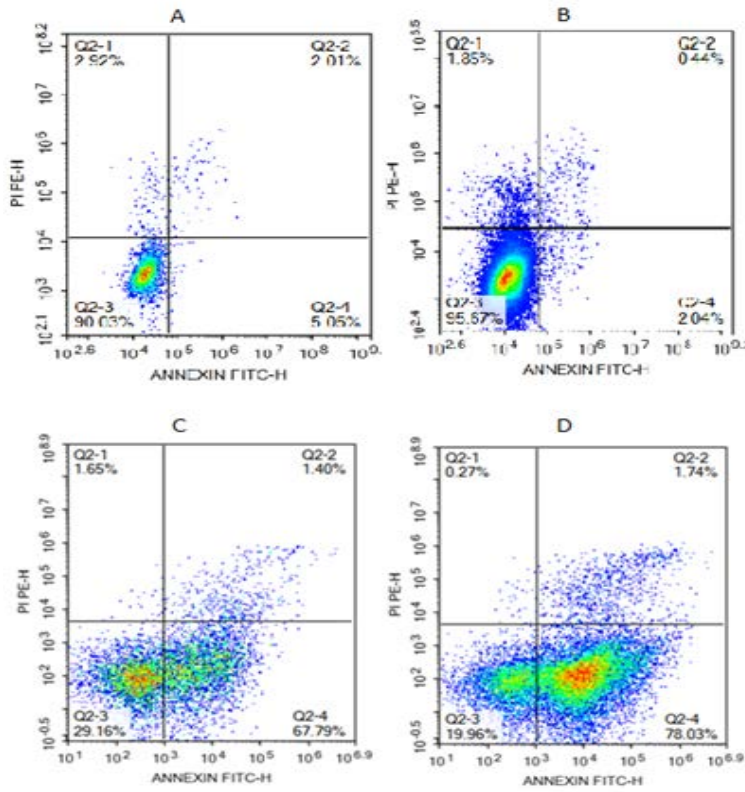
Yöntemler 3.2.1. de belirtildiği gibi akım sitometri analizleri yapıldı. Yapılan analizler sonucunda farklı konsantrasyonlarda uygulanmış olan AA, AA-NP, MTX, MTX-NP, MTX+AA, (MTX+AA)-NP formlarının akım sitometri analizlerinin sonuçları aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.

4.3.1. MCF-7 Hücrelerinin AA ve AA-NP varlığında Akım Sitometri ile Apoptoz Analizleri

MCF-7 hücreleri AA ve AA-NP formlarında 3, 15, 30, 75, 150 μM olacak şekilde artan konsantrasyonlarda sırası ile 24 ve 48 saat süre ile inkübe edildi. NP haline getirilen maddelerin kontrollü salınımdan dolayı 24 saat süre sonunda sitotoksik etki göstermediği MTT analizleri ile gösterildi. Bu nedenle NP ile yapılacak olan bundan sonraki tüm apoptotik analizlerde 48 saat uygun inkübasyon süresi olarak seçildi. 24 saat artan konsantrasyonlarda AA ile inkübe edilen hücrelerin apoptotik analizleri noktasal grafiklerde gösterildi. (Şekil 4-18). Artan konsantrasyonlarda AA'nın geç apoptozu indüklediği, AA'nın en düşük konsantrasyon 3 μM 'da % 5 düzeyinde geç apoptoz gösterirken 150 μM AA uygulanmış hücrelerde artarak % 70'e ulaştığı görüldü. (Şekil 4-20.A). 48 saat süre ile AA-NP ile yapılan deneylerde IC_{50} değeri olarak belirlediğimiz 30 μM AA ile en yüksek konsantrasyon olan 150 μM noktasal grafiklerini karşılaştırdığımızda erken apoptoz yönündeki kayma net bir şekilde izlendi. (Şekil 4-19). AA-NP'nin en düşük konsantrasyon olan 3 μM 'da % 3 düzeyinde erken apoptoz gösterirken 150 μM AA-NP uygulanmış hücrelerde kapsüle edilmeyen formun aksine erken apoptozu % 75 oranında arttığı görüldü. (Şekil 4-20.B). Artan AA-NP'nin MCF-7 hücrelerinde göstermiş olduğu etki noktasal grafiklerin detaylı hali ile Tablo 4-1 üzerinde de gösterilmiştir.



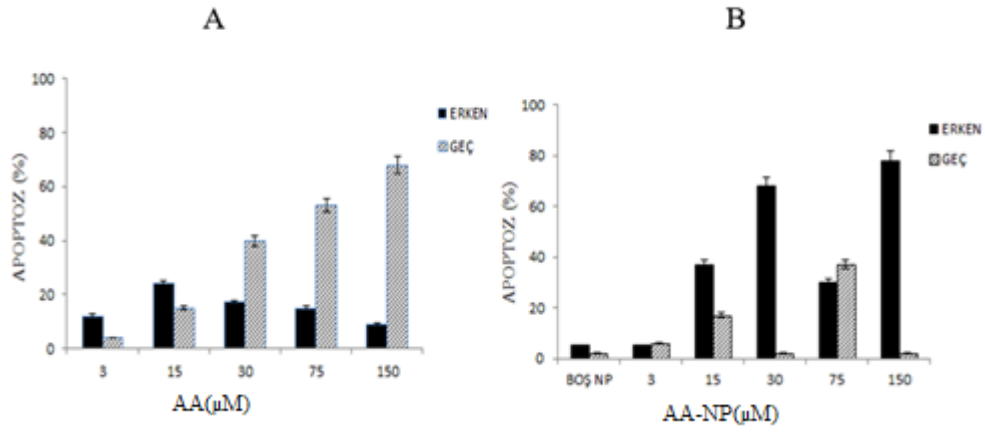
Şekil 4-18: MCF-7 hücrelerinde AA'nın 24 saat noktasal grafikleri. (A) Kontrol, (B) 3 μ M AA, (C) 15 μ M AA, (D) 30 μ M AA, (E) 75 μ M AA, (F) 150 μ M AA.



Şekil 4-19:MCF-7 hücrelerinde AA-NP'nin 48 saat noktasal grafikleri . (A) Boş kapsül, (B) Kontrol,(C) 30 μ M AA, (D) 150 μ M AA.

AA μ M	Boyanmamış Hücreler	Anneksin V	PI	Anneksin V + PI
KONTROL	%93.97	%3.00	%1.94	%1.10
BOŞ NP	%90.03	%5.05	%2.01	%2.92
3	%69.77	%4.29	%5.54	%20.40
15	%36.93	%36.93	%15.47	%10.68
30	%29.16	%67.79	%1.40	%1.65
75	%24.98	%30.80	%36.71	%7.59
150	%19.96	%78.03	%1.74	%1.27

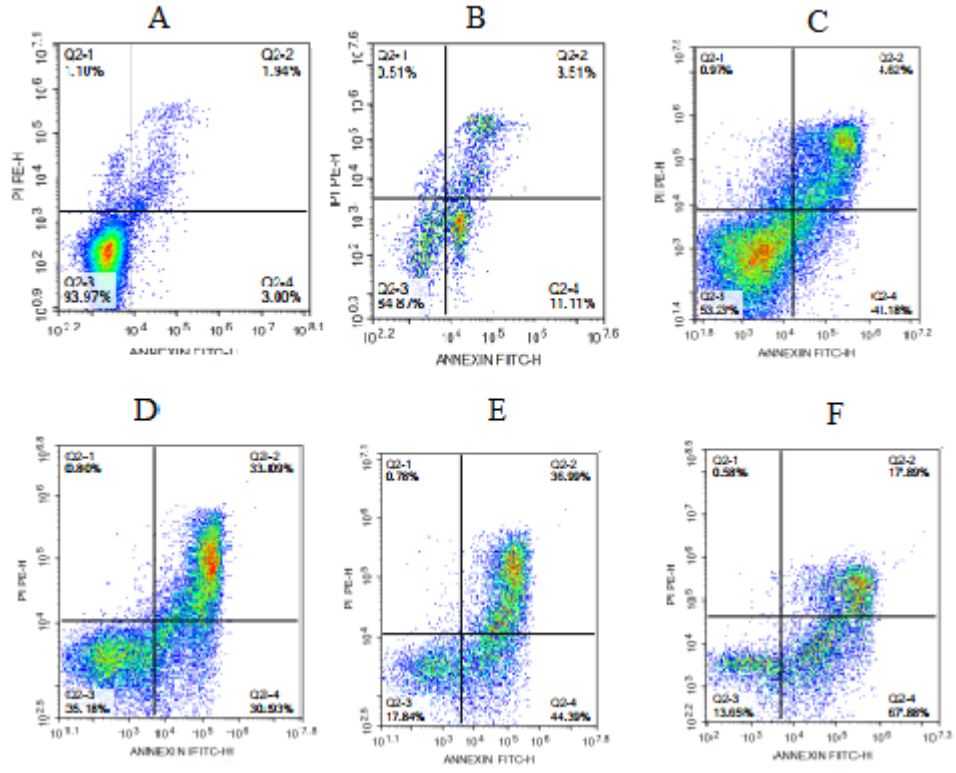
Tablo 4-1:MCF-7 hücrelerinde AA-NP'nin 48 saat noktasal grafiklerinin detaylı gösterimi.



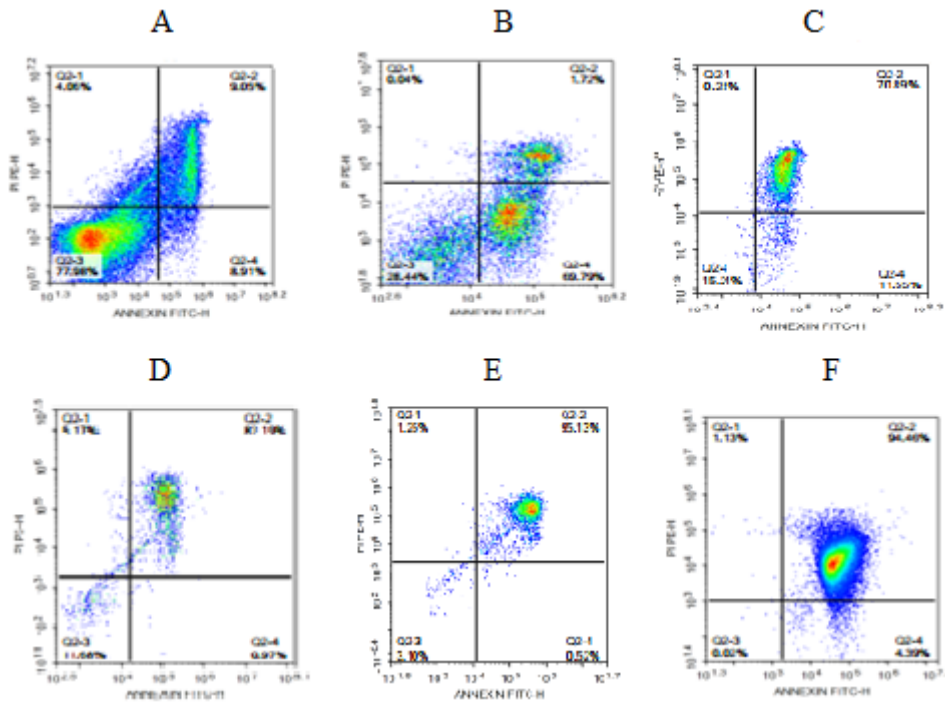
Şekil 4-20: MCF-7 Hücrelerinde 24 Saat AA ve 48 saat AA-NP apoptoz oranları. (A) MCF-24 Saat AA, (B) 48 Saat AA-NP.

4.3.2. HUVEC Hücrelerinin AA ve AA-NP varlığında Akım Sitometri ile Apoptoz Analizleri

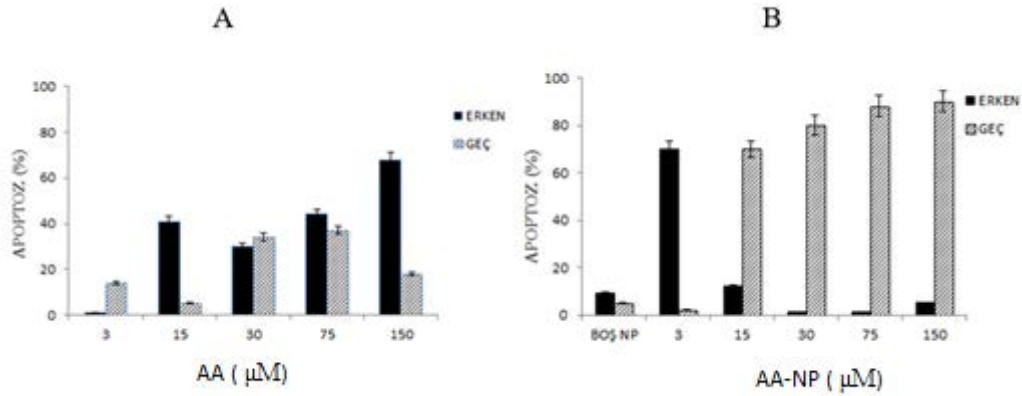
HUVEC hücreleri 48 saat süre ile artan konsantrasyonlarda 3, 15, 30, 75, 150 μM AA ile inkübe edildi. Hücrelerin apoptotik analizleri noktasal grafiklerde gösterildi (Şekil 4-21). En düşük konsantrasyon olan 3 μM AA varlığında %2 dolayında olan erken apoptozun 150 μM AA varlığında % 68 olduğu görüldü. AA ile inkübe edilen hücrelerde konsantrasyon artışına bağlı olarak genel erken apoptozun arttığı belirlendi.(Şekil 4-23.A). 3, 15, 30, 75, 150 μM AA-NP uygulandığında hücrelerin apoptotik analizleri noktasal grafiklerde gösterildi (Şekil 4-22). 3 μM AA-NP varlığında %3 dolayında olan geç apoptozun 150 μM AA-NP varlığında % 85 olduğu belirlendi. Genel olarak baktığımızda 48 saat AA-NP formunun konsantrasyon artışına bağlı olarak geç apoptozu indüklediği görüldü (Şekil 4-23.B).



Şekil 4-21:HUVEC hücrelerinde AA' nın 48 saat noktasal grafiği. (A) Kontrol , (B) 3 μ M AA, (C) 15 μ M AA, (D)30 μ M AA, (E) 75 μ M AA, (F) 150 μ M AA.



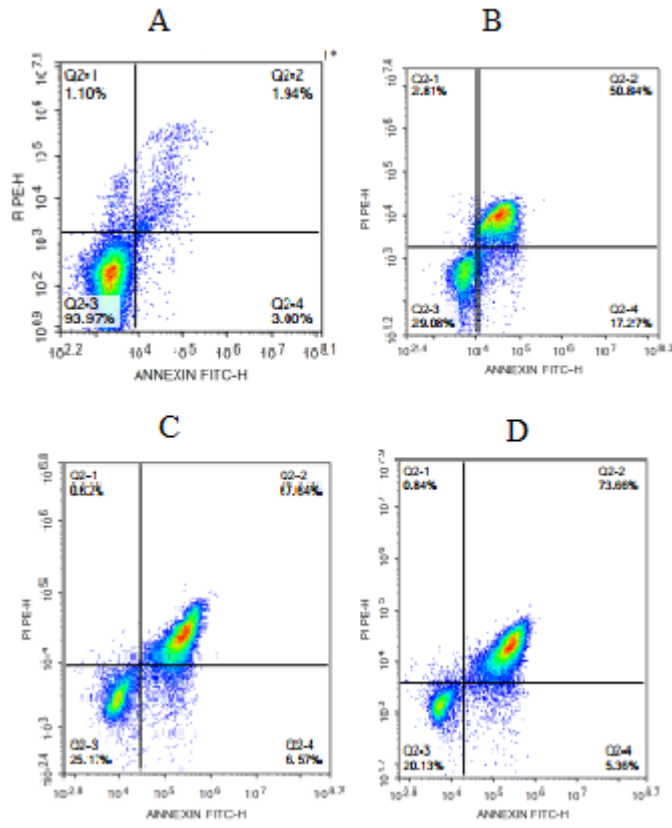
Şekil 4-22:HUVEC hücrelerinde AA-NP 48 saat noktasal grafiği. (A) Boş NP ,(B) 3 μ M AA-NP, (C) 15 μ M AA-NP, (D)30 μ M AA-NP, (E) 75 μ M AA-NP, (F) 150 μ M AA-NP.



Şekil 4-23:HUVEC hücrelerinde 48 saat AA ve AA-NP maddesinin apoptoz oranları. (A) HUVEC 48 Saat inkübasyon erken ve geç apoptoz oranları, (B) HUVEC 48 Saat nano partikül erken ve geç apoptoz oranları.

4.3.3. MCF-7 Hücrelerinin MTX+AA ve (MTX+AA)-NP varlığında Akım Sitometri ile Apoptoz Analizleri

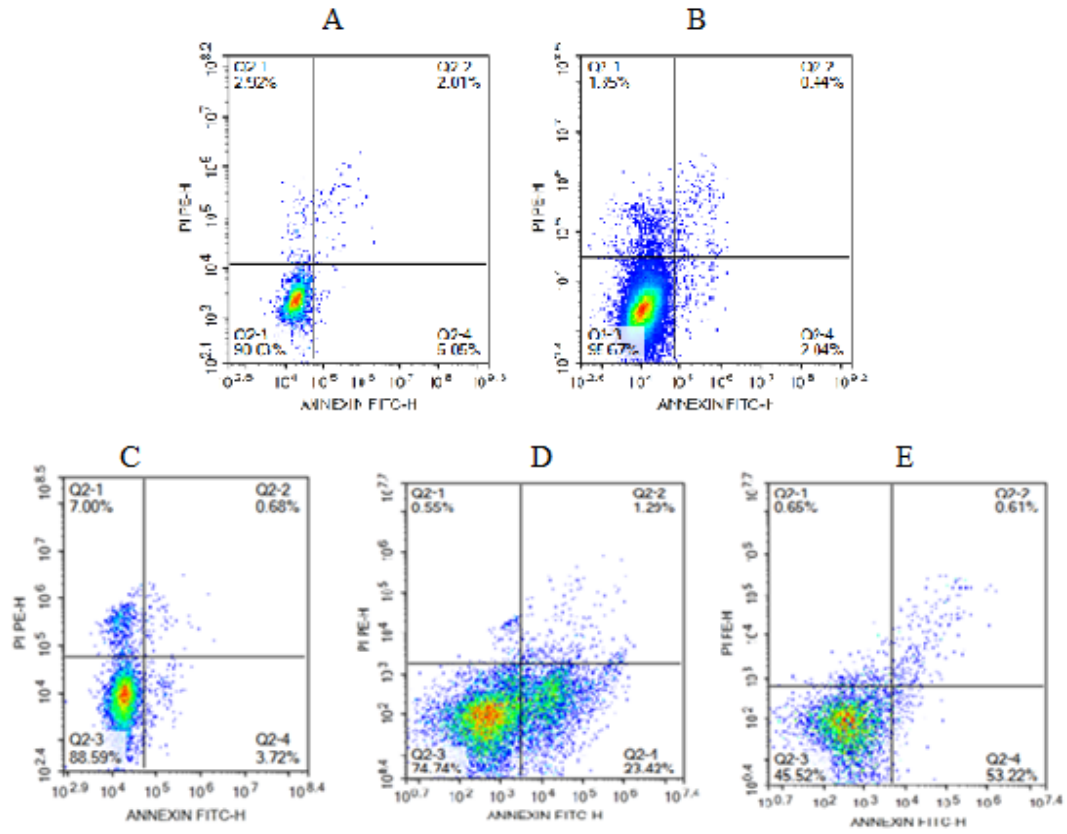
MCF-7 hücreleri 24 saat süre ile tek başına 30 μ M MTX ve 30 μ M MTX ile artan konsantrasyonlarda AA 3, 15, 30, 75, 150 μ M ile birlikte inkübe edildi. Hücrelerin apoptotik analizleri noktasal grafiklerde gösterildi (Şekil 4-24). 30 μ M MTX geç apoptozu % 50 oranında indüklerken en yüksek konsantrasyon olan 150 μ M AA ile birlikte uygulandığında sinerjistik etkinliğin artarak geç apoptoz oranının % 75'e ulaştığı gösterildi (Şekil 4-26.A). 48 saat süre boyunca 30 μ M MTX-NP, (30 μ M MTX+15 μ M AA)-NP, (30 μ M MTX+30 μ M AA)-NP ile inkübe edilen hücrelerin apoptotik analizleri noktasal grafiklerde gösterildi (Şekil 4-25). 30 μ M MTX-NP'nin artan konsantrasyonlarda AA ile birlikte en yüksek konsantrasyon olan (30 μ M MTX+150 μ M AA)-NP formuna getirilmesi ile erken apoptozun % 65 oranında indüklendiği görülmüştür. Ayrıca MCF-7 hücrelerinde MTX+AA'nın 24 saat noktasal grafiğinin detaylı gösterimi (Tablo 4-2) üzerinde gösterilmiştir. 48 saat süre ile MCF-7 hücrelerinde (MTX+AA)-NP apoptoz oranlarına bakıldığında 24 saate göre geç apoptozu azaltırken erken apoptozu arttırdığı görülmektedir (Tablo 4-3) .



Şekil 4-24:MCF-7 hücrelerinde MTX+AA'nın 24 saat noktasal grafikleri. (A) Kontrol (B) 30 µM MTX, (C) 30 µM MTX+75 AA, (D) 30 µM MTX+150 AA.

	Boyanmamış Hücreler	Anneksin V	PI	Anneksin V + PI
30 µM MTX	%29.08	%17.27	%50.84	%2.81
30MTX+AA µM				
3	%45.30	%21.25	%26.99	%6.46
15	%39.84	%12.71	%45.36	%2.09
30	%30.90	%13.02	%52.85	%3.23
75	%25.17	%6.57	%67.64	%0.62
150	%20.13	%5.36	%73.66	%0.84

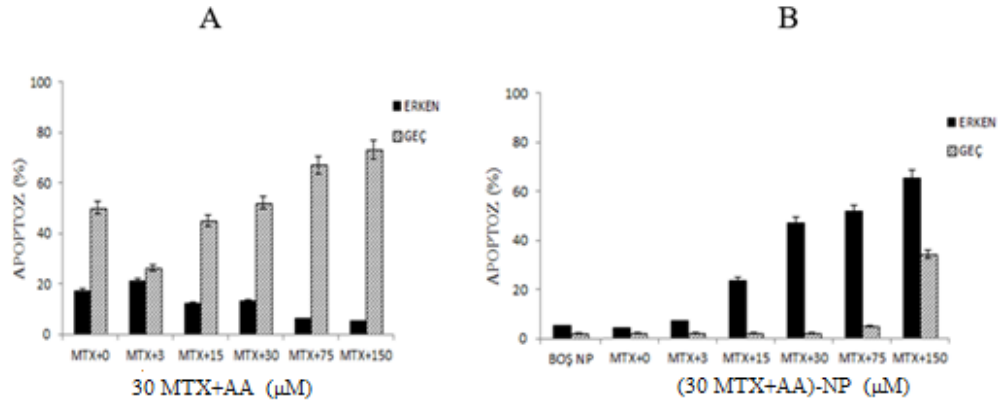
Tablo 4-2:MCF-7 hücrelerinde MTX+AA'nın 24 saat noktasal grafiğinin detaylı gösterimi.



Şekil 4-25:MCF-7 hücrelerinde 30 μ M MTX-NP ve (30 μ M MTX+AA)-NP maddesinin 48 saat noktasal grafiği. (A)Boş kapsül, (B) Kontrol, (C) 30 μ M MTX , (D) 30 μ M MTX+ 15 μ M AA, (E) 30 μ M MTX+ 30 μ M AA.

	Boyanmamış Hücreler	Anneksin V	PI	Anneksin V + PI
30 μM MTX	%88.59	%3.72	%0.68	%7.00
30MTX+AA μM				
3	%96.03	%1.89	%0.31	%1.76
15	%74.74	%23.42	%1.29	%0.55
30	%45.52	%53.22	%0.61	%0.65
75	%25.14	%67.55	%4.80	%2.51
150	%15.26	%48.55	%34.21	%1.97

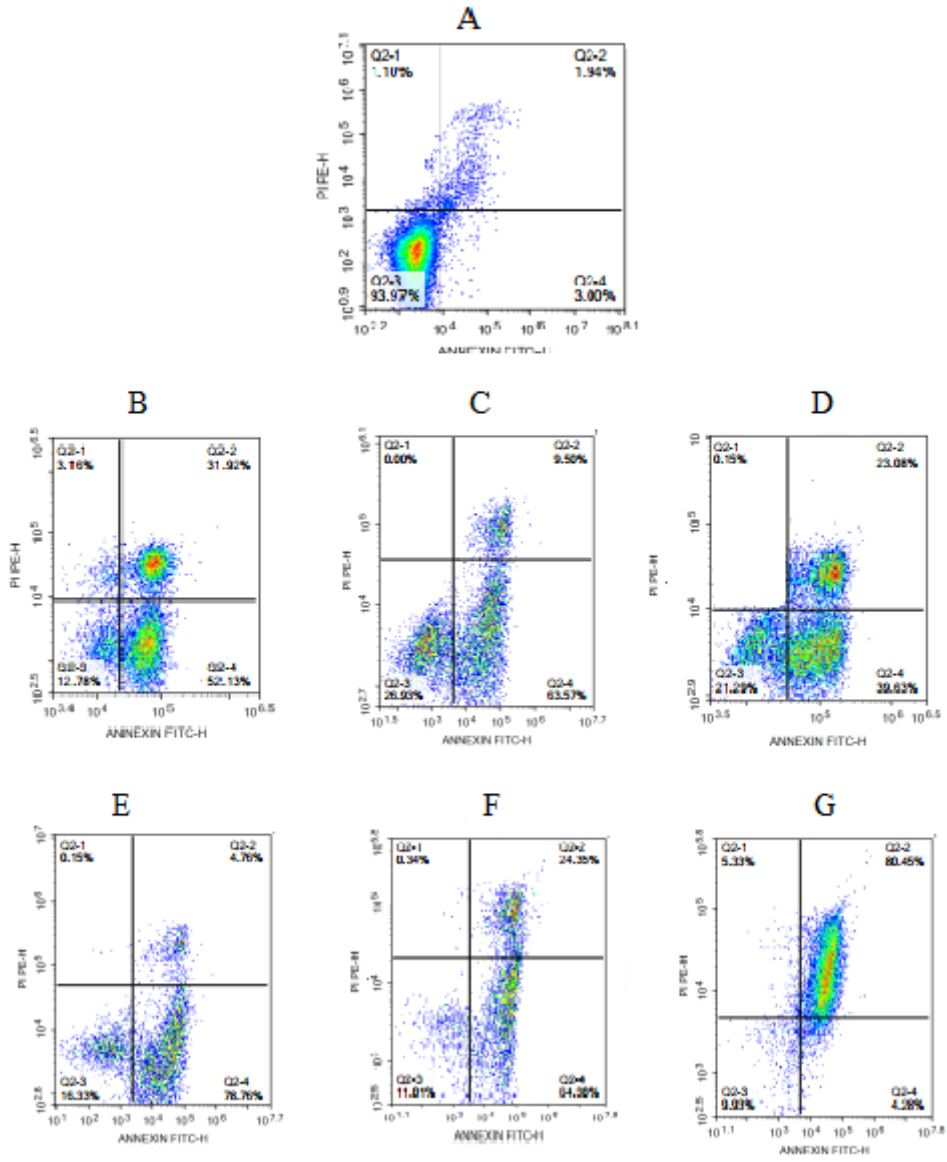
Tablo 4-3:MCF-7 hücrelerinde 48 saat (MTX+AA)-NP noktasal grafiğinin detaylı gösterimi.



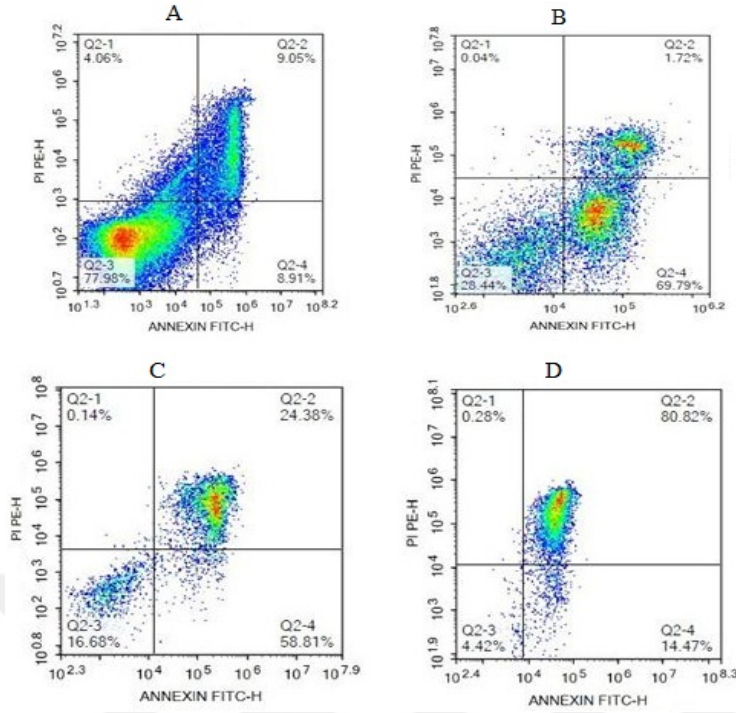
Şekil 4-26:MCF-7 hücrelerinde 24 Saat MTX+AA ve 48 saat MTX +AA)-NP maddesinin apoptoz oranları. (A) 24 Saat apoptoz oranları (B) 48 Saat NP apoptoz oranları.

4.3.4. HUVEC Hücrelerinin MTX+AA ve (MTX+AA)-NP varlığında Akım Sitometri ile Apoptoz Analizleri

HUVEC hücreleri 48 saat süre ile tek başına 30 μ M MTX ve artan konsantrasyonlarda AA 3, 15, 30, 75, 150 μ M ile birlikte inkübe edildi. Hücrelerin apoptotik analizleri noktasal grafiklerde gösterildi (Şekil 4-27). 30 μ M MTX geç apoptozu % 30 oranında indüklerken en yüksek konsantrasyon olan 150 μ M AA ile birlikte uygulandığında sinerjistik etkinliğin artarak geç apoptoz oranının % 70'e ulaştığı gösterildi (Şekil 4-29.A). 48 saat süre boyunca (3 μ M AA)-NP, (30 μ M MTX)-NP, (30 μ M MTX+3 μ M AA)-NP ile inkübe edilen hücrelerin apoptotik analizleri noktasal grafiklerde gösterildi (Şekil 4-28). (30 μ M MTX)-NP'nin tek uygulandığında % 58 dolayında erken apoptoz gösterdiği, (30 μ M MTX+150 μ M AA)-NP formunda erken apoptozun % 2'ye düştüğü buna karşın geç apoptozun %80'e çıktığı görüldü (Şekil 4-29.B). Maddelerin NP formlarının sinerjistik kullanımı ile geç apoptozun artan konsantrasyonlarla birlikte önemli ölçüde indüklediği görülmektedir. HUVEC hücrelerinde 48 saat (MTX+AA)-NP noktasal grafiğinin detaylı olarak sırasıyla boyanmamış hücre oranları, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekroz geçiren hücre oranları detaylı bir şekilde gösterildi (Tablo 4-4).



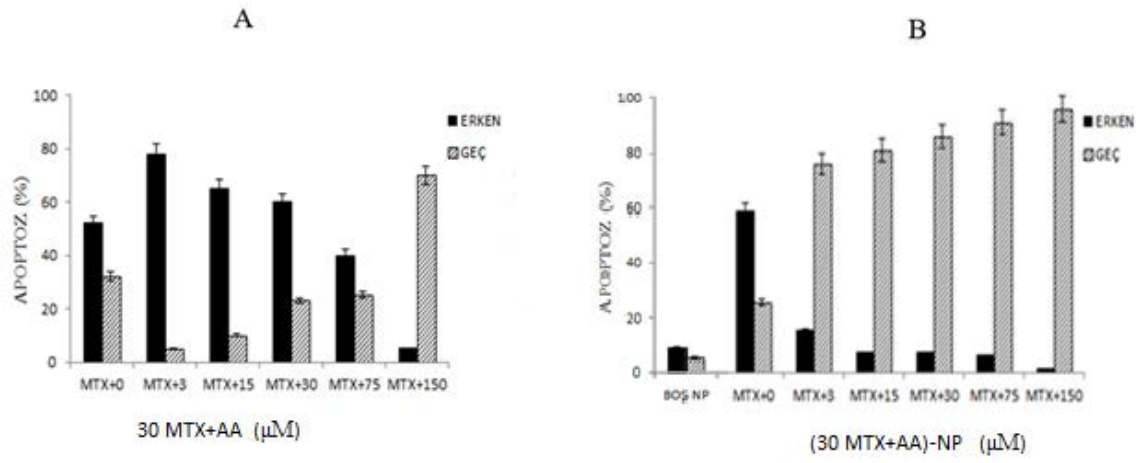
Şekil 4-27:HUVEC hücrelerinde 30 μ M MTX+AA varlığında Akım sitometri ile apoptoz analizleri. (A) Boş kapsül, (B) 30 μ M MTX, (C) 30 μ M MTX+3 μ M AA, (D) 30 μ M MTX+15 μ M, (E) 30 μ M MTX+30 μ M, (F) 30 μ M MTX+75 Mm AA, (G) 30 μ M MTX+150 μ M AA.



Şekil 4-28:HUVEC hücrelerinde AA-NP , MTX-NP ve (30 μ M MTX+AA)-NP 48 saat noktasal grafiği. (A) Boş kapsül, (B) 3 μ M AA-NP, (C) 30 μ M MTX-NP, (D) (30 μ M MTX+3 μ M AA)-NP.

	Boyanmamış Hücreler	Anneksin V	PI	Anneksin V + PI
30 μM MTX	%16.88	%58.81	%24.38	%0.14
30MTX+AA μM				
3	%4.42	%14.47	%80.82	%0.28
15	%5.74	%6.76	%83.28	%4.21
30	%5.06	%6.37	%87.51	%1.06
75	%0.94	%5.93	%93.01	%0.12
150	%2.01	%0.41	%97.30	%0.27

Tablo 4-4:HUVEC hücrelerinde 48 saat (MTX+AA)-NP noktasal grafiğinin detaylı gösterimi.



Şekil 4-29:HUVEC hücrelerinde farklı değerlerde 48 saat 30 μM MTX+AA'nın apoptoz oranları. (A) 30 μM MTX+AA (B) (30 μM MTX+AA)-NP .

4.4. İSTATİSTİK ANALİZLER

4.4.1. MTT Analizleri için İstatistik Analiz

One way anova testi için ön koşul homojen dağılımlılığı incelenmiş olup ($p: 0,00 < 0,05$) verinin homojen dağılmadığı tespit edilmiştir. Bu yüzden Tamhane test analiz verileri incelenerek Boş nano patrikul ile mitoksantron ($p:0,00 < 0,05$), AA ile 30 μM MTX+ AA ($p:0,00 < 0,05$), boş NP ile AA ($p:0,00 < 0,05$), boş NP ile 30 μM MTX+AA ($p:0,00 < 0,05$), ve MTX ile 30 μM MTX+AA ($p:0,00 < 0,05$) arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir.

4.4.2. Akım Sitometri için İstatistik Analiz

One Way Anova testi için erken apoptoz ön koşul homojen dağılımlılığı incelenmiş olup, verinin homojen dağılmadığı tespit edilmiştir. Bu doğrultuda Tamhane test analiz verileri incelenerek kontrol, MTX, AA, MTX-NP, AA-NP ($p:0,006 < 0,05$) ve 30 μM MTX+AA ve (30 μM MTX+AA)-NP artan konsantrasyonlarda AA ile kontrol ($p:0,007 < 0,05$) arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir.

30 μM MTX+AA maddesinin erken apoptoz ortalaması (Mean: 26,90) diğer maddelere oranla daha fazladır.

One Way Anova testi için geç apoptoz ön koşul homojen dağılımlılığı incelenmiş olup, verinin homojen dağılmadığı tespit edilmiştir. Bu doğrultuda Tamhane test analiz verileri incelenerek AA ile kontrol ($p:0,002 < 0,05$), AA ile Boş Kapsül ($p:0,018 < 0,05$) ve 30 μM MTX+AA ile kontrol ($p:0,001 < 0,05$), MTX-NP, AA-NP, (MTX+AA)-NP ile Boş Kapsül ($p:0,005 < 0,05$) arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir.

30 μM MTX+AA maddesinin geç apoptoz ortalaması (Mean: 45,1) diğer maddelere oranla daha fazladır. SPSS programı one way anova testinde Tamhane testi kullanılarak akım sitometri deneylerinin istatistik analizi yapılmıştır ve $p < 0,05$ bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, günümüzde kadınlarda en çok tanı konulan kanser türü ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. Sekiz kadından biri hayatı boyunca istilacı bir meme kanseri geliştirir. 2020'de meme kanserinin tüm aşamaları için 5 yıllık sağkalım oranı % 90 olarak belirlenmiştir (145). Meme kanseri ve diğer kanser türleri için AA ve türevlerinin yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Meme kanseri tedavisinde kullanılan geleneksel kemoterapötik ajanlarının çoğu sistematik toksisiteye neden olmaktadır. Kemoterapi uygulamadaki amaçlar; Hastalığı tedavi etmek, kanser hücrelerinin çoğalmasını önlemek, metastaza engel olmak, hastalığa bağlı cerrahi veya radyoterapi öncesi uygulanarak yapılacak lokal tedavileri kolaylaştırmaktır. Cerrahi veya radyoterapi sonrası uygulandığında hastalığın tekrar etme olasılığını azaltmaktır. Kemoterapi meme kanseri üzerinde kullanılan yaygın bir tedavi yöntemidir. AA ve türevleri antikanser ilacı olarak günümüzde kullanılmaktadırlar. Meme kanseri standart tedavisinde en yaygın amino antrakinin örneklerinden biri olan MTX ilacın anti tümör aktivitesinin yanında anti viral ve anti bakteriyel etkileri de mevcuttur. MTX başlıca meme, lösemi, akutmiyeloid lösemi, non-hodgkin ve lenfoma kanserlerinin tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve çeşitli hastalıklar için onaylanmış bir kemoterapötik ajandır. MTX, bir tip II topoizomera inhibitörüdür; DNA bazları arasında araya girerek hem sağlıklı hücrelerde hem de kanser hücrelerinde DNA sentezini ve DNA onarımını bozar (146).

Bu tez çalışmasında, MCF-7 İle HUVEC üzerinde yeni sentezlenen AA türevi ve MTX'in enkapsüle edilmeyen ve İyonik jelleşme yöntemi ile nanopartikül haline getirilen formları kullanıldı. Kapsülleme yönteminin faydaları, kapsül içerisine alınan maddelerin olumsuz ortamda korunması, kontrollü salınım için korunması ve hassas hedeflemeler yapabilmesidir (147). Çeşitli uygulamalar için kullanılan nanokapsülün tipik boyutu 10-1000 nm arasında değişir. Bununla birlikte, nanokapsülün hazırlanmasına ve kullanımına bağlı olarak boyut daha spesifik olacaktır (148).

Yapmış olduğumuz tez çalışmasında nanokapsül boyutlarını yaklaşık olarak 10 ile 1000 nm arasında hesaplandı. Kapsül içerisine AA maddesi alınan kapsüllerin boyutlarının küçüldüğü SEM görüntüleri ile analiz edildi. 24 saat inkübasyon sonrası

kontrollü ilaç salınımından dolayı hücreler üzerinde daha az ölüm görülürken, 48 saat sonrasında kapsülsüz madde uygulamasına göre daha sitotoksik özellik gösterdiği gözlemlendi. Nano kapsül haline getirilen ilaçların 24 saat ile az etki gösterip 48 saat sonunda ise daha fazla etki gösterdiği benzer çalışmalar mevcuttur (149). AA ve MTX'in her iki formu bağımsız ve ayrıca sinerjistik etkinliklerini gözlemlemek amacı ile birlikte kullanıldı. Bu doğrultuda, sitotoksik testleri MTT yöntemi ile gerçekleştirildi. Elde edilen veriler analiz edilerek hücrelerin %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonları (IC_{50}) değerleri hesaplandı. MTX'in kapsülsüz uygulamasında IC_{50} değeri MCF hücrelerinde 24 saat sonunda 30 μ M olarak belirlendi. Nano partikül formundaki maddelerle yapılan çalışmalarda 24 saat sonunda önemli bir sitotoksik etkiye rastlanmadığı için, nanokapsülleme ile yapılan tüm deneyler 48 saat inkübasyonu takiben gerçekleştirildi. MTX-NP'nin 48 saat sonundaki IC_{50} değeri 20 μ M olduğu görüldü. Bu sonuç MCF-7 hücreleri ile yapılan önceki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (130).

Antikanser etkisinin yüksek olduğunu düşündüğümüz sentezlenen özgün AA molekülü ile yapılan MTT analizinde 24 saat süre ile MCF-7 hücrelerine direkt artan konsantrasyonlarda MTX uygulandığında IC_{50} değeri 30 μ M olarak belirlendi. AA-NP'nin 48 saat süre ile artan konsantrasyonlarda inkübe edilen hücrelerde IC_{50} değerinin 20 μ M'a düştüğü görüldü. Kontrol olarak HUVEC hücreleri kullanıldı. MTX'in kapsülsüz uygulamasında IC_{50} değeri HUVEC hücrelerinde 24 saat sonunda 40 μ M olarak belirlendi. Nano partikül formundaki maddelerle yapılan çalışmalarda 24 saat sonunda önemli bir sitotoksik etkiye rastlanmadığı için, nanokapsülleme ile yapılan tüm deneyler 48 saat inkübasyonu takiben gerçekleştirildi. MTX-NP'nin 48 saat sonundaki IC_{50} değerinin 30 μ M olduğu görüldü. Sonuç olarak MTX ve MTX-NP'nin kanser hücreleri kadar olmasa da normal hücreler üzerinede toksik etki gösterdiği görüldü.

AA'nın HUVEC üzerine sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde 24 saat sürede IC_{50} değeri 35 μ M olarak belirlendi. 48 saat süre ile artan konsantrasyonlarda AA-NP ile inkübe edilen hücrelerde IC_{50} değeri 30 μ M olarak belirlendi. Bu sonuçlar bize AA maddesinin HUVEC hücrelerine daha fazla toksik etkiye sahip olduğunu gösterdi.

AA'nın MTX etkinliği üzerine etkisini değerlendirmeye yönelik olarak MTT analizleri 24 saat MTX+AA ve 48 saat (MTX+AA)-NP formlarında MCF-7 ve HUVEC hücrelerinde birlikte değerlendirildi. MCF- hücrelerinde MTX'in artan

konsantrasyonlarda AA ile inkübasyonu sonucu hücre canlılığının %80 HUVEC hücrelerinde ise %90 oranında azaldığı görüldü. 24 saat süre ile 30 μ M MTX ile artan konsantrasyonlarda AA ile birlikte en kapsüle edildiğinde, kontrollü ilaç salınımından dolayı önemli bir sitotoksik etki izlenmedi. 48 saat (MTX+AA)-NP formunun MCF-7 hücrelerinde kontrole göre %60 HUVEC’lerde ise % 70 oranında canlılığı azalttığı görüldü. Bu sonuçlar bize AA’nın sinerjistik etki göstererek MTX etkinliğini arttırdığını gösterdi.

Apoptoz programlanmış hücre ölümüdür. Apoptozu hücreler üzerinde gözlemleyebilmek için akım sitometri analizi kullanılır. Bu çalışmada MCF-7 ve HUVEC hücrelerinde 24 saat AA ve 48 saat AA-NP apoptotik analizleri gerçekleştirildi. MCF-7 hücrelerinde 24 saat AA varlığında artan konsantrasyona bağlı olarak geç apoptozun indüklenmesine karşın HUVEC hücrelerinde erken apoptozun indüklendiği görüldü. 48 saat AA-NP varlığında ise artan konsantrasyona bağlı olarak MCF-7 hücrelerinde erken apoptozun indüklendiği, HUVEC’ler de ise geç apoptozun indüklendiği görüldü. AA’nın HUVEC hücreleri üzerinde daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu bilinmekle birlikte yapılan analizde boş-NP’inde hücreler üzerinde az da olsa toksik etkisi olduğu izlendi. Bu durum daha önceki yapılan çalışmalarda farklı nanokapsüllerinde toksik etkiye sahip olabileceği bilgisi ile örtüşmektedir (150).

AA ve MTX’in birlikte sinerjistik etkinliğinin apoptoz düzeyindeki etkisini açıklayabilmek 30 μ M MTX ile Gereç ve Yöntemlerde belirtilen artan konsantrasyonlarda AA ile 24 saat inkübasyonları sonucunda MCF-7 hücrelerinde bu (30 μ M MTX+AA) kombinasyonunun geç apoptozu indüklemesine karşın 48 saat inkübe edilen (30 μ M MTX+AA)-NP formunun ise erken apoptozu indüklediği görülmüştür. HUVEC hücrelerinde ise 24 saat inkübasyon sonucunda (30 μ M MTX+AA) kombinasyonu ile (30 μ M MTX+AA)-NP’nin her ikisinde erken apoptozu indüklediği görülmüştür. Bu farklı apoptoz evrelerinin indüklenmesi NP etkisi ve hücrelerin başlangıçtaki sikluslarının farklı olması ile değerlendirilebilir.

Yeni sentezlenen özgün AA molekülünün kontrol olarak kullanılan HUVEC hücreleri üzerine de sitotoksik etkinliğinin yüksek olması ileriki çalışmalarda farklı kökenli normal hücrelerle de çalışmaların yapılmasını gerekli kılmıştır. Bu tez çalışmasında AA’nın MCF-7 ve HUVEC hücrelerinde apoptozu indüklediği, MTX ile birlikte kullanıldığında ilacın etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir. AA’nın tek başına ilaç adayı molekül olarak kullanılması için farklı kanser türleri ile yapılacak olan ek

deneyler, ve *in vivo* alışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışması ve ilerde yapmayı planladığımız deneyler yerli ilaç adayı molekül üretimine önemli bir katkı sağlayacağımızı öngörmekteyiz.



KAYNAKLAR

1. Cokkinides, V., Albano, J., Samuels, A., Ward, M. E., &Thum, J. M. (2005). American cancer society: Cancerfactsandfigures. *Atlanta: AmericanCancerSociety*.
2. J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence andmortality worldwide: sources, methodsandmajorpatterns in GLOBOCAN 2012, *Int. J. Cancer* 136 (2015) E359–E386,
3. Roche, H.,&Vahdat, L. T. (2011). Treatment of metastaticbreastcancer: secondlineandbeyond. *Annals of Oncology*, 22(5), 1000-1010.
4. Danhier, F.,Feron, O., &Pr  at, V. (2010). Toex ploitthe tumormicro environment: passiveand active tumor targeting of nano carriersfor anti-cancer drug delivery. *Journal of controlledrelease*, 148(2), 135-146.
5. Davis, M. E.,Chen, Z., &Shin, D. M. (2010). Nanoparticletherapeutics: an emergingtreatmentmodalityforcancer. In *Nanoscienceandtechnology: A collection of reviewsfromnaturejournals* (pp. 239-250).
6. Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature biotechnology*, 33(9), 941.
7. Feng, S. T., Li, J., Luo, Y., Yin, T., Cai, H., Wang, Y., ... & Li, Z. P. (2014). pH-sensitive nanomicelles for controlled and efficient drug delivery to human colorectal carcinoma LoVo cells. *PloS one*, 9(6), e100732.
8. Li, J.,Wang, X., Zhao, G., Chen, C., Chai, Z., Alsaedi, A., ... &Wang, X. (2018). Metal–organicframework-basedmaterials: superioradsorbentsforthecapture of toxicandradioactive metal ions. *ChemicalSocietyReviews*, 47(7), 2322-2356.
9. Guissi, N. E. I.,Li, H., Xu, Y., Semcheddine, F., Chen, M., Su, Z., &Ping, Q. (2017). Mitoxantrone-and folate-TPGS2k conjugatehybridmicellar aggregates tocircumventtoxicityandenhanceefficiencyforbreastcancertherapy. *Molecularpharmaceutics*, 14(4), 1082-1094.
10. Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: frompathogenesisistotreatment. *Journal of Experimental&ClinicalCancerResearch*, 30(1), 87.
11. Diaz, D.,Prieto, A., Reyes, E., Barcenilla, H., Monserrat, J., &Alvarez-Mon, M. (2015). Flowcytometryenumeration of apoptoticcancercellsbyapoptotic rate. In *ApoptosisandCancer* (pp. 11-20). HumanaPress, New York, NY.
12. McGuire, S. (2016). World cancer report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, international agency for research on cancer, WHO Press, 2015.

13. Cree, I. A. (2011). Cancer biology. In *Cancer Cell Culture* (pp. 1-11). Humana Press.
14. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
15. Harbeck, N., & Gnant, M. (2017). Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. *Lancet*, 389(10074), 1134-50.
16. Rojas, K., & Stuckey, A. (2016). Breast cancer epidemiology and risk factors. *Clinical obstetrics and gynecology*, 59(4), 651-672.
17. Ullah, M. F. (2019). Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status. In *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance* (pp. 51-64). Springer, Cham.
18. Reeves, G. K., Beral, V., Green, J., Gathani, T., Bull, D., & Million Women Study Collaborators. (2006). Hormonal therapy for menopause and breast-cancer risk by histological type: a cohort study and meta-analysis. *The lancet oncology*, 7(11), 910-918.
19. Cuzick, J., DeCensi, A., Arun, B., Brown, P. H., Castiglione, M., Dunn, B., ... & Vogel, V. (2011). Preventive therapy for breast cancer: a consensus statement. *The lancet oncology*, 12(5), 496-503.
20. Yousef, A. J. A. (2017, August). Male breast cancer: epidemiology and risk factors. In *Seminars in oncology* (Vol. 44, No. 4, pp. 267-272). WB Saunders.
21. Gucalp, A., Traina, T. A., Eisner, J. R., Parker, J. S., Selitsky, S. R., Park, B. H., ... & Cardoso, F. (2019). Male breast cancer: a disease distinct from female breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 173(1), 37-48.
22. Ruddy, K. J., & Winer, E. P. (2013). Male breast cancer: risk factors, biology, diagnosis, treatment, and survivorship. *Annals of oncology*, 24(6), 1434-1443.
23. Elseaty, A., & Taktash, M. (2020). Do Birth control pills increase the chance of getting breast cancer.
24. Alawad, M. A. M. (2016). Employed High Schools Women's knowledge regarding Breast Cancer in Shandi, River Nile State, Sudan (2016) (Doctoral dissertation, University of Gezira).
25. Howlader, N., Noone, A. M., Krapcho, M., Garshell, J., Miller, D., Altekruse, S. F., ... & Cronin, K. A. (1975). SEER cancer statistics review. National Cancer Institute, 2008.
26. Howlader, N., Cronin, K. A., Kurian, A. W., & Andridge, R. (2018). Differences in breast cancer survival by molecular subtypes in the United States. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 27(6), 619-626.

27. Ferreira, M. A., Gamazon, E. R., Al-Ejeh, F., Aittomäki, K., Andrulis, I. L., Anton-Culver, H., ... & Parsons, M. T. (2019). Genome-wide association and transcriptome studies identify target genes and risk loci for breast cancer. *Nature communications*, 10(1), 1-18.
28. Casaubon, J. T., Kashyap, S., & Regan, J. P. (2017). BRCA 1 and 2.
29. Hamel, P. J. (2010). BRCA1 and BRCA2: No Longer the Only Troublesome Genes Out There. *HealthCentral*. Retrieved, 07-02.
30. Duncan, J. A., Reeves, J. R., & Cooke, T. G. (1998). BRCA1 and BRCA2 proteins: roles in health and disease. *Molecular pathology*, 51(5), 237.
31. Irminger-Finger, I., Ratajska, M., & Pilyugin, M. (2016). New concepts on BARD1: Regulator of BRCA pathways and beyond. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 72, 1-17.
32. Friedenson, B. (2007). The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC cancer*, 7(1), 1-11.
33. Sattar, S. A., Khashman, B. M., Abdulla, K. N., Al-Obaidie, S., & Fadhil, N. K. Expression of Brca1 in a Group of Iraqi Patients with Breast Cancer.
34. O'Donovan, P. J., & Livingston, D. M. (2010). BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis*, 31(6), 961-967.
35. Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., ... & Livingston, D. M. (2006). Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Molecular cell*, 22(6), 719-729.
36. Sy, S. M. H., Huen, M. S., Zhu, Y., & Chen, J. (2009). PALB2 regulates recombinational repair through chromatin association and oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 284(27), 18302-18310.
37. Antoniou, A. C., Casadei, S., Heikkinen, T., Barrowdale, D., Pylkäs, K., Roberts, J., ... & Tischkowitz, M. (2014). Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *New England Journal of Medicine*, 371(6), 497-506.
38. Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B., & Yu, X. (2009). PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Current Biology*, 19(6), 524-529.
39. Casadei, S., Norquist, B. M., Walsh, T., Stray, S., Mandell, J. B., Lee, M. K., ... & King, M. C. (2011). Contribution of inherited mutations in the BRCA2-interacting protein PALB2 to familial breast cancer. *Cancer research*, 71(6), 2222-2229.

40. Erkkö, H., Xia, B., Nikkilä, J., Schleutker, J., Syrjäkoski, K., Mannermaa, A., ... & Winqvist, R. (2007). A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature*, 446(7133), 316-319.
41. Ferreira, M. A., Gamazon, E. R., Al-Ejeh, F., Aittomäki, K., Andrulis, I. L., Anton-Culver, H., ... & Parsons, M. T. (2019). Genome-wide association and transcriptome studies identify target genes and risk loci for breast cancer. *Nature communications*, 10(1), 1-18.
42. Eniu, A., Kotha, S. R., ... & Conteh, L. (2017). The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. *The Lancet*, 389(10071), 847-860.
43. Al-Turkmani, M. R., Deharvengt, S. J., & Lefferts, J. A. (2020). Molecular assessment of human diseases in the clinical laboratory. In *Essential Concepts in Molecular Pathology* (pp. 563-578). Academic Press.
44. Willsher, P. (2011). *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases* (4th Edn). ANZ Journal of Surgery, 81(1-2), 98-98.
45. Asif, H. M., Sultana, S., Ahmed, S., Akhtar, N., & Tariq, M. (2016). HER-2 positive breast cancer-a mini-review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(4), 1609-1615.
46. Loibl, S., & Gianni, L. (2017). HER2-positive breast cancer. *The Lancet*, 389(10087), 2415-2429.
47. Benz, C. C., Scott, G. K., Sarup, J. C., Johnson, R. M., Tripathy, D., Coronado, E., ... & Osborne, C. K. (1992). Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast cancer research and treatment*, 24(2), 85-95.
48. Lee, A. V., Oesterreich, S., & Davidson, N. E. (2015). MCF-7 cells—changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 107(7).
49. Tsang, J., & Tse, G. M. (2020). Molecular classification of breast cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, 27(1), 27-35.
50. Weiss, A., Chavez-MacGregor, M., Lichtensztajn, D. Y., Yi, M., Tadros, A., Hortobagyi, G. N., ... & Mittendorf, E. A. (2018). Validation study of the American Joint Committee on Cancer eighth edition prognostic stage compared with the anatomic stage in breast cancer. *JAMA oncology*, 4(2), 203-209.
51. Vara, S., Karnena, M. K., & Dwarapureddi, B. K. (2020). Epidemiology of cancers in women. In *A Theranostic and Precision Medicine Approach for Female-Specific Cancers* (pp. 71-90). Academic Press.
52. Rojas, K., & Stuckey, A. (2016). Breast cancer epidemiology and risk factors. *Clinical obstetrics and gynecology*, 59(4), 651-672.

53. Erbas, B., Provenzano, E., Armes, J., & Gertig, D. (2006). The natural history of ductal carcinoma in situ of the breast: a review. *Breast cancer research and treatment*, 97(2), 135-144.
54. Collins, L. C., Tamimi, R. M., Baer, H. J., Connolly, J. L., Colditz, G. A., & Schnitt, S. J. (2005). Outcome of patients with ductal carcinoma in situ untreated after diagnostic biopsy: results from the Nurses' Health Study. *Cancer*, 103(9), 1778-1784.
55. Thomas, M., Kelly, E. D., Abraham, J., & Kruse, M. (2019, April). Invasive lobular breast cancer: A review of pathogenesis, diagnosis, management, and future directions of early stage disease. In *Seminars in oncology* (Vol. 46, No. 2, pp. 121-132). WB Saunders.
56. Dieci, M. V., Orvieto, E., Dominici, M., Conte, P., & Guarneri, V. (2014). Rare breast cancer subtypes: histological, molecular, and clinical peculiarities. *The oncologist*, 19(8), 805.
57. Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *nature*, 406(6797), 747-752.
58. Howlader, N., Cronin, K. A., Kurian, A. W., & Andridge, R. (2018). Differences in breast cancer survival by molecular subtypes in the United States. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 27(6), 619-626.
59. Parise, C. A., & Caggiano, V. (2017). Risk of mortality of node-negative, ER/PR/HER2 breast cancer subtypes in T1, T2, and T3 tumors. *Breast cancer research and treatment*, 165(3), 743-750.
60. Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K. R., André, F., Tordai, A., Mejia, J. A., ... & Pusztai, L. (2008). Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 26(8), 1275-1281.
61. Prat, A., Adamo, B., Cheang, M. C., Anders, C. K., Carey, L. A., & Perou, C. M. (2013). Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *The oncologist*, 18(2), 123.
62. Silverman, P. (2012). *Oncologic Imaging: A Multidisciplinary Approach E-Book*. Elsevier Health Sciences.
63. Plevritis, S. K., Munoz, D., Kurian, A. W., Stout, N. K., Alagoz, O., Near, A. M., ... & Mandelblatt, J. S. (2018). Association of screening and treatment with breast cancer mortality by molecular subtype in US women, 2000-2012. *Jama*, 319(2), 154-164.
64. Costa, R. L., & Gradishar, W. J. (2017). Triple-negative breast cancer: current practice and future directions. *Journal of Oncology Practice*, 13(5), 301-303.

65. Sharma, P. (2016). Biology and management of patients with triple-negative breast cancer. *The oncologist*, 21(9), 1050.
66. Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation*, 121(7), 2750-2767.)
67. Gschwind, A., Fischer, O. M., & Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(5), 361-370.
68. Chen, X., Xu, D., Li, X., Zhang, J., Xu, W., Hou, J., ... & Tang, J. (2019). Latest overview of the cyclin-dependent kinases 4/6 inhibitors in breast cancer: the past, the present and the future. *Journal of Cancer*, 10(26), 6608.
69. Cesca, M. G., Vian, L., Cristóvão-Ferreira, S., Pondé, N., & de Azambuja, E. (2020). HER2-positive advanced breast cancer treatment in 2020. *Cancer Treatment Reviews*, 88.
70. Wolff, A. C., Tung, N. M., & Carey, L. A. (2019). Implications of Neoadjuvant Therapy in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer.
71. Dasgupta, A. (2016). Limitations of immunoassays used for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. In *Personalized Immunosuppression in Transplantation* (pp. 29-56). Elsevier.
72. Wu, J., & Waxman, D. J. (2018). Immunogenic chemotherapy: dose and schedule dependence and combination with immunotherapy. *Cancer letters*, 419, 210-221
73. Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *Jama*, 321(3), 288-300.
74. Cortazar, P., Zhang, L., Untch, M., Mehta, K., Costantino, J. P., Wolmark, N., ... & Von Minckwitz, G. (2014). Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *The Lancet*, 384(9938), 164-172.
75. Masuda, N., Lee, S. J., Ohtani, S., Im, Y. H., Lee, E. S., Yokota, I., ... & Toi, M. (2017). Adjuvant capecitabine for breast cancer after preoperative chemotherapy. *New England Journal of Medicine*, 376(22), 2147-2159.
76. Wu, J., & Waxman, D. J. (2018). Immunogenic chemotherapy: dose and schedule dependence and combination with immunotherapy. *Cancer letters*, 419, 210-221.
77. Roy, P. S., & Saikia, B. J. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian journal of cancer*, 53(3), 441.
78. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. (2011). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death:

meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. *The Lancet*, 378(9804), 1707-1716.

79. Leyland-Jones, B. (2002). Trastuzumab: hopes and realities. *The lancet oncology*, 3(3), 137-144.

80. Fang, L., Barekati, Z., Zhang, B., Liu, Z., & Zhong, X. Y. (2011). Targeted therapy in breast cancer: what's new?. *Swiss medical weekly*, 141(2526).

81. Burstein, H. J., Lacchetti, C., Anderson, H., Buchholz, T. A., Davidson, N. E., Gelmon, K. A., ... & Griggs, J. J. (2019). Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: ASCO clinical practice guideline focused update. *J Clin Oncol*, 37(5), 423-438.

82. Schmid, P., Adams, S., Rugo, H. S., Schneeweiss, A., Barrios, C. H., Iwata, H., ... & Emens, L. A. (2018). Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 379(22), 2108-2121.

83. Koeller, J., & Eble, M. (1988). Mitoxantrone: a novel anthracycline derivative. *Clinical pharmacy*, 7(8), 574-581.

84. National Institutes of Health. (2017). Livertox: clinical and research information on drug-induced liver injury. Bethesda, MD.: US National Library of Medicine.

85. Nguyen, T. T. H., Pandey, R. P., Parajuli, P., Han, J. M., Jung, H. J., Park, Y. I., & Sohng, J. K. (2018). Microbial synthesis of non-natural anthraquinone glucosides displaying superior antiproliferative properties. *Molecules*, 23(9), 2171.

86. Jiao, X., Zhao, L., Ma, M., Bai, X., He, M., Yan, Y., ... & Cui, Z. (2013). MiR-181a enhances drug sensitivity in mitoxantrone-resistant breast cancer cells by targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Breast cancer research and treatment*, 139(3), 717-730.

87. Morreal, C. E., Bernacki, R. J., Hillman, M., Atwood, A., & Cartonia, D. (1990). Antitumor properties of tetrahydrobenz (a) anthraquinone derivatives. *Journal of medicinal chemistry*, 33(2), 490-492.

88. Krishnamoorthy, C. R., Yen, S. F., Smith, J. C., Lown, J. W., & Wilson, W. D. (1986). Stopped-flow kinetic analysis of the interaction of anthraquinone anticancer drugs with calf thymus DNA, poly [d (GC)]. cntdot. poly [d (GC)], and poly [d (AT)]. cntdot. poly [d (AT)]. *Biochemistry*, 25(20), 5933-5940.

89. Nakagawa, M., Schneider, E., Dixon, K. H., Horton, J., Kelley, K., Morrow, C., & Cowan, K. H. (1992). Reduced intracellular drug accumulation in the absence of P-glycoprotein (mdr1) overexpression in mitoxantrone-resistant human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer research*, 52(22), 6175-6181.

90. Mosaffa, F., Lage, H., Afshari, J. T., & Behravan, J. (2009). Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha increase ABCG2 expression in MCF-7 breast carcinoma

cell line and its mitoxantrone-resistant derivative, MCF-7/MX. *Inflammation research*, 58(10), 669-676.

91. Faulds, D., Balfour, J. A., Chrisp, P., & Langtry, H. D. (1991). Mitoxantrone. *Drugs*, 41(3), 400-449.

92. Seifrtova, M., Havelek, R., Chmelarova, M., Cmielova, J., Muthna, D., Stoklasova, A., ... & Rezacova, M. (2011). The effect of ATM and ERK1/2 inhibition on mitoxantrone-induced cell death of leukaemic cells. *Folia Biol (Praha)*, 57(2), 74-81.

93. Fan, J. T., Kuang, B., Zeng, G. Z., Zhao, S. M., Ji, C. J., Zhang, Y. M., & Tan, N. H. (2011). Biologically active arborinane-type triterpenoids and anthraquinones from *Rubia yunnanensis*. *Journal of natural products*, 74(10), 2069-2080.

94. Khan, S. N., Lal, S. K., Kumar, P., & Khan, A. U. (2010). Effect of mitoxantrone on proliferation dynamics and cell-cycle progression. *Bioscience reports*, 30(6), 375-381.

95. Avasarala, J. R., Cross, A. H., Clifford, D. B., Singer, B. A., Siegel, B. A., & Abbey, E. E. (2003). Rapid onset mitoxantrone-induced cardiotoxicity in secondary progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 9(1), 59-62.

96. Rossato, L. G., Costa, V. M., de Pinho, P. G., Arbo, M. D., de Freitas, V., Vilain, L., ... & Remiao, F. (2013). The metabolic profile of mitoxantrone and its relation with mitoxantrone-induced cardiotoxicity. *Archives of toxicology*, 87(10), 1809-1820.

97. Wang, J., Gao, R., Li, Q., Xie, S., Zhao, J., & Wang, C. (2012). Synthesis, cytotoxicity, and cell death profile of polyaminoanthraquinones as antitumor agents. *Chemical biology & drug design*, 80(6), 909-917.

98. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239-257.

99. Glücksmann, A. (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews*, 26(1), 59-86.

100. Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2015). *Robbins & Cotran pathologic basis of disease* (p. 955).

101. Reed, J. C. (1999). Dysregulation of apoptosis in cancer. *Journal of clinical oncology*, 17(9), 2941-2941.

102. Hickman, J. A. (1992). Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer and Metastasis Reviews*, 11(2), 121-139.

103. Ellis, P. A., Sacconi-Jotti, G., Clarke, R., Johnston, S. R., Anderson, E., Howell, A., ... & Dowsett, M. (1997). Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *International Journal of Cancer*, 72(4), 608-613.

104. Parton, M., Dowsett, M., & Smith, I. (2001). Studies of apoptosis in breast cancer. *Bmj*, 322(7301), 1528-1532.
105. Gerl, R., & Vaux, D. L. (2005). Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis*, 26(2), 263-270.
106. Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., & Adjei, A. A. (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians*, 55(3), 178-194.
107. Sordo-Bahamonde, C., Lorenzo-Herrero, S., Payer, Á. R., Gonzalez, S., & López-Soto, A. (2020). Mechanisms of Apoptosis Resistance to NK Cell-Mediated Cytotoxicity in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3726.
108. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239-257
109. Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
110. O'Brien, M. A., & Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of veterinary emergency and critical care*, 18(6), 572-585.
111. Motadi, L. R., Lekganyane, M. M., & Moela, P. (2018). RBBP6 expressional effects on cell proliferation and apoptosis in breast cancer cell lines with distinct p53 statuses. *Cancer management and research*, 10, 3357.
112. Kumar, R., Vadlamudi, R. K., & Adam, L. (2000). Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 7(4), 257-269.
113. Anderson, T. J. (1999). Pathological studies of apoptosis in the normal breast. *Endocrine-related cancer*, 6(1), 9-12.
114. Kelloff, G. J., Sigman, C. C., Johnson, K. M., Boone, C. W., Greenwald, P., Crowell, J. A., ... & Doody, L. A. (2000). Perspectives on surrogate end points in the development of drugs that reduce the risk of cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 9(2), 127-137.
115. 14. Allan, D. J., Howell, A., Roberts, S. A., Williams, G. T., Watson, R. J., Coyne, J. D., ... & Potten, C. S. (1992). Reduction in apoptosis relative to mitosis in histologically normal epithelium accompanies fibrocystic change and carcinoma of the premenopausal human breast. *The Journal of pathology*, 167(1), 25-32.
116. Mommers, E. C., Van Diest, P. J., Leonhart, A. M., Meijer, C. J., & Baak, J. P. (1999). Balance of cell proliferation and apoptosis in breast carcinogenesis. *Breast cancer research and treatment*, 58(2), 163-169.

117. Bloom, H. J. G., & Richardson, W. W. (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *British journal of cancer*, 11(3), 359.
118. (Lipponen, P., Aaltomaa, S., Kosma, V. M., & Syrjänen, K. (1994). Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *European Journal of Cancer*, 30(14), 2068-2073.).
119. Forrest, A. P. M., Chetty, U., Miller, W. R., Levack, P., Hawkins, R. A., Smyth, J. F., & Anderson, T. J. (1986). A human tumour model. *The Lancet*, 328(8511), 840-842.
120. Wolff, A. C., & Davidson, N. E. (2000). Primary systemic therapy in operable breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 18(7), 1558-1569.
121. Ellis, P. A., Smith, I. E., McCarthy, K., Detre, S., Salter, J., & Dowsett, M. (1997). Preoperative chemotherapy induces apoptosis in early breast cancer. *The Lancet*, 349(9055), 849.
122. Archer, C. D., Ellis, P. A., Salter, J., Hills, M., Dowsett, M., & Smith, I. E. (1999). Induction of apoptosis and reduction in proliferation 24 hours after chemotherapy in early breast cancer. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncologists*, 18.
123. Ellis, P. A., Smith, I. E., Detre, S., Burton, S. A., Salter, J., A'hern, R., ... & Dowsett, M. (1998). Reduced apoptosis and proliferation and increased Bcl-2 in residual breast cancer following preoperative chemotherapy. *Breast cancer research and treatment*, 48(2), 107-116.
124. Krajewski, S., Krajewska, M., Turner, B. C., Pratt, C., Howard, B., Zapata, J. M., ... & Reed, J. C. (1999). Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 6(1), 29-40.
125. Turner, B. C., Krajewski, S., Krajewska, M., Takayama, S., Gumbs, A. A., Carter, D., ... & Reed, J. C. (2001). BAG-1: a novel biomarker predicting long-term survival in early-stage breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 19(4), 992-1000.
126. Ferreira, C. G., Tolis, C., & Giaccone, G. (1999). p53 and chemosensitivity. *Annals of oncology*, 10(9), 1011-1022.
127. Bergh, J. (1999). Clinical studies of p53 in treatment and benefit of breast cancer patients. *Endocrine-related cancer*, 6(1), 51-59.
128. Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2), 171.
129. Kumar, S. (1999). Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death & Differentiation*, 6(11), 1060-1066.

130. Vakkala, M., Pääkkö, P., & Soini, Y. (1999). Expression of caspases 3, 6 and 8 is increased in parallel with apoptosis and histological aggressiveness of the breast lesion. *British journal of cancer*, 81(4), 592-599.
131. Comini, L. R., Fernandez, I. M., Vittar, N. R., Montoya, S. N., Cabrera, J. L., & Rivarola, V. A. (2011). Photodynamic activity of anthraquinones isolated from *Heterophyllaea pustulata* Hook f.(Rubiaceae) on MCF-7c3 breast cancer cells. *Phytomedicine*, 18(12), 1093-1095.
132. August, K. J., Guest, E. M., Lewing, K., Hays, J. A., & Gamis, A. S. (2020). Treatment of children with relapsed and refractory acute lymphoblastic leukemia with mitoxantrone, vincristine, pegaspargase, dexamethasone, and bortezomib. *Pediatric blood & cancer*, 67(3), e28062.
133. Xing, Y. X., Li, M. H., Tao, L., Ruan, L. Y., Hong, W., Chen, C., ... & Wang, J. S. (2018). Anti-cancer effects of emodin on HepG2 cells as revealed by ¹H NMR based metabolic profiling. *Journal of proteome research*, 17(5), 1943-1952.
134. Choi, H. K., Ryu, H., Son, A. R., Seo, B., Hwang, S. G., Song, J. Y., & Ahn, J. (2016). The novel anthraquinone derivative IMP1338 induces death of human cancer cells by p53-independent S and G2/M cell cycle arrest. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 79, 308-314.
135. Stuart-Harris, R. C., Bozek, T., Pavlidis, N. A., & Smith, I. E. (1984). Mitoxantrone: an active new agent in the treatment of advanced breast cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 12(1), 1-4.
136. Zhang, P. Z., Yang, H. L., Li, C. C., Xia, Z. C., Wang, X. M., Wei, H., ... & Li, X. L. (2014). Synthesis of novel, azasugar-modified anthraquinone derivatives and their cytotoxicity. *Chinese Chemical Letters*, 25(7), 1057-1059.
137. Saini, K. S., & Walker, N. I. (1998). Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry*, 178(1-2), 9-25.
138. Kerr, J. F. R. (1971). Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *The Journal of pathology*, 105(1), 13-20.
139. Wang, T. T., & Phang, J. M. (1995). Effects of estrogen on apoptotic pathways in human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer research*, 55(12), 2487-2489.
140. Yeap, S., Akhtar, M. N., Lim, K. L., Abu, N., Ho, W. Y., Zareen, S., ... & Alitheen, N. B. (2015). Synthesis of an anthraquinone derivative (DHAQC) and its effect on induction of G2/M arrest and apoptosis in breast cancer MCF-7 cell line. *Drug design, development and therapy*, 9, 983.
141. Huang, H. S., Chiu, H. F., Yeh, P. F., & Yuan, C. L. (2004). Structure-Based Design and Synthesis of Regioisomeric Disubstituted Aminoanthraquinone Derivatives as Potential Anticancer Agents. *Helvetica chimica acta*, 87(4), 999-1006.

142. Santos-Vizcaino, E., Orive, G., Pedraz, J. L., & Hernandez, R. M. (2020). Clinical Applications of Cell Encapsulation Technology. In *Immobilization of Enzymes and Cells* (pp. 473-491). Humana, New York, NY.
143. Awasthi, R., Roseblade, A., Hansbro, P. M., Rathbone, M. J., Dua, K., & Bebawy, M. (2018). Nanoparticles in cancer treatment: opportunities and obstacles. *Current drug targets*, 19(14), 1696-1709.
144. Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature biotechnology*, 33(9), 941.
145. Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians*, 70(1), 7-30.
146. Mazerski, J., Martelli, S., & Borowski, E. (1998). The geometry of intercalation complex of antitumor mitoxantrone and ametantrone with DNA: molecular dynamics simulations. *Acta Biochimica Polonica*, 45(1), 1-11.
147. Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N., & Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 628-647.
148. Sagar, S., Reddy, M. S., Nanjwade, B. K., Srivani, M., & Sughandi, M. Targeting Cancer by Natural Polymeric Nanoparticles.
149. Vakilinezhad, M. A., Amini, A., Dara, T., & Alipour, S. (2019). Methotrexate and curcumin co-encapsulated PLGA nanoparticles as a potential breast cancer therapeutic system: In vitro and in vivo evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 184, 110515.
150. Bahadar, H., Maqbool, F., Niaz, K., & Abdollahi, M. (2016). Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. *Iranian biomedical journal*, 20(1), 1.

YENİ SENTEZLENEN AMİNO ANTRAKİNON TÜREVİNİN ANTİKANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%9

BENZERLİK ENDEKSİ

%5

İNTERNET KAYNAKLARI

%1

YAYINLAR

%6

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

%2

2

nek.istanbul.edu.tr:4444

İnternet Kaynağı

%1

3

Submitted to Marmara University

Öğrenci Ödevi

%1

4

tez.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%1

5

Submitted to Istanbul Kultur University

Öğrenci Ödevi

<%1

6

Submitted to Yakın Doğu Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%1

7

Submitted to Gaziantep Aniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%1

8

Submitted to (school name not available)

Öğrenci Ödevi

<%1

9

www.acibadem.com.tr

İnternet Kaynağı

<%1