



**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BORİK ASİT VE TAMOKSİFENİN AYNI ANDA UYGULANMASININ
HORMON RESEPTÖRÜ POZİTİF MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRE
DİZİLERİNDE SİNERJİSTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI.**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Salih TÜNBEKİCİ

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Erdem GÖKER**

**İZMİR
2021**

**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BORİK ASİT VE TAMOKSİFENİN AYNI ANDA UYGULANMASININ
HORMON RESEPTÖRÜ POZİTİF MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRE
DİZİLERİNDE SİNERJİSTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI.**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Salih TÜNBEKİCİ

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Erdem GÖKER**

**İZMİR
2021**

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca, bilgisi ve tecrübesiyle bana ışık tutan; sabrını, yardımını ve desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, bana bu mesleği sevdiren ve öğrencisi olmaktan her zaman onur ve mutluluk duyduğum saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Erdem Göker'e;

Uzmanlık eğitimim boyunca, bilgisi ve tecrübesini benimle paylaşan, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve benim için çok kıymetli olan Uz. Dr. Murat Karateke'ye

Tez sürecinde her anlamda yanımda olan, desteğini ve anlayışını hiçbir zaman esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Erkan Kahraman'a;

Uzmanlık eğitimim boyunca, bilgisi, deneyimi, sevgisi ve hoşgörüsü ile meslek hayatıma değer katan başta İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Fehmi Akçiçek olmak üzere tüm hocalarıma;

Uzmanlık eğitimim boyunca, birlikte çalışma fırsatı yakaladığım tüm uzman ve asistan arkadaşlarıma;

Asistanlık sürecimi güzelleştiren ve varlıklarıyla bana mutluluk veren Dr. Ümit Özmen'e Dr. Haydar Çağatay Yüksel'e, Dr. Caner Acar'a, Dr. Sadettin Dolar'a, Dr. Cemre Engin'e, Dr. Ahmet Alp Unat'a, Dr. Rabia Tuğçe Hocagil'e, Uz. Dr. Miray Bozgül'e, Doç. Dr. Devrim Bozkurt'a;

Tüm hayatım boyunca yanımda olan, her zorlukta bana destekolan, vaktini, güler yüzünü, sabrını benden esirgemeyen ve tanıdığım için kendimi çok şanslı saydığım Ecz. Ahmet Bozkurt'a ve Dr. İsmet Çulcuoğlu'na;

Hayatımın her anını onlara layık olabilmek için geçirdiğim, sevgilerini ve desteklerini her zaman arkamda hissettiğim canım annem Yüksel Tünbekici'ye, canım babam Haluk Tünbekici'ye ve benim için çok kıymetli olan biricik kardeşlerim Dr. İbrahim Tünbekici'ye ve Aynur Tünbekici'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Salih TÜNBEKİCİ

İzmir, 2021

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ
İÇİNDEKİLER.....	I
ÖZET	IV
ABSTRACT	VI
TABLolar LİSTESİ	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	IX
KISALTMALAR LİSTESİ	X
1. GİRİŞ VE TEZİN AMACI.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Meme Kanseri	2
2.1.1. Etiyoloji	2
2.1.1.1. Yaş.....	2
2.1.1.2. Cinsiyet.....	2
2.1.1.3. Kişisel Meme Kanseri Öyküsü	2
2.1.1.4. Histolojik Risk Faktörleri.....	3
2.1.1.5. Ailede Meme Kanseri Öyküsü ve Genetik Risk Faktörleri.....	3
2.1.1.6. Reprodüktif Risk Faktörleri.....	3
2.1.1.7. Ekzojen Hormon Kullanımı	3
2.1.2. Epidemiyoloji.....	3
2.1.3. Histopatoloji	3
2.1.4. Klinik ve Değerlendirme.....	4
2.1.5. Evreleme.....	4
2.1.6. Tedavi	8
2.1.6.1. Cerrahi Tedavi.....	8
2.1.6.2. Radyoterapi.....	8
2.1.6.3. Kemoterapi.....	8
2.1.6.4. Hedefe Yönelik Tedavi.....	8
2.1.6.5. Hormonoterapi	9
2.2. Tamoksifen	9
2.2.1. Endikasyonları	10
2.2.2. Farmakolojisi ve Biyokimyası.....	10
2.2.2.1. Emilim	10
2.2.2.2. Dağılım	10

2.2.2.3. Metabolizma.....	10
2.2.2.4. Eliminasyon.....	10
2.2.2.5. Klirens	11
2.2.2.6. Biyolojik Yarı Ömür	11
2.2.3. Etki Mekanizması	11
2.2.4. Klinik Kullanım.....	12
2.2.5. Yan Etkiler ve Yönetimi	12
2.2.6. Kontrendikasyonlar	13
2.2.7. Monitorizasyon.....	14
2.3. Borik Asit.....	14
2.3.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	14
2.3.2. Tıbbi Kullanımı	15
2.3.3. Farmakolojisi ve Biyokimyası.....	15
2.3.3.1. Emilim	15
2.3.3.2. Dağılım Hacmi	16
2.3.3.3. Metabolizması.....	16
2.3.3.4. Eliminasyon.....	16
2.3.3.5. Klirens	16
2.3.3.6. Biyolojik Yarı Ömür	16
2.3.4. Etki Mekanizması	17
2.3.5. Kullanım Alanları	17
2.3.6. Bor ve Türkiye.....	17
2.3.7. Borik Asit ve Kanser	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Araştırmanın Tipi.....	19
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	19
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	19
3.4. Araştırmanın Değişkenleri.....	19
3.5. Veri Toplama Araçları	19
3.5.1. Araştırmada Kullanılan Cihazlar.....	19
3.5.2. Hücre Dizileri	20
3.5.3. Hücre Kültürü	20
3.5.4. Kültürlerin Pasajlanması	20
3.5.5. Hücre Sayımı	21
3.5.6. Sitotoksite Tayini	21

3.5.6.1. Tamoksifen İndüksiyonu	21
3.5.6.2. Borik Asit İndüksiyonu.....	21
3.5.6.3. Tamoksifen ve Borik Asit Kombinasyon İndüksiyonu	21
3.5.6.4. MTT Analizi.....	22
3.5.6.5. Kombinasyon İndeks Analizi	22
3.5.6.6. İstatistiksel Analiz	22
4. BULGULAR	24
4.1 TMX'in MCF-7 Hücre Dizilerinde Hücre Canlılığına Olan Etkisi	24
4.2. Borik Asidin MCF-7 Hücre Dizilerinde Hücre Canlılığına Olan Etkisi.....	24
4.3. TMX ve Borik Asit Kombinasyonlarının MCF-7 Hücre Dizilerinde Hücre Canlılığına Olan Etkisi	25
4.4. TMX ve Borik Asit Kombinasyonlarının MCF-7 Hücre Dizilerinde Kombinasyon İndeks Değerleri	27
5. TARTIŞMA.....	28
6. SONUÇ	34
7. KAYNAKLAR.....	35

ÖZET

Giriş ve Amaç

Kanser global olarak temel sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Meme kanseri dünya da ve ülkemizde kadınlarda en sık saptanan kanserdir. Meme kanseri tedavisinde cerrahi tedavi, kemoterapi, radyoterapi, hormonoterapi ve hedefe yönelik tedavi kullanılmaktadır. Özellikle hormon reseptörü pozitif olan hastalarda tamoksifen de dahil olmak üzere endokrin tedaviler kullanılmaktadır. Tamoksifen meme kanserinde hem cerrahi sonrası adjuvan tedavide hem de metastatik hastalıkta kullanılmaktadır. Tamoksifen kullanan hastalarda endişe verici durumlardan birisi tamoksifene karşı direnç gelişmesidir ve bu durum tedavide başarısızlığa yol açmaktadır. Bu yüzden literatürde tamoksifenin yeni türevleri ve kombinasyon çalışmaları bulunmaktadır. Tamoksifen preparat olarak tamoksifen sitrat formunda bulunmaktadır. Sitrat antioksidan özelliği ve aktif maddenin stabilitesini korumasından dolayı farmasötik preparatlarda sık kullanılan bir yardımcı maddedir. Borik asitin sitrat gibi zayıf bir asit olmasının yanında sitotoksik etkileride bulunmaktadır. Bu çalışmada tamoksifen ve borik asit kombinasyonlarının hormon reseptörü pozitif MCF-7 hücre dizilerinde hücre canlılığına olan etkisi araştırılmaktadır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda östrojen reseptör pozitif hücre dizileri olan MCF-7 hücreleri kullanıldı. Tamoksifen ve borik asidin doz, zaman bağımlı ve kombine bir şekilde hücrelere uygulanması sonucu hücre canlılığında meydana gelen değişimler MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) analizi ile belirlendi. Tamoksifen ve borik asidin kombine uygulanmasıyla oluşan kombinasyon indeks değerleri Compusyn 1.0 programı kullanılarak hesaplandı. Elde edilen veriler GraphPad Prism 8.4 istatistik programı kullanılarak analiz edildi.

Bulgular

Tamoksifen ve borik asidin MCF-7 hücre dizilerinde hücre canlılığına olan etkisini belirlemek amacıyla doz ve zaman bağımlı olarak Tamoksifen ve borik asit uygulaması gerçekleştirildi. Tamoksifenin 24. Saatte 25 μ M, 48. Saatte 15 μ M ve 72. Saatte 5 μ M dan itibaren hücre canlılığını istatistiksel olarak azalttığı görüldü ($p < 0.05$). Tamoksifenin MCF-7 hücre dizilerindeki hücre proliferasyonu için IC50 değerleri 24, 48 ve 72. saatler için sırasıyla 27.98 μ M, 21.63 μ M ve 18.22 μ M olarak hesaplandı. Borik asitin 24. Ve 48. Saatlerde 5 mM, 72. Saatte ise 10mM dan itibaren hücre canlılığını istatistiksel olarak azalttığı görüldü

($p < 0.05$). Borik asidin MCF-7 hücre dizilerindeki hücre proliferasyonu için IC50 değerleri 24, 48 ve 72. saatler için sırasıyla 65.93 mM, 30.25mM, 25.40mM olarak hesaplandı. Tamoksifen ve borik asitin birlikte kombine olarak uygulanması sonucu elde edilen tüm kombinasyon indeks değerlerinin 0.9 ila 1.1 değerleri arasında olduğu belirlendi. Tamoksifen ve borik asit kombine uygulamasının MCF-7 hücre dizilerinde additif etki gösterdiği görüldü.

Sonuç

Yapmış olduğumuz çalışma ile tamoksifen ve borik asidin MCF-7 hücre dizilerinde doz ve zaman bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı, tamoksifen ve borik asit kombine uygulamasının ise hücre canlılığına additif olarak etki ettiği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Tamoksifen; Borik asit; Meme kanseri



ABSTRACT

Introduction

Cancer continues to be the main health problem globally. Breast cancer is the most common cancer detected in women in the world and in our country. Surgical treatment, chemotherapy, radiotherapy, hormonal therapy and targeted therapy are used in breast cancer treatment. Endocrine treatments, including tamoxifen, are used, especially in patients with hormone receptor positive. Tamoxifen is used in both postoperative adjuvant therapy and metastatic disease in breast cancer. One of the worrying situations in patients using tamoxifen is the development of resistance to tamoxifen, which leads to treatment failure. Therefore, there are new derivatives and combination studies of tamoxifen in the literature. Tamoxifen is available in the form of tamoxifen citrate as a preparation. Citrate is used as an excipient in pharmaceutical preparations due to its antioxidant properties. It maintains stability of active ingredients and is used as a preservative. Besides being a weak acid like citrate, boric acid has cytotoxic effects. In this study, the effect of tamoxifen and boric acid combinations on cellular survival in hormone receptor positive MCF-7 cell lines is investigated.

Materials and Methods

Estrogen receptor positive cell lines, MCF-7 cells, were used in our study. Changes in cell viability as a result of dose, time dependent and combined application of tamoxifen and boric acid to cells were determined by MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) analysis. Combination index values obtained by the combined application of tamoxifen and boric acid were calculated using the Compusyn 1.0 program. The data obtained were analyzed using the GraphPad Prism 8.4 statistical program.

Results

In order to determine the effect of tamoxifen and boric acid on cell viability in MCF-7 cell lines, Tamoxifen and boric acid were administered in a dose and time dependent manner. It was observed that tamoxifen statistically decreased cell viability starting from 25 μM at 24th hour, 15 μM at 48th hour and 5 μM at 72nd hour ($p < 0.05$). IC₅₀ values of tamoxifen for cell proliferation in MCF-7 cell lines were calculated as 27.98 μM , 21.63 μM and 18.22 μM for 24, 48 and 72 hours, respectively. It was observed that boric acid decreased the cell viability statistically from 5 mM at 24th and 48th hours and 10mM at 72nd hour ($p < 0.05$). IC₅₀ values of boric acid for cell proliferation in MCF-7 cell lines were calculated as 65.93 mM, 30.25mM, 25.40mM for 24, 48 and 72 hours, respectively. It was determined

that all combination index values obtained as a result of the combined application of tamoxifen and boric acid were between 0.9 and 1.1 values. It was observed that the combined application of tamoxifen and boric acid had an additive effect in MCF-7 cell lines.

Conclusion

In our study, it has been shown that tamoxifen and boric acid reduce cell viability in MCF-7 cell lines depending on dose and time, while the combined application of tamoxifen and boric acid has an additive effect on cell viability.

Keywords: Tamoxifen; Boric acid; Breast cancer

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1.	Meme kanserinde 8. TNM evrelemesi.....	7
Tablo 2.	Araştırmanın değişkenleri.....	19
Tablo 3.	Kullanılan demirbaş cihazlar	20
Tablo 4.	Borik asit ve Tamoksifen kombinasyonlarının MCF-7 hücre dizilerinde kombinasyon indeks analizi.....	27

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1. TMX'in MCF-7 hücre dizisi üzerinde doz ve zaman bağımlı olarak hücresel canlılığa olan etkisi ve zamana göre IC50 dozları. 24
- Şekil 2. Borik asitin MCF-7 hücre dizisi üzerinde doz ve zaman bağımlı olarak hücresel canlılığa olan etkisi ve zamana göre IC50 dozları 25
- Şekil 3. TMX ve Borik asitin MCF-7 hücre dizisi üzerinde doz ve zaman bağımlı olarak hücresel canlılığa olan etkisi..... 25
- Şekil 4ab. TMX ve Borik asit kombinasyonlarının MCF-7 hücre dizileri üzerinde hücresel canlılığa olan etkisi..... 26

KISALTMALAR LİSTESİ

UKAA	Uluslararası kanser araştırma ajansı
KT	Kemoterapi
RT	Radyoterapi
HT	Hormonoterapi
SERM	Selektif östrojen reseptör modülatör
SERD	Selektif östrojen reseptör down-regülatör
TGF-B	Transforming Growth faktör-B
IGF-1	İnsulin like growth factor 1
PKC	Protein kinaz C
TMX	Tamoksifen
BRCA-1	Breast cancer gene 1
BRCA-2	Breast cancer gene 2
LCIS	İn situ lobüler karsinom
DCIS	İn situ duktal karsinom
İDC	İnvaziv duktal karsinom
İLC	İnvaziv lobüler karsinom
USG	Ultrasonografi
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
ER	Östrojen reseptör
PR	Progesteron reseptör
HR	Hormon reseptör
HER-2	Human epidermal growth faktör reseptör-2
İHC	İmmünohistokimya
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
LHRH	lutinizirir hormon-releasirir hormon
FDA	Food and drug administration
Aİ	Aromataz inhibitör
ASCO	American society of clinical oncology
İNR	Uluslararası normalize oran
PT	Protrombin zamanı
PBS	Fosfat tamponlu salin
FBS	Fetal sığır serumu
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit

VTE	Venöz tromboemboli
DMSO	Dimetil sülfoksit
OD	Optik dansite
Kİ	Kombinasyon indeks
MTT	(3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)
IC50	Hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyon
nG	Nanogram
µG	Mikrogram
mG	Miligram
GR	Gram
KG	Kilogram
µL	Mikrolitre
ML	Mililitre
LT	Litre
µM	Mikromolar
mM	Milimolar
CO ₂	Karbondioksit
°C	Santigrat derece

1. GİRİŞ VE TEZİN AMACI

Kanser, dünya genelinde birçok ülkede temel sağlık sorunudur. Amerika'da ölümlerin en sık ikinci nedeni kanserdir (1). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (UKAA) istatistiklerine göre, dünya genelinde 2018 yılında yaklaşık olarak 18.1 milyon yeni kanser vakası gözlenirken, 9.6 milyon kansere bağlı ölüm gözlenmiştir (non-melanom cilt kanserleri hariç tutulmuştur) (2). Global olarak meme kanseri en sık tanı konulan kanserlerden biridir. Bununla birlikte, meme kanseri insidansı, 27 / 100.0002 (Orta Doğu Asya ve Afrika) ile 85-94 / 100.0002 (Avustralya, Kuzey Amerika ve Batı Avrupa) arasında değişmektedir (3). Ülkemizde de meme kanseri kadınlar arasında görülen kanserler içinde 45.6/100.000 oranı ile ilk sırada yer almaktadır (4).

Günümüzde meme kanserinin tedavisinde; cerrahi tedavi, kemoterapi (KT), radyoterapi (RT), hormon tedavisi (HT) ve hedefe yönelik tedavi olmak üzere 5 temel yöntem kullanılmaktadır.

HT'de kullanılan Tamoksifen (TMX); selektif östrojen reseptör modülatörüdür (SERM). TMX östrojen reseptörünün (ER) yarışmalı inhibitörüdür. Böylece östrojenin ER'ne bağlanmasını inhibe ederek östrojene hücre sel anlamda cevap verilmesini de inhibe eder. TMX hücre büyümesini inhibe eden Transforming Growth Factor Beta (TGF-B) üretimini artırırken meme kanser hücrelerinin büyümesini uyaran İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1'in (IGF-1) üretimini ise azaltır. TMX ayrıca Protein Kinaz C (PKC) ekspresyonunu azaltarak sinyal iletimini inhibe eder böylece özellikle malign glioma ve PKC aşırı üreten diğer tümörlerde antiproliferatif etki gösterir (5).

Bor esansiyel bir element olup oksijene yüksek afinite duyar ve doğada borik asit ve boraks olarak bol miktarda bulunur (6, 7). Borik asit antifungal, antiseptik, antiviral özellikler gösteren bir zayıf asittir, tam etki mekanizması bilinmemekle beraber neredeyse tüm hücrelere sitotoksiktir. Mantar enfeksiyonlarında ve uçukların tedavisinde kullanılmaktadır (8). Hücre kültürü ve hayvan çalışmaları bor bileşiklerinin antiproliferatif etkisinin olduğunu göstermiştir (9, 10). Bu nedenle bor bileşikleri çok yönlü etkileri nedeniyle kanser ve diğer hastalıklar için araştırmaların odak noktası olmaya devam etmektedir.

Hipotez: Borik asitin TMX ile aynı anda uygulanması HR (+) MCF-7 meme kanseri hücre dizisi üzerinde sinerjistik etki göstermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Kanser, dünya genelinde birçok ülkede temel sağlık sorunudur. Amerika'da ölümlerinde en sık ikinci nedeni kanserdir (1). UKAA'nın istatistiklerine göre, dünya genelinde 2018 yılında yaklaşık olarak 18.1 milyon yeni kanser vakası gözlenirken, 9.6 milyon kansere bağlı ölüm gözlenmiştir (non-melanom cilt kanserleri hariç tutulmuştur) (2). Global olarak meme kanseri en sık tanı konulan kanserlerden biridir. Bununla birlikte, meme kanseri insidansı, 27 / 100.0002 (Orta Doğu Asya ve Afrika) ile 85-94 / 100.0002 (Avustralya, Kuzey Amerika ve Batı Avrupa) arasında değişmektedir (3). Ülkemizde de meme kanseri kadınlar arasında görülen kanserler içinde 45.6/100.000 oranı ile ilk sırada yer almaktadır (4).

2.1.1. Etiyoloji

Meme kanseri insidansının artmasıyla beraber ilişkili faktörlerin belirlenmesi genel sağlık taraması açısından önemlidir.

Meme kanseriyle ilişkili faktörler 7 farklı geniş kategoride incelenebilir.

2.1.1.1. Yaş

Yaşa göre ayarlanmış meme kanseri insidansı, kadın nüfusunun ilerleyen yaşıyla artmaya devam etmektedir. Bu yüzden 50 yaşından itibaren kadınlarda mamografi taraması önerilmektedir.

2.1.1.2. Cinsiyet

Meme kanseri kadınlarda daha sık gözlenmektedir. Global olarak kadınlarda en sık gözlenen kanserdir.

2.1.1.3. Kişisel Meme Kanseri Öyküsü

Bir memede kanser öyküsü, karşı memede ikinci bir kanser olasılığını artırır. Özellikle BRCA1/BRCA2 mutasyonu taşıyan bireylerde bu risk daha fazladır.

2.1.1.4. Histolojik Risk Faktörleri

Meme biyopsisi ile teşhis edilen histolojik anormallikler, meme kanseri risk faktörlerinin önemli bir kısmını oluşturur. Bu anormallikler; atipi ve proliferatif değişiklikleri içerir.

2.1.1.5. Ailede Meme Kanseri Öyküsü ve Genetik Risk Faktörleri

Meme kanseri olan hastaların birinci derece akrabalarında, hastalığa yakalanma riski 2 kat ila 3 kat fazladır. Tüm meme kanseri vakalarının yüzde 5 ila yüzde 10'u genetik kökenlidir, ancak 30 yaşın altındaki kadınlarda vakaların % 25'ini oluşturabilirler. BRCA1 ve BRCA2, meme kanserine yatkınlığın artmasından sorumlu en önemli 2 genidir.

2.1.1.6. Reprodüktif Risk Faktörleri

Yaşam boyu östrojen maruziyetini artıran faktörler meme kanseri gelişme riskini arttırmaktadır. Bunlara 12 yaşından önce menarş başlangıcı, 30 yaşından sonra ilk canlı doğum, hiç doğum yapmama ve 55 yaşından sonra menopoz dahildir.

2.1.1.7. Ekzojen Hormon Kullanımı

Terapötik veya destek tedavisi olarak östrojen ve/veya progesteron çeşitli durumlar için kullanılır; en yaygın iki durum, menopoz öncesi kadınlarda kontrasepsiyon ve menopoz sonrası kadınlarda hormon replasman tedavisidir (11, 12).

2.1.2. Epidemiyoloji

Meme kanseri, düşük ve orta gelirli ülkeler de dahil olmak üzere dünya çapında en sık teşhis edilen ikinci kanserdir (13). İnsidans oranları en yüksek Kuzey Amerika, Avustralya, Yeni Zelanda ve Kuzey Avrupa'da iken en düşük Asya ve Sahra altı Afrika'da gözlenmektedir (14). Amerika Birleşik Devletleri'nde, meme kanseri her yıl 260.000'den fazla vakaya neden olurken 40.000'den fazla ölümden sorumludur (15). Türkiye'de ise meme kanseri kadınlar arasında görülen kanserler içinde 45.6/100.000 oranı ile ilk sırada yer almaktadır.

2.1.3. Histopatoloji

Meme kanseri, bazal membran ile olan ilişkisine göre invaziv veya non-invaziv olarak sınıflandırılır. Memenin noninvaziv neoplazmları da kendi içinde 2 gruba ayrılır: lobüler karsinoma in situ (LCIS) ve duktal karsinoma in situ (DCIS).DCIS morfolojik olarak

LCIS'dan daha heterojendir ve patolojlar kabaca dört geniş DCIS türünü tanımlar: papiller, kribriform, solid ve komedo. Papiller ve kribriform tipler daha düşük dereceli lezyonlar iken solid ve komedo tipler daha yüksek dereceli lezyonlardır. Patolojlar invaziv kanserleri ductal ve lobüler olmak üzere iki sınıfa ayırırlar.

İnvaziv duktal kanser(IDC) meme kanserinin en yaygın şeklidir, tüm meme kanserlerinin %50- %70'ini oluşturur. İnvaziv lobuler kanser(ILC) ise yaklaşık olarak tüm meme kanserlerinin %10'unu oluşturur (16-18).

2.1.4. Klinik ve Değerlendirme

Meme kanseri olan hastaların değerlendirilmesi, klinik değerlendirme, görüntüleme yöntemleri ve doku biyopsisi kullanılarak üçlü bir değerlendirmeye ihtiyaç duyar. Mamografi, meme kanseri teşhisinde en sık kullanılan yöntemdir. Asemptomatik vakaların çoğu, mamografi taraması sırasında teşhis edilir. Mamografi kullanılmayan genç hastalarda meme ultrasonografisi (USG) kullanılabilir. Manyetik rezonans görüntüleme (MRG), meme dahil yumuşak dokulardaki anormallikleri tanımlamak için iyi bir duyarlılığa sahiptir. Özellikle multifokal, bilateral kitlelerin değerlendirilmesinde ve neoadjuvan kemoterapi yanıtının değerlendirilmesinde endikedir.

Doku biyopsisi, meme kanseri hastasının değerlendirilmesinde önemli bir adımdır. Biyopsi yöntemi olarak ince iğne aspirasyon biyopsisi, kalın iğne biyopsisi, insizyonel biyopsi ya da eksizyonel biyopsi kullanılabilir (19-21).

Yeni teşhis edilmiş meme kanserleri, östrojen reseptör (ER) ve progesteron reseptör (PR) ekspresyonu ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (HER2) aşırı ekspresyonu için test edilmelidir.

2.1.5. Evreleme

Evreleme klinik ve patolojik evreleme olarak 2' ye ayrılabilir. Klinik evreleme de fizik muayene ve görüntüleme yöntemleri kullanılır. Patolojik evreleme ise cerrahi sonrasında primer tümör ve bölgesel lenf nodlarının durumuna göre yapılır.

Evreleme için en sık TNM sınıflaması kullanılmaktadır.

T (PRİMER TÜMÖR BOYUTU)

-TİS: Karsinoma in situ,tümör içermeyen paget

-T1: 2 cm'den küçük tümörler

T1a: 0,1 - 0,5 cm

T1b: 0,5 - 1,0 cm

T1c: 1,0 - 2,0 cm

-T2: 2-5 cm arasında

-T3: 5 cm'den büyük tümörler

T4:

T4a: Göğüs duvarı tutulumu

T4b: Cilt tutulumu

T4c: Hem 4a hem de 4b

T4d: İnflamatuvar kanserler

KLİNİK N (KLİNİK LENF NODU METASTAZI)

N0: Lenf nodu metastazı yok

N1: Hareketli ipsilateral, level I-II lenf nodu (nodları)

N2: Fikse ya da konglomere level I-II lenf nodu (nodları) veya internal mammarian lenf nodları

N2a: Fikse ya da konglomere level I-II lenf nodu (nodları)

N2b: İnternal mammarian lenf nodları (aksiller metastaz yok)

N3: İpsilateral infraklaviküler lenf nodu (level 3) veya internal mammarian lenf nodu + level I-II aksiller lenf nodu veya, supraklaviküler lenf nodu tutulumu.

N3a: İpsilateral infraklaviküler lenf nodu (level 3) metastazı

N3b: İnternal mammarian lenf nodu + level I-II aksiller lenf nodu metastazı

N3c: Supraklaviküler lenf nodu tutulumu

Patolojik N (Patolojik Lenf Nodu Metastazı)

pNX: Primer tümör değerlendirilemiyor (örneğin daha önce alınmış)

pN0: Regional lenf nodu metastazı yok

pN0 (i-): Histolojik lenf nodu tutulumu yok, negatif İmmünohistokimya(IHC)

pN0 (i+): Histolojik lenf nodu tutulumu yok, pozitif İHC

pN0 (mol-): Histolojik lenf nodu tutulumu yok, negatif Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

pN0 (mol+): Histolojik lenf nodu tutulumu yok, pozitif RT-PCR

pN1: 1-3 aksiller lenf nodu tutulumu veya internal mammarian lenf nodunda mikroskopik tutulum. (klinik olarak benign görünüşlü).

pN1mi: Mikrometastaz (0,2-2 mm)

pN1a: 1-3 aksiller lenf noduna metastaz

pN1b: İnternal mammarian lenf nodunda mikroskopik metastaz (klinik olarak benign görünüşlü).

pN1c: 1-3 aksiller lenf nodu metastazı + İnternal mammarian lenf nodunda mikroskopik metastaz

pN2: 4-9 aksiller lenf nodu tutulumu veya internal mammarian lenf nodunda klinik tutulum.

pN2a: 4-9 aksiller lenf nodu tutulumu

pN2b: internal mammarian lenf nodunda klinik tutulum.

pN3: 10 ya da daha fazla aksiller lenf nodu tutulumu veya infraklaviküler lenf nodu (level III), veya klinik internal mammarian lenf nodu tutulumu + aksiller lenf nodu tutulumu (level I-II), veya 3'den fazla aksilla lenf nodu+internal mammarian arter mikro metastazı veya ipsilateral supraklaviküler lenf nodları

pN3a: 10 ya da daha fazla aksiller lenf nodu tutulumu veya infraklaviküler lenf nodu (level III)

pN3b: klinik internal mammarian lenf nodu tutulumu + aksiller lenf nodu tutulumu (level I-II), veya 3'den fazla aksiler lenf nodu+internal mammarian arter mikro metastazı

pN3c: İpsilateral supraklaviküler lenf nodları

M (UZAK METASTAZ)

MX: Uzak metastaz araştırılmamış

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var (22).

Tablo 1. Meme kanserinde 8. TNM evrelemesi

MEME KANSERİNDE TNM EVRELEMESİ			
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Evre IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Evre IIIC	Her T	N3	M0
Evre IV	Her T	Her N	M0

2.1.6. Tedavi

Tedavide günümüzde cerrahi tedavi, RT, KT, HT ve hedefe yönelik tedavi olmak üzere 5 farklı tedavi modalitesi uygulanmaktadır.

2.1.6.1. Cerrahi Tedavi

Cerrahi tedavi meme kanserinin tedavisinde çok önemli bir yere sahiptir. Hastalığın lokal kontrolünü sağlamanın temel yoludur. Eskiden radikal mastektomi kullanılırken günümüzde modifiye radikal mastektomi ,meme koruyucu cerrahi tercih edilmektedir.

2.1.6.2. Radyoterapi

RT lokal hastalık kontrolünde önemli bir yere sahiptir. Meme koruyucu cerrahiye takiben RT kullanıldığında 10 yıl içinde kanser rekürrensi %50 azalırken, kansere bağlı ölüm ise 15 yılda %20 oranında azalmaktadır. RT 70 yaşından büyük hastalarda küçük, lenf nodu negatif, hormon reseptör (HR) pozitif olan hastalarda gerekli görülmemektedir çünkü en az 5 yıl HT alan hastalarda sağkalıma etkisi gösterilememiştir. RT daha ziyade 5 cm'den büyük tümörlerde, lenf nodu pozitif, cilt ya da göğüs duvarına invaze kanserlerde yararlıdır. Metastatik hastalarda özellikle santral sinir sistemi ve kemik metastazlarında palyatif tedavinin parçası olarak kullanılabilir (23, 24).

2.1.6.3. Kemoterapi

KT, HT ve hedefe yönelik tedavi meme kanseri tedavisinde kullanılan sistemik tedavilerdir. 6 aylık bir KT sürecinde siklofosamid, metotreksat ve 5-fluorourasil gibi birinci nesil bir kemoterapi rejimi kullanılması 10 ila 15 yıllık bir dönemde nüks riskini yüzde 25 azaltır. Antrasiklinler (doksorubisin veya epirubisin) ve taksanlar meme kanserinde kullanılan yeni kemoterapi ajanlarıdır. Adjuvan ve neoadjuvan KT için 3 ila 6 aylık süre ile kullanılırlar.

2.1.6.4. Hedefe Yönelik Tedavi

Hedefe yönelik tedavi HER2 aşırı üreten HER2(+) kanserlerde kullanılmaktadır bu da yaklaşık olarak tüm meme kanserlerinin %17'sidir. Bu kanserlerde kullanılan Transtuzumab doğrudan HER2'yi hedefleyen monoklonal antikordur. Erken evre meme kanserinde tek başına KT ve KT artı Transtuzumab karşılaştıran bir çalışmada nüks ve ölüm oranı sadece KT ile yüzde 33 azalırken KT artı Transtuzumab ile yüzde 55 oranında azalma göstermektedir (25, 26).

2.1.6.5. Hormonoterapi

HR (+) olan hastalar HT için uygundur. HT olarak üretilen östrojenin azaltılması bir seçenek iken ER'yi hedefleyen tedaviler ikinci bir seçenektir. Östrojen üretiminin azaltılması için LHRH agonist ve antagonistleriyle beraber Aromataz İnhibitörleri (AI) kullanılır.

ER hedefleyen ilaçlar ise TMX gibi SERM'ler ve fulvestrant gibi östrojen reseptör down -regülatörleri (SERDs). Bu tedavilerden TMX'in adjuvan tedavide ve metastatik hastalıkta kullanımına bakacak olursak; hastalar adjuvan olarak TMX ile 5-10 yıl süre ile tedavi edilirler. 5 yıllık adjuvan TMX tedavisi ile nüks ilk 4 yılda %50 ve takip eden 5.-9. yıllar arasında %30 azalmaktadır. Ayrıca ilk 15 yılda ki meme kanseri mortalitesini %30 azaltmaktadır (27). Adjuvan TMX'in 5 yıllık ve 10 yıllık kullanımlarının karşılaştırılmasında 10 yıl TMX kullanımı ile nüks ve mortalitede daha fazla azalma sağlanmıştır (28).

TMX adjuvan tedavi dışında metastatik HR(+) kanserlerde de kullanılmaktadır. HR(+) kanserlerin yaklaşık %50'sinde ya en baştan ya da zaman içerisinde HT'ye direnç gözlenmektedir (29).

TMX'in HR(+) metastatik kanserlerde kullanımını hastanın menopoiz durumuyla ilişkilidir; premenopozal hastalarda tedavi seçenekleri arasında ovaryan ablasyonun HT ile kombinasyonu bir seçenek olabilirken tek başına TMX kullanımı da bir seçenek olarak düşünülebilir (30). Burada tedavi hasta özelinde düşünülmelidir.

Postmenopozal HR(+) metastatik hastalarda ise basamaklı tedavi yaklaşımı benimsenmiştir, ilk basamakta TMX'den ziyade AI'ler kullanılırken ilerleyen basamaklarda TMX bir alternatif olabilir (31).

HT olarak ister TMX kullanılsın ister diğer endokrin tedaviler kullanılsın mevcut ajanlara belli oranda direnç gelişmektedir. Bu ajanlardan biri olan TMX'e de belli oranlarda direnç gelişmektedir. Bu direnç sonrasında TMX ile tedavide başarısızlık gözlenmesinden dolayı TMX'in yeni türevlerine ya da kombinasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2. Tamoksifen

TMX, bazı dokularda östrojenik etki gösteren bazı dokularda ise antiöstrojenik etki gösteren SERM grubundan bir antineoplastik ajandır. Tamoksifen peraparat olarak tamoksifen sitrat formunda bulunmaktadır. Sitrat antioksidan özelliği ve aktif maddenin

stabilitesini korumasından dolayı farmasötik preparatlarda sık kullanılan bir yardımcı maddedir (32).

2.2.1. Endikasyonları

TMX, genellikle ER pozitif meme kanserinde kullanılmakla beraber birçok endikasyon dışı kullanımı da mevcuttur.

Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanan endikasyonları:

Hem kadınlarda hem de erkeklerde meme kanseri tedavisinde (33)

DCIS'lı hastalarda cerrahi ve RT'yi takiben invaziv kanser gelişme riskini azaltmak için (34)

Yüksek risk altındaki bazı hastalarda meme kanseri riskini azaltmak için (5 yıllık risk = Gail Modeli tarafından hesaplanan % 1.67) (35).

2.2.2. Farmakolojisi ve Biyokimyası

2.2.2.1. Emilim

Oral uygulamayı takiben, TMX hızla absorbe olur ve yaklaşık 5 saat sonra maksimum serum konsantrasyonuna ulaşır. 20 miligram (mg) oral uygulama sonrasında yaklaşık 5 saat sonra 40 nanogram (ng)/mililitre(ml) maksimum serum konsantrasyonuna ulaşır.

2.2.2.2. Dağılım

TMX'in dağılım hacmi yaklaşık 50-60 litre(L) /kilogram(kg)'dır (36).

2.2.2.3. Metabolizma

TMX, oral uygulamadan sonra büyük ölçüde metabolize edilir. N-desmetil tamoksifen, plazmada bulunan başlıca metabolittir. TMX, sitokrom P450 CYP3A,CYP2C9 ve CYP2D6'nın bir substratıdır ve bir P-glikoprotein pompa inhibitörüdür (37). Bu nedenle sitokrom yolağı üzerinden metabolize olan diğer ilaçlarla etkileşimine dikkat etmek gerekir.

2.2.2.4. Eliminasyon

TMX esas olarak dışkı ile atılır. İdrarda ihmal edilebilir düzeyde bulunur (36).

2.2.2.5. Klirens

Altı postmenopozal kadın üzerinde yapılan bir çalışmada TMX klirensi 189 mL / dakika idi. TMX, oral uygulamadan sonra yavaş emiliyor gibi görünmektedir ve en yüksek serum konsantrasyonları genellikle tek bir dozdan yaklaşık 3-6 saat sonra ortaya çıkmaktadır. İnsanlarda emilimin derecesi yeterince belirlenmemiştir, ancak hayvan çalışmalarından elde edilen sınırlı veriler ilacın iyi emildiğini göstermektedir. Hayvan çalışmalarından elde edilen veriler ayrıca TMX ve / veya metabolitlerinin yoğun enterohepatik dolaşıma girdiğini göstermektedir.

Oral uygulamayı takiben, maksimum serum TMX konsantrasyonları, tek bir 10 mg'lık dozdan sonra yaklaşık 17 ng / mL, tek bir 20 mg'lık dozdan sonra yaklaşık 40 ng / mL ve tek bir 40 mg'lık dozdan sonra 65-70 ng / mL'dir; ve bu konsantrasyonlar kişiler arasında farklılık gösterebilmektedir.

TMX kararlı durum serum konsantrasyonuna genellikle 3-4 haftalık tekrarlayan doz uygulamasından sonra ulaşırken, N-desmetiltamoksifenin kararlı durum serum konsantrasyonuna ulaşması ise 3-8 hafta arasında tekrarlayan doz gerektirmektedir (36, 37).

2.2.2.6. Biyolojik Yarı Ömür

TMX'in terminal eliminasyon yarılanma ömrü 5 ila 7 gün, dolaşımdaki birincil metabolit olan N-desmetiltamoksifenin yarı ömrü yaklaşık 14 gündür (36).

2.2.3. Etki Mekanizması

TMX, bazı dokularda östrojenik etki gösteren bazı dokularda ise antiöstrojenik etki gösteren SERM grubundan bir antineoplastik ajandır. Meme dokusunda ER için östrojen ile yarışarak antiöstrojenik ve antitümör etki gösterir.

Kemikte ise ER'leri bloke etmek yerine uyarır, östrojenik agonist etki gösterir ve menopoz sonrası kadınlarda osteoporozu önleyebilir (38).

TMX ve türevleri belirli klorür kanallarını yüksek afinite ile bloke etmektedir. Bu blokaj, TMX'in ER ile etkileşiminden bağımsız görünmektedir ve bu nedenle alternatif bir hücrel hedefi yansıtmaktadır. Göz merceğindeki klorür kanallarının normal mercek hidrasyonunu ve geçirgenliğini sürdürmek için gerekli olduğu gösterilmiştir. TMX'nin bu etkisi katarakt yan etkisini açıklayabilmektedir (37).

2.2.4. Klinik Kullanım

TMX'in tablet (10mg-20mg) ve oral solüsyon (10mg/5ml) preparatları bulunmaktadır. Amerikan Klinik Onkoloji Derneği (ASCO) HR+ meme kanserlerinde adjuvan tedavi için 20 mg'lık doz önermektedir. HT'nin süresi hastanın menopoz durumuna bağlıdır ve 5 ila 10 yıl kullanılabilir (39). Metastatik meme kanserinin tedavisi için günde 20-40 mg önerilir, ancak günlük 20 mg'ın üzerindeki dozlarda klinik fayda gösterilememiştir (40). Bazı endikasyon dışı araştırmalarda 10 mg'lık doz kullanılmıştır.

2.2.5. Yan Etkiler ve Yönetimi

Sıcak basması, TMX'in en yaygın ve rahatsız edici yan etkilerinden biridir; merkezi sinir sisteminde termoregülasyon işlev bozukluğuna neden olan antiöstrojenik etkiye bağlı olduğu düşünülmektedir (41). TMX, kullanan kadınların %80'i sıcak basmasından şikayet ederken %30'u bunun şiddetli olduğunu belirtmektedir (42). TMX'in sıcak basmasını indüklemesiyle alakalı birkaç risk faktörü belirlenmiştir.

Premenopozal kadınlarda sıcak basmaları perimenopozal-postmenopozal kadınlara oranla daha fazla gözlenmektedir (42-45).

TMX i metabolize eden enzimlerdeki polimorfizmler, TMX'in en aktif metabolitine (endoksifen) dönüşümünü azaltır ve veriler çelişkili olsa da TMX'e bağlı sıcak basması olasılığını etkileyebilir (46-47).

Spesifik ER genotiplerinin kalıtımı, TMX kaynaklı sıcak basmalarının riskini ve ciddiyetini etkileyebilir (43).

TMX kullanımı, artmış venöz tromboemboli (VTE) riski ile ilişkilidir ve KT'ye TMX eklendiğinde önemli bir ek prokoagulan etki yaratır. (48-50) TMX alan yaşlı kadınlarda VTE riski iki ila üç kat artar. TMX tedavisi 5 yıldan 10 yıla çıkarıldığında daha fazla hasta pulmoner emboli yaşamaktadır (51). TMX kaynaklı VTE için risk faktörleri; geçirilmiş operasyonlar, kırıklar ve immobilizasyonu içerir. Bu veriler, TMX alan kadınların, beklenen ameliyat veya seyahat nedeniyle uzun süreli hareketsiz kalmadan birkaç gün önce TMX kullanmayı bırakması gerektiğini göstermektedir. Ek olarak, heterozigot Faktör V Leiden mutasyonu olan ve TMX alan hastaların yaklaşık beş kat daha fazla tromboembolizm riskine sahip olduğuna dair veriler mevcuttur (52).

TMX, hem endometrial kanser hem de endometrial sarkom riskinde artış ile ilişkilendirilmiştir. P-1 çalışmasının güncellenmiş bir raporunda, 13.000'den fazla kadına beş yıl boyunca TMX veya plasebo verilmiş ve yedi yıl takip edilmiş, TMX grubunda 53 uterin kanser vakasına karşılık plasebo grubunda 17 uterin kanser vakası gözlenmiştir. Ek olarak toplamda 4 uterin sarkom gözlenmiş olup bunların 3 tanesi TMX alan grupta bulunmaktadır. Gözlenen toplam 70 uterin kanserin 67'si lokalize hastalık aşamasında saptanmıştır. En sık başvuru sebebi ise vajinal kanama olarak bulunmuştur (53).

TMX'in kolesterol seviyelerindeki olumlu etkilerine rağmen kullanan hastaların yaklaşık üçte birinde yağlı karaciğer hastalığı gözlenmektedir. Bu yüksek orana rağmen ciddi steatohepatit nadirdir (54).

Diğer yaygın yan etkiler arasında periferik ödem, hipertansiyon, ruh hali değişiklikleri, ağrı, depresyon, cilt değişiklikleri ve deri döküntüleri, bulantı ve kusma, halsizlik, artrit, artralji, lenfödem ve farenjit bulunur.

Daha az görülen yan etkiler arasında uykusuzluk, baş dönmesi, baş ağrısı, kilo alımı, karın ağrısı, ishal, hazımsızlık, idrar yolu enfeksiyonları, trombositopeni, sırt ağrısı, alopesi ve katarakt sayılabilir (55).

TMX ayrıca artmış kemik ağrısı ve tümör ağrısına yol açabilen lokal bir hastalık alevlenmesine neden olabilir. Bu, tümörün ilaca iyi yanıtı ile ilişkilendirilebilir ve genellikle hızlı bir şekilde düzelir.

Kemik metastazı olan hastalarda hiperkalsemi oluşabilir. Hiperkalsemi yüksek değerlere ulaşır ve yönetilemez hale gelirse, TMX tedavisi kesilmelidir (56).

2.2.6. Kontrendikasyonlar

TMX in kendisine veya formülasyonundaki herhangi bir bileşene alerjisi olduğu bilinen hastalarda kullanılmamalıdır.

Meme kanser riski yüksek olan ya da DCIS lı hastalarda bilinen derin venöz tromboz, pulmoner emboli hikayesi varsa bu hastalarda meme kanser riskini azaltmak için TMX kullanımından kaçınılmalıdır.

Meme kanseri tanısı olan hastalarda faydalar zarardan ağır basar ama yine de tromboemboli hikayesi varsa dikkatli kullanılmalıdır.

TMX alan hastalarda ilaç etkileşimi açısından da dikkatli olunması gerekir (57).

2.2.7. Monitorizasyon

TMX kullanan tüm hastaların, trombosit sayısı, serum kalsiyum düzeyi, karaciğer fonksiyon testleri ve tam kan sayımı dahil olmak üzere rutin laboratuvar testleri takip edilmelidir.

Kadın hastalar vajinal kanama açısından kendilerini takip etmelidirler, ayrıca meme muayenesi ve jinekolojik muayene tanı anında ve daha sonra belli aralıklarla tekrarlanmalıdır.

Hastalar kendilerini venöz tromboemboli ve pulmoner emboli açısından izlemelidir.

Takip parametreleri hastadan hastaya değişmektedir.

Önceden hiperlipidemisi olan hastalarda trigliseridler ve kolesterol değerleri izlenmelidir (58).

K vitamini antagonisti alan hastalarda uluslararası düzeltme oranı (INR) ve Protrombin zamanı (PT) yakından izlenmelidir (59).

Reprodüktif dönemdeki kadın hastalarda tedaviden önce gebelik testi yapılmalıdır ve tedavi sırasında güvenilir doğum kontrol yöntemleri kullanılmalıdır (60).

Görme problemleri veya katarakt meydana gelirse hastalar oftalmik muayene yaptırmalıdır (61).

2.3. Borik Asit

Borik asit antifungal, antiseptik, antiviral özellikler gösteren bir zayıf asittir, tam etki mekanizması bilinmemekle beraber neredeyse tüm hücrelere sitotoksiktir. Mantar enfeksiyonlarında ve uçukların tedavisinde kullanılmaktadır (8).

2.3.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Borik asit, kokusuz beyaz bir katıdır. Erime noktası 171 santigrat derecedir.(°C) Renksiz, kokusuz, şeffaf kristal halde bulunmaktadır.

Sudaki çözünürlüğü; 0 °C'de %2,52; 10 °C'de %3,49; 20 °C'de %4,72; 30 °C'de %6,23; 40 °C'de %8,08; 50 °C'de %10,27; 60 °C'de %12,97; 70 °C'de %15,75; 80 °C'de %19,10; 90°C'de %23,27; 100 °C'de %27,53.

Borik asit 100 °C'nin üzerindeki ısılarda bozularak borik anhidrit ve su oluşturur (62).

2.3.2. Tıbbi Kullanımı

Rektal supozituar şekilde hemoroid tedavisinde kullanılmaktadır. Borik asit sulu çözeltileri tahriş olmuş gözlerin irrigasyonunda ve temizlenmesinde kullanılmaktadır. Borik asit, boratlar ve perboratlar göz yıkama, ağız gargaraları, yanık sargıları ve pişik tozlarında zayıf antiseptik veya bakteriyostatik olarak kullanılmıştır. Antifungal ve antibakteriyel olarak kullanımı mevcuttur (62).

Vulvovajinal Candida Albicans tedavisinde 600 mg borik asit içeren intravajinal jelatin kapsül ile 100.000 ünite nistatin içeren benzer kapsüllerin kullanıldığı çift körlü bir çalışmada; borik asit için kür oranları, tedaviden 7 ila 10 gün sonra %92 ve 30. Günde %72 iken, nistatin ile kür oranları, 7 ila 10 günde %64 ve 30. Günde %50 idi. Belirti ve semptomların iyileşme hızı iki ilaç için benzer bulunmuştur. Herhangi bir istenmeyen yan etki gözlenmemiştir ve servikal sitolojik özellikler etkilenmemiştir (63).

Borik asidin rektal fitillerde veya vajinal deodorantlarda kronik kullanımı intoksikasyon riski taşır (64). Toz ve merhemlerde kullanılan boraks ve borik asit de ciddi zehirlenme ve ölüm riski taşımaktadır (65).

İnsanlarda ölümcül dozun bebekler için 2-3 gr, çocuklarda 5-6 gr ve yetişkinler için 15-20 gr olduğu düşünülmektedir (66).

2.3.3. Farmakolojisi ve Biyokimyası

Borik asit zayıf bakteriyostatik ve antifungal aktivite gösterir, ancak uzun süre ve yüksek dozda kullanıldığında antifungal aktivitesi artar. Borik asidin tam etki mekanizması bilinmemektedir; genellikle tüm hücreler için sitotoksiktir. Mantar enfeksiyonları ve uçukların tedavisinde kullanılır. Farmakolojik sınıflandırma da insektisitler içinde yer almaktadır (62).

2.3.3.1. Emilim

Borik asit gastrointestinal sistemden, açık yaralardan ve seröz boşluklardan iyi emilir ancak sağlam ciltte sınırlı emilim gösterir. Farelerde intraperitoneal enjeksiyonu takiben, beyinde maksimum konsantrasyona yaklaşık 1.0-1.5 saatte ulaşılırken, diğer dokularda yaklaşık 0.5 saatte ulaşılmıştır (62).

2.3.3.2. Dağılım Hacmi

İnsanlarda dağılım hacmi 0.17 ila 0.5 L / kg arasında değişir. Büyük miktarlarda borik asit uygulamasından sonra borik asit çoğunlukla beyin, karaciğer ve böbreklerde dağılır. Bazı ölümcül vakalarda pankreasta inklüzyon cisimcikleri gösterilmiştir (62).

2.3.3.3. Metabolizması

Bilinen bir metabolik yolağı bulunmamaktadır. Biyolojik sistemler tarafından inorganik boratların metabolizması, bor-oksijen bağıını kırmak için gereken aşırı enerji nedeniyle mümkün değildir. Düşük konsantrasyonlarda inorganik boratlar, emilimden önce mukozal yüzeyleri örten sulu tabakada fizyolojik pH'ta borik aside dönüşür. Bu, uygulanan borat dozunun %90'ından fazlasının borik asit olarak atıldığı insan ve hayvan çalışmalarındaki kanıtlarla desteklenmektedir.

Hem in vitro hem de in vivo sistemlerde borik asidin cis-hidroksil gruplarına afinitesi olduğuna dair kanıtlar vardır ve bu, borik asidin biyolojik etkilerini açıklayan mekanizma olabilir. Bununla birlikte, bu bağlanmanın geri dönüşümlü ve konsantrasyona bağılı olduğu ve klirens mekanizmalarına yanıt verdiği bilinmektedir (62).

2.3.3.4. Eliminasyon

Uygulama yolundan bağımsız olarak, uygulanan dozun %90'dan fazlası böbreklerden değişmeden atılır. Küçük miktarlar da ter, tükürük ve dışkı ile atılır (62).

2.3.3.5. Klirens

21 g borik asidin oral alımını takiben akut borik asit zehirlenmesi olan bir olguda, hemodiyalizden önce 0,99 L / saat toplam vücut klirensi hesaplanmıştır. Borik asit, gastrointestinal sistemden, seröz boşluklardan ve iltihaplı ciltten kolaylıkla emilir. Sağlam ciltten emilimi sınırlıdır. Verilen dozun yaklaşık %50'si 24 saat içinde atılır. Kronik uygulama sırasında, idrar atılımındaki platoya ancak 2 hafta sonra ulaşılır (62).

2.3.3.6. Biyolojik Yarı Ömür

İnsanlarda gözlenen zehirlenme vakalarına göre, borik asidin eliminasyon yarılanma ömrü 13 ila 24 saat arasında değişmektedir. Borik asidin eliminasyon kinetiğı, intravenöz ve oral yollarla borik asit verilen gönüllü insanlarda değerlendirilmiştir.

Eliminasyon yarı ömrü, bu çalışmalarda her iki yoldan da aynı bulunmuştur ve yaklaşık 21 saat olarak hesaplanmıştır (62).

2.3.4. Etki Mekanizması

Borik asidin antibakteriyel ve antifungal etkilerine aracılık etme mekanizmasına ilişkin bilgiler sınırlıdır. Borik asit, kritik virülans faktörleri olan; *Candida albicans*'ın biyofilm oluşumunu ve hif oluşumunu inhibe eder. Ayrıca fungal büyümeyi de inhibe eder.

Borik asit ve türevlerinin hem hayvanlarda hem de insanda riboflavinüriyi arttırdığı gösterilmiştir. Borik asit, riboflavinin polihidroksi ribitol yan zinciri ile kompleks oluşturur ve sudaki çözünürlüğünü büyük ölçüde artırır (62).

2.3.5. Kullanım Alanları

Borik asitin; enzim sistemlerinde stabilizatör olarak, insektisit olarak, kozmetik sektöründe, gıda maddelerinde katkı maddesi olarak geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır (62).

2.3.6. Bor ve Türkiye

Dünyada ki bor rezervlerinin %72.3'ü Türkiye de bulunmaktadır. Bor mineralleri günümüzde cam sanayinden, deterjan sanayine, metalurjiden tarım ve nükleer uygulamalara kadar yaygın ve gün geçtikçe artan kullanım alanlarına sahiptir. Bu stratejik özelliklerinden dolayı bor madeni Türkiye için büyük bir öneme sahiptir. Bor, doğada serbest bir element olarak bulunmaktan ziyade, başka elementlerle bileşikler halinde bulunmaktadır. En yaygın halde; sodyum, kalsiyum ve magnezyum ile bileşik halde bulunur. Sodyum kökenli olanlara Tinkal (boraks), kalsiyum kökenli olanlara Kolemanit, sodyum ve kalsiyum kökenli olanlara da Üleksit adı verilir.

Bor elementi periyodik tabloda 'B' simgesiyle ifade edilen, atom numarası 5 olan metal ve ametal arası yarı iletken özelliğe sahip bir elementtir. Doğada yaygın olarak toprakta, kaya da ve suda bulunur. Türkiye dünya ham bor ihtiyacının %95'ini karşılarken, aynı zamanda dünya bor pazarında satılan ürünlerin %88'i de Türkiye ham borlarından elde edilen bor son ürünlerinden oluşmaktadır (67).

2.3.7. Borik Asit ve Kanser

Borik Asit ve Kalsiyum Fruktoboratın Meme Kanseri Hücre dizisi olan MDA-MB-231 Üzerindeki Karşılaştırmalı Etkilerinin incelendiği bir çalışmada; hem kalsiyum fruktoborat hemde borik asit MDA-MB-231 meme kanseri hücre dizisinde proliferasyonunu inhibe etmiştir. Kalsiyum fruktoboratın bu etkisi apoptozu indüklemesine bağlanmışken borik asit daha ziyade hücre fenotipini yaşlandırarak büyümeyi inhibe etmiştir (68).

Borik asit prostat kanseri hücre kültürlerinde de çalışılmış olup değişik prostat kanseri hücre kültürlerinde büyümeyi doz bağımlı olarak inhibe etmiştir. Borik asidin anti-proliferatif etkisinin muhtemel mekanizması, nükleotidlerin işlevini veya kullanımını değiştiren nükleotid-borat komplekslerinin oluşumu olarak düşünülmüştür (69).

Borik asitin meme kanseri ve prostat kanseri hücre dizilerinde etkisini araştıran bir başka çalışma da; borik asidin seçilmiş prostat kanseri ve meme kanseri hücre dizilerinde proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (70).

Borik asit sahip olduğu özelliklerinden dolayı kanser tedavisi araştırmalarında sıkça kullanılan ajanlardan biridir. Karbona benzer yapısal özelliklere sahip zayıf bir organik Lewis asididir ve bu özelliği birçok karbon içeren substrat ile yarışmalı bir inhibitör görevi görmesine izin verir (71, 72). Borik asitin; kullanım kolaylığı, düşük toksisitesi, 24 saat içinde idrarla atılması ve metabolize olmaması gibi farmakolojik özellikleri onu çekici bir kanser tedavisi adayı haline getirmektedir (72-77).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu çalışma TMX ve borik asitin kombine uygulamasının ER(+) MCF-7 hücre dizilerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılmasını amaçlayan deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma Mayıs 2017 ile Ocak 2021 tarihleri arasında Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örnekleme/Çalışma Grupları

Araştırma ER(+) meme kanseri hücre dizisi olan MCF-7 hücre dizilerinde gerçekleştirilmiştir.

3.4. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmada kullanılan değişkenler Tablo 2.de verilmiştir.

Tablo 2. Araştırmanın değişkenleri

Kontrol Grupları	Deneysel Gruplar	Değişkenler	
		Bağımlı	Bağımsız
MCF-7 hücre dizileri	MCF-7 hücre dizileri	Proliferasyon Kombinasyon indeksi	<ul style="list-style-type: none">● Tamoksifen● Borik asit● Tamoksifen borik asit Kombinasyonları

3.5. Veri Toplama Araçları

3.5.1. Araştırmada Kullanılan Cihazlar

Araştırmada kullanılan cihazlar Tablo 3 de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan demirbaş cihazlar

Cihaz Adı/Marka/Model	Kullanım Amacı
Nuare Class II 90 Nu425-300E	Hücre kültürü çalışmaları, uygulamaları manipülasyonları.
Binder IP 20	Hücre kültürlerinin inkübasyonu.
Euromex FE2935 Inverted Mikroskop	Kültürlerin incelenmesi.
Beckman DTX 880 Multimode Detector	Spektrofotometrik ölçümler.
Hettich Universal 32R Soğutmalı Santrifüj	Çalışmada kullanılan falkon tüplerin santrifüj işlemleri
Denver Instruments APX-200 Analitik Terazı	Kimyasal tartım işlemleri.
Memmert, Su Banyosu	Hücre kültürü ortamlarının ısıtılması

3.5.2. Hücre Dizileri

Araştırma ER(+) meme kanseri hücre dizisi olan MCF-7 hücre dizilerinde gerçekleştirilmiştir.

3.5.3. Hücre Kültürü

MCF-7 hücreleri; %10 Fetal Sığır Serumı (FBS, Biological Industries, Kat.No: 01-121-1A), 100 µg/ml Penisilin/Streptomisin (Biological Industries, Kat.No: 03-031-1B), 2mM L-Glutamin (Biological Industries, Kat.No: 03-020-1B), ve %1 MEM-Eagle Non-esansiyel amino asit solüsyonu (Biological Industries, Kat.No: 01-340-1B) içeren EMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biological Industries, Kat.No: 01-025-1A) medyumunda içerisinde 37°C'de, %5 karbondioksitli (CO₂) inkübatör de kültüre edildi.

3.5.4. Kültürlerin Pasajlanması

- Kültüre edilen hücrelerden besiyerleri çekildi.
- Hücreler iki defa steril fosfat tamponlu salin (PBS, Biological Industries, Kat. No: 02-023-1A) ile yıkandı.
- Hücrelerin üzerini kaplayacak kadar Tripsin/EDTA solüsyonu (Biological Industries, Kat.No: 03-052-1B) eklendi.
- 1-2 dakika 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyonu sağlandı.
- %10 FBS içeren besiyeri ile hücreler süspanse edildi.
- Hücreler 1500 dönme sayısı/dakika da santrifüj edilerek tripsin uzaklaştırıldı.
- İstenilen pasaj sayısına göre flasklara hücrelerin ekimi yapıldı.

3.5.5. Hücre Sayımı

- Kültüre edilen hücreler tripsinize edilerek flasklardan kaldırıldı.
- Elde edilen hücreler süspanse edildi.
- Hücre süspanسیونundan 100 µl alındı.
- Üzerine 200µl PBS ve 200µl Tripan mavisi (Biological Industries, Kat.No:03-102-1B) eklendi (böylece hücreler 1'e 5 dilüe edilmiş oldu) .
- Bu karışım iyice süspanse edildi ve Neubauer lamına 10 µl yüklenerek 10 büyük kare sayıldı.
- Hücre miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

(sayılan hücre sayısı)x(sulandırma faktörü)/(sayılan büyük kare miktarı)x10.000=ml'deki hücre miktarı

3.5.6. Sitotoksisite Tayini

3.5.6.1. Tamoksifen İndüksiyonu

- MCF-7 hücreleri her kuyuda 2500 hücre olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültürü kaplarına ekildi.
- 24 saat sonra hücrelerin besi yerleri değiştirilerek 0 µM, 5 µM, 7,5 µM, 10 µM, 12,5 µM, 15 µM, 17,5 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM, 40 µM dozlarında Tamoksifen (Selleckchem, Katalog No: S1116) içeren besiyeri uygulandı.
- 24, 48 ve 72. saatlerde MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) analizi yapılarak sitotoksisite düzeyleri belirlendi.

3.5.6.2. Borik Asit İndüksiyonu

- MCF-7 hücreleri her kuyuda 2500 hücre olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültürü kaplarına ekildi.
- 24 saat sonra hücrelerin besi yerleri değiştirilerek 0 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 160 mM dozlarında Borik asit (Amresco, Katalog No: 0588) içeren besi yeri uygulandı.
- 24, 48 ve 72. saatlerde MTT analizi yapılarak sitotoksisite düzeyleri belirlendi.

3.5.6.3. Tamoksifen ve Borik Asit Kombinasyon İndüksiyonu

- MCF-7 hücreleri her kuyuya 2500 hücre olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültürü kaplarına ekildi

- 24 saat sonra hücrelerin besi yerleri değiştirilerek Borik asit 10mM/Tmx10 µM, Borik asit 10 mM /Tmx15 µM, Tmx10 µM /Borik asit 20 mM, Tmx10 µM /Borik asit 40 mM kombinasyonlarında hücelere 72 saatlik TMX/borik asit uygulaması gerçekleştirildi.
- 72. Saatte MTT analizi yapılarak sitotoksisite düzeyleri belirlendi.

3.5.6.4. MTT Analizi

- Hem TMX hemde Borik asit indüksiyonu yapılan hücreler belirlenen indüksiyon saatleri sonunda inkübatörden alındı.
- Her bir kuyuya 5mg/ml MTT (Sigma, Katalog No: M5655) stok solüsyonundan 15µl eklendi.
- %5 CO₂ 'li inkübatörde 4 saat inkübe edildi.
- Kuyulardaki besi yeri çekilerek 100µl dimetil sülfoksit(DMSO) eklendi.
- 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okutuldu.
- Her bir kuyudan elde edilen optik dansite (OD) belirlendi
- Hücre canlılığı yüzdesi aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

Canlılık % = (OD Tamoksifen ve borik asit uygulanmış-Blank) : (Tamoksifen ve borik asit uygulanmamış Blank) x 100

3.5.6.5. Kombinasyon İndeks Analizi

- TMX ve borik asidin kombine uygulamasının etkisinin değerlendirilmesi için Compusyn 1.0 programı kullanıldı.
- TMX ve borik asidin doz bağımlı sitotoksisite değerleri ayrı ayrı programa girilerek her iki ajan için doz bağımlı sitotoksik etki belirlendi.
- TMX ve borik asid kombine uygulamasının etkileride analiz edilerek kombinasyon indeks değerleri belirlendi (Kİ).
- Kİ değerleri aşağıda verilen aralıklara göre değerlendirildi (78).
 - $0.9 < Kİ < 1.1$ Aditif etki
 - $Kİ < 1.1$ Antagonist etki
 - $Kİ > 0.9$ Sinerjik etki

3.5.6.6. İstatistiksel Analiz

- GraphPad Prism 8.0 istatistik programı kullanılarak elde edilen veriler analiz edildi.

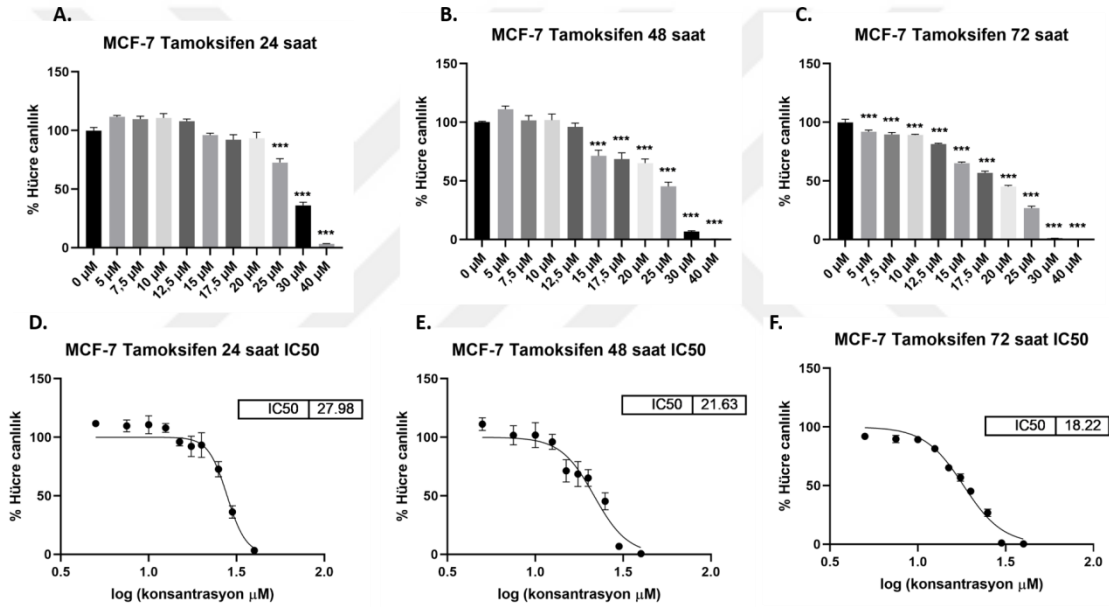
- Sitotoksisite deneylerinde gruplar arasındaki farkın anlamlılık düzeyinin belirlenmesi için One-Way ANOVA analizi (Post-Hoc, Dunnett's), iki grup arasındaki farkın anlamlılık analizi için ise student t testi yapıldı.
- Hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyon (IC50) değerlerinin belirlenmesinde doz yanıt baskılama analizi yapıldı.
- $p<0.05(*)$, $p<0.01(**)$, $p<0.001(***)$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1 TMX'in MCF-7 Hücre Dizilerinde Hücre Canlılığına Olan Etkisi

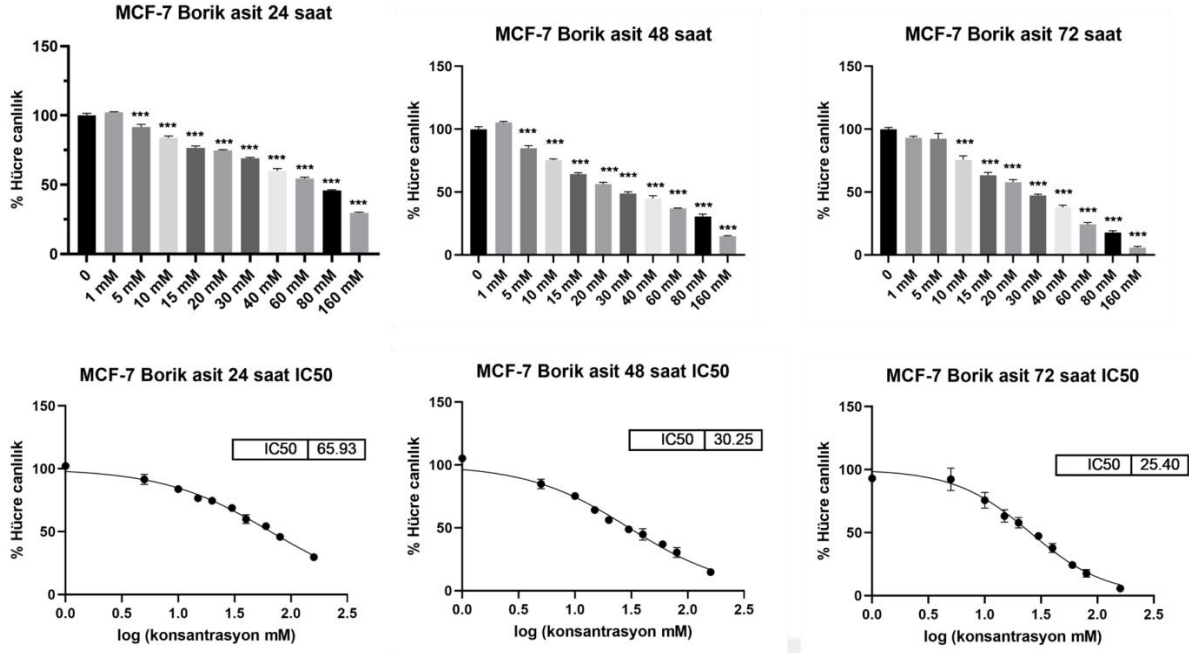
TMX'in MCF-7 hücre dizilerinde hücre canlılığına olan etkisini belirlemek amacıyla doz ve zaman bağımlı olarak TMX uygulaması gerçekleştirildi. TMX'in 24. Saatte 25 μ M, 48. Saatte 15 μ M ve 72. Saatte 5 μ M dan itibaren hücre canlılığını istatistiksel olarak azalttığı görüldü ($p < 0.05$) (Şekil 1 A, B,C). Tmx'in MCF-7 hücre dizilerindeki hücre proliferasyonu için IC50 değerleri 24, 48 ve 72. saatler için sırasıyla 27.98 μ M, 21.63 μ M ve 18.22 μ M olarak hesaplandı (Şekil 1 D, E,F). TMX'in MCF-7 hücre dizilerinde doz ve zaman bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı belirlendi (Şekil 3 A).



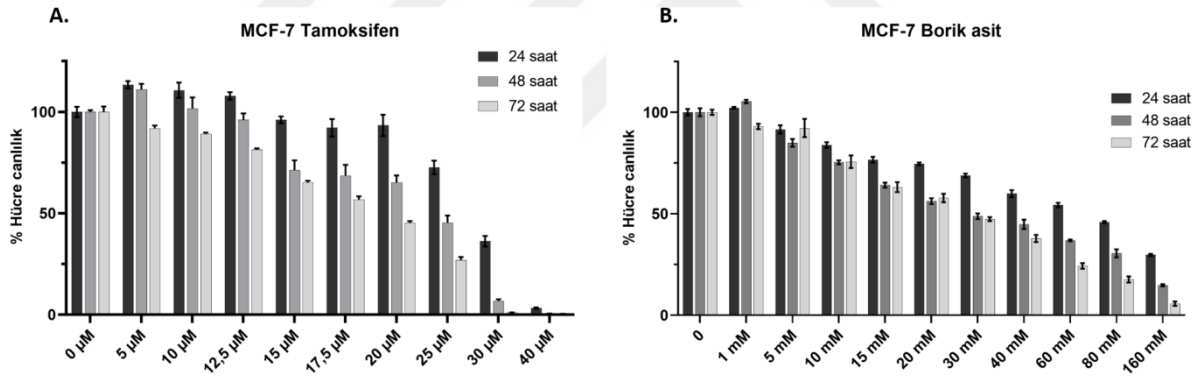
Şekil 1. TMX'in MCF-7 hücre dizisi üzerinde doz ve zaman bağımlı olarak hücre canlılığına olan etkisi ve zamana göre IC50 dozları.

4.2. Borik Asidin MCF-7 Hücre Dizilerinde Hücre Canlılığına Olan Etkisi

Borik asidin MCF-7 hücre dizilerinde hücre canlılığına olan etkisini belirlemek amacıyla doz ve zaman bağımlı olarak Borik asit uygulaması gerçekleştirildi. Borik asidin 24. Ve 48. Saatlerde 5 mM, 72. Saatte ise 10mM dan itibaren hücre canlılığını istatistiksel olarak azalttığı görüldü ($p < 0.05$) (Şekil 2 A, B,C). Borik asidin MCF-7 hücre dizilerindeki hücre proliferasyonu için IC50 değerleri 24, 48 ve 72. saatler için sırasıyla 65.93 mM, 30.25mM, 25.40mM olarak hesaplandı (Şekil 2 D, E, F). Borik asidin MCF-7 hücre dizilerinde doz ve zaman bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı belirlendi (Şekil 3 B).



Şekil 2. Borik asitin MCF-7 hücre dizisi üzerinde doz ve zaman bağımlı olarak hücresel canlılığa olan etkisi ve zamana göre IC50 dozları

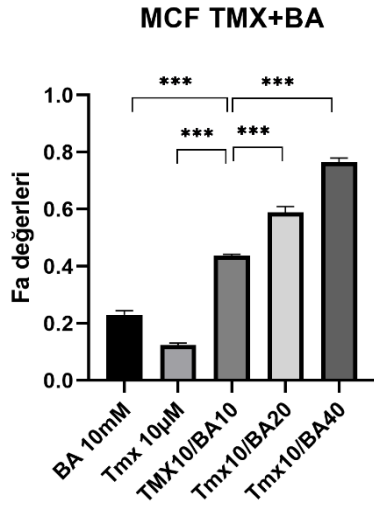


Şekil 3. TMX ve Borik asitin MCF-7 hücre dizisi üzerinde doz ve zaman bağımlı olarak hücresel canlılığa olan etkisi

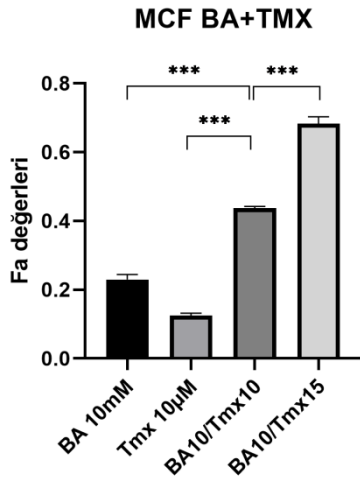
4.3. TMX ve Borik Asit Kombinasyonlarının MCF-7 Hücre Dizilerinde Hücre Canlılığına Olan Etkisi

Farklı kombinasyonlarda MCF-7 hücre dizilerine borik asit ve TMX uygulanmasıyla, KI'nin belirlenmesi ve isobolom analizlerinin yapılması amaçlandı. Tek başına dozlar ve kombine dozlar sonucu hücre canlılığı, etkilenen hücre değerleri (Fa) $(1 - (\text{Hücre Canlılığı}/100))$ formülüne göre hesaplandı.

Tek başına TMX 10 μ M uygulanan gruplar, 10 μ M TMX ile 10, 20 ve 40 mM borik asit kombine edilen gruplarla kıyaslandığında, TMX ve borik asit kombine edilen gruplar sadece TMX alan grupla kıyaslandığında hücresel canlılıkta daha fazla azalmaya neden olmuştur ($p<0.001$) (Şekil 4a). 10mM borik asit ile kombine 10 ve 15 μ M TMX uygulanan gruplarda da benzer bir şekilde hücre canlılığının istatistiksel olarak tek başına borik asit ve TMX uygulanan gruplardan daha az olduğu belirlendi ($p<0.001$) (Şekil 4b).



Şekil 4a. TMX ve Borik asit kombinasyonlarının MCF-7 hücre dizileri üzerinde hücresel canlılığa olan etkisi



Şekil 4b. TMX ve Borik asit kombinasyonlarının MCF-7 hücre dizileri üzerinde hücresel canlılığa olan etkisi

4.4. TMX ve Borik Asit Kombinasyonlarının MCF-7 Hücre Dizilerinde Kombinasyon İndeks Değerleri

TMX ve borik asidin MCF-7 hücre dizilerine tüm dozlarda tek başına ve kombine uygulaması sonucu elde edilen Fa değerleri Compusyn 1.0 programına girilerek Kİ değerleri hesaplandı. Tüm TMX ve borik asit kombinasyonlarında Kİ değerlerinin 0,9 ile 1,1 arasında olduğu görüldü. Kİ değerlerine göre TMX ve borik asidin kombine olarak MCF-7 hücre dizilerine uygulanmasının, MCF-7 hücre dizilerinde hücre canlılığı üzerinde aditif bir etki meydana getirdiği belirlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Borik asit ve Tamoksifen kombinasyonlarının MCF-7 hücre dizilerinde kombinasyon indeks analizi

Borik asit dozlar	Tamoksifen dozlar	Fa	Kİ değerleri
10.0	10.0	0.43783	1.08472
10.0	15.0	0.68272	0.98605
20.0	10.0	0.58978	1.01081
40.0	10.0	0.76566	1.011077

5. TARTIŞMA

Kanser, dünya genelinde birçok ülkede temel sağlık sorunudur. Amerika'da ölümlerin en sık ikinci nedeni kanserdir. UKAA'nın istatistiklerine göre, dünya genelinde 2018 yılında yaklaşık olarak 18.1 milyon yeni kanser vakası gözlenirken, 9.6 milyon kansere bağlı ölüm gözlenmiştir(non-melanom cilt kanserleri hariç tutulmuştur). Global olarak meme kanseri en sık tanı konulan kanserlerden biridir. Bununla birlikte, meme kanseri insidansı, 27 / 100.0002 (Orta Doğu Asya ve Afrika) ile 85-94 / 100.0002 (Avustralya, Kuzey Amerika ve Batı Avrupa) arasında değişmektedir. Ülkemizde de meme kanseri kadınlar arasında görülen kanserler içinde 45.6/100.000 oranı ile ilk sırada yer almaktadır.

Günümüzde meme kanserinin tedavisinde; cerrahi tedavi, KT, RT, HT ve hedefe yönelik tedavi olmak üzere 5 temel yöntem kullanılmaktadır.

HT de kullanılan ajanlardan biri olan TMX; SERM grubunun bir üyesidir ve östrojen reseptörünün yarışmalı inhibitörüdür. Böylece östrojenin reseptörüne bağlanmasını inhibe ederek östrojene hücresel anlamda cevap verilmesini de azaltır. TMX hücre büyümesini inhibe eden TGF-B üretimini artırırken meme kanser hücrelerinin büyümesini uyarıcı IGF-1 üretimini ise azaltır. TMX ayrıca PKC ekspresyonunu azaltarak sinyal iletimini inhibe eder böylece özellikle malign glioma ve PKC aşırı üreten diğer tümörlerde antiproliferatif etki gösterir (1-5).

TMX HR(+) meme kanserinde hem adjuvan tedavi de hem de metastatik hastalıkta kullanılır.

TMX in vitro çalışmalarda HR(+) MCF-7 hücre dizisinin proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe eder. TMX düşük dozlarda hem ER (+) hem de ER(-) meme kanseri hücre dizilerinde yapısal kromozomal anormalliklerini (delesyonlar, izokromozomlar, translokasyonlar) indükleyebilir. Bu genotoksik etki, HER-2 gen ekspresyonu olan hücre dizilerinde daha sık gözlenmektedir. TMX'in düşük konsantrasyonlarda (0,1-1 µM) hücre döngüsünde duraklamaya neden olduğu, daha yüksek konsantrasyonlarda (5 µM'nin üzerinde) ise meme kanseri hücre dizilerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (79, 80).

Rouhimoghadam ve arkadaşları tarafından yapılan TMX'in MCF-7 hücre dizilerinde apoptotik etkilerini araştıran bir çalışmada; TMX'in hücresel canlılık üzerinde doza bağımlı bir etkisi görülmüştür. Hücreler değişik konsantrasyonlarda (60-460µM) TMX ile 48 saat inkübe edilmiş ve 48. saat IC50 250 µM olarak hesaplanmıştır. Bu doz literatürde bulunan

dozların üzerinde bulunmuştur. Bizim çalışmamız da ise 48.sa IC50 değeri 21.63 μM olarak hesaplanmıştır (81).

Hassan ve arkadaşlarının TMX'in meme kanseri hücre dizilerinde olan sitotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışma da, TMX'in değişen konsantrasyonlarda MCF-7 hücre dizilerinde 24 saat inkübasyonunu izlemişler ve çalışma da IC 50 4.506 $\mu\text{g/mL}$ (12.12 μM) olarak hesaplanmıştır. Bizim çalışmamız da ise 24.saat IC 50 27.98 μM olarak bulunmuştur (82).

Bardon ve arkadaşlarının TMX'in MCF-7 hücre dizilerinde antiproliferatif etkilerini araştıran çalışmalarında TMX'in hücre canlılığı azaltma etkisi 10 μM dozunda yaklaşık olarak 12. saatten itibaren başlamıştır. 48 saat TMX inkübasyonunda 4 μM 'dan yüksek konsantrasyonlarda TMX hücre canlılığı anlamlı olarak azaltmıştır. Bizim çalışmamız da ise 48.saatte 15 μM 72. saatte ise 5 μM üzerinde TMX dozları hücre canlılığı anlamlı olarak azaltmıştır (83).

Yan XU ve arkadaşlarının TMX'in HR(+) MCF-7 hücre dizilerinde apoptozu indüklediği ve invazyonu inhibe ettiğini araştıran çalışmada, MCF-7 hücre hattında Tmx'in 24.saatte (2.5, 5 ve 10 μM) artan konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunda inhibisyona sebep olduğunu gösterilmiştir. Bizim çalışmamız da ise TMX'in 24.saatte 25 μM ,48.saate 15 μM ve 72.saate 5 μM dozundan itibaren hücre canlılığı azalttığı gösterilmiştir (84).

Motawi ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada TMX MCF-7 meme kanseri hücre dizilerinde 48 saat değişen konsantrasyonlarda (10 μM -50 μM) inkübe edilmiştir. Bu çalışma sonunda TMX'in IC50 değeri 20 μM olarak hesaplanmıştır. Bu çalışma; TMX'in MCF-7 hücre dizileri üzerinde konsantrasyona bağlı sitotoksik etkisini ortaya koymuştur (85). Bizim çalışmamız da da IC50 benzer dozda 21.63 μM olarak bulunmuştur.

TMX hem metastatik meme kanserinde hem de meme kanserinin adjuvan tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak TMX'e ya en baştan ya da zaman içerisinde direnç gelişmektedir bu durum tedavide başarısızlığa yol açmaktadır. Bu yüzden TMX'in yeni türevleri ya da farklı kombinasyonları araştırılmaktadır. TMX, preparat olarak tmx sitrat formunda bulunmaktadır. Sitrat antioksidan özelliği ve aktif maddenin stabilitesini korumasından dolayı farmasötik preparatlarda sık kullanılan bir yardımcı maddedir. Borik asidin Sitrat gibi zayıf bir lewis asidi olması ve aynı zamanda sitotoksik etkileri de olması nedeniyle tmx borat potansiyel olarak yeni bir tmx türevi olarak görünmektedir. Bu bilgiler

ışığı altında çalışmamızda tmx, borik asit ve tmx-borik asit kombinasyonlarının MCF-7 hücre dizilerinde sinerjistik etkisi araştırılmıştır.

Bor elementi periyodik tabloda 'B' simgesiyle ifade edilen, atom numarası 5 olan metal ve ametal arası yarı iletken özelliğe sahip bir elementtir. Doğada yaygın olarak toprakta, kaya da ve suda bulunur (67). Düşük konsantrasyonlarda inorganik boratlar, emilmeden önce mukozal yüzeyleri örten sulu tabakada fizyolojik pH'ta borik aside dönüşür (62). Borik asit sahip olduğu özelliklerinden dolayı kanser tedavisi araştırmalarında sıkça kullanılan ajanlardan biridir.

Karbona benzer yapısal özelliklere sahip zayıf bir organik Lewis asididir ve bu özelliği birçok karbon içeren substrat ile yarışmalı bir inhibitör görevi görmesine izin verir. Borik asitin; kullanım kolaylığı, düşük toksisitesi, 24 saat içinde idrarla atılması ve metabolize olmaması gibi farmakolojik özellikleri onu çekici bir kanser tedavisi adayı haline getirmektedir (71-77).

Borik asit birçok kanser hücre dizisinde çalışılmıştır. Barranco ve arkadaşlarının DU-145 ve LNCap prostat kanseri hücre dizilerinde borik asitin değişen konsantrasyonlarda (0.1-1mM) 1-8 gün inkübasyon sonunda hücresel proliferasyona olan etkisini değerlendiren çalışmasında borik asit doz bağımlı olarak hücresel proliferasyonu inhibe etmiştir (69). Daha sonraki deneylerde DU-145 üzerinde yapılan çalışmalarda borik asitin bu proliferasyon inhibisyonundaki etki mekanizmasının hücresel siklus üzerindeki etkisinden ziyade B-galaktozidazın pH 4'te doz bağımlı olarak artmasından dolayı hücreyi morfolojik olarak yaşlandırmasıyla ilişkili bulunmuştur (86).

Hacıoğlu ve arkadaşları DU-145 prostat kanseri hücre dizilerinde değişen konsantrasyonlarda borik asidin oksidatif stres üzerine olan etkisi, apoptotik yollar ve morfolojik değişiklikler üzerine olan etkisini araştırmıştır. 24 saat sonra değişen dozlarda uygulanan borik asidin (0-12.5 mM) hücre canlılığına olan etkisi MTT testi ile analiz edilmiştir. Borik asit 24. saatte hücresel canlılıkta anlamlı düzeyde azalmaya neden olmuştur (87).

Çiğel ve arkadaşlarının Caco-2 kolon kanseri hücre dizilerinde borik asitin belirli dozlarda (0-1 mM) hücresel canlılığa olan etkisini araştıran çalışmasında borik asidin hücresel canlılığı doza bağımlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (88).

El-Hefny ve arkadaşlarının karaciğer kanser hücresi olan HepG2 ve normal karaciğer hücresi olan THLE2 üzerinde borik asit, benzoik asit ve sodyum sülfür'ün sitotoksik etkisini ve

apoptoza olan etkisini araştıran çalışmasında borik asit HepG2 karaciğer kanseri dizilerinde 12.5µg/ml(0,2mM) den itibaren doz bağımlı bir şekilde hüresel canlılığı azaltmaktadır (89). Borik asit; farmakolojik özelliklerinden dolayı kolon kanseri, prostat kanseri, karaciğer kanseri hücre dizilerinde araştırılmıştır ve meme kanseri hücre dizileri üzerinde de araştırılmış ve araştırılmaya da devam edilen bir moleküldür.

Scorei ve arkadaşları kalsiyum fruktoborat ve borik asidin meme kanseri hücre dizisi MDA-MB-231 üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Farklı dozlarda uygulanan borik asit ve fruktoboratin (0.45-22.5 mM) 24.saatte hücre canlılığına olan etkisi MMT yöntemi ile analiz edilmiştir. Kalsiyum fruktoborat ve borik asit MDA-MB-231 hücre dizisi üzerinde doz bağımlı sitotoksisite göstermiştir (68).

Albayrak'ın meme kanseri hücre dizisi olan MCF-7 üzerinde değişen konsantrasyonlarda (5-100 mm) borik asidin 24., 48. ve 72. saatlerde genotoksisite ve anjiyogenez üzerine olan etkisini araştıran çalışmasında MCF-7 meme kanseri hücre dizilerinde 24., 48. ve 72. saatlerde hücre proliferasyonunda doz bağımlı bir düşüş saptanmıştır. Bununla birlikte, 72. saat de proliferasyon çok baskılanmıştır. En anlamlı sonuçlar 48. saatte elde edilmiştir, diğer biyokimyasal analizler 48.saat baz alınarak yapılmıştır. Borik asidin farklı konsantrasyonlarda (5-100 mm) MCF-7 hücre dizisi üzerine olan etkisi 48 saat sonra incelenmiş ve kontrol grubuna kıyasla 48.saatte 5 mM'dan itibaren hüresel canlılığı anlamlı ölçüde azaltmıştır (90). Bizim alışmamızda da borik asit 48.saatte 5 mM'dan itibaren hüresel canlılığı azaltmıştır.

Borik asit farmakolojik özelliklerinden dolayı birçok kanser hücre dizisinde çalışılmıştır, bazı çalışmalarda sinerjistik ve aditif etkisi araştırılmıştır. HT de kullanılan ajanlara ve TMX'e direnç gelişmesinden dolayı TMX yeni türevlerinin ve kombinasyonlarının araştırılması devam etmektedir. Literatürde TMX meme kanserinde etkinliğini arttırmak için yapılmış çalışmalar bulunmaktadır.

Gakhar ve arkadaşları meme kanseri hücre dizisi olan TD47 hücre dizileri üzerinde bir boşluk iletim aktivatörü olan PQ1'in TMX ile kombinasyon tedavisini tek başına TMX ile karşılaştırmıştır. Hüresel canlılığı değerlendirmek için MTT analizi yapılmıştır. Bu alışma da TMX 10 µM ve PQ1 200µM ve 500µM dozlarında kullanılmıştır ve 24.,48. ve 72.saat inkübasyon sonuçları değerlendirilmiştir. Kombinasyon tedavisi hüresel canlılığı tek başına TMX'den daha fazla azaltırken tek başına PQ1 uygulaması hüresel canlılıkta anlamlı bir azalmaya neden olmamıştır bu durum bize PQ1'in tek başına etkisinden ziyade TMX'in etkisini arttırdığını göstermiştir. PQ1 ve TMX'in kombinasyon tedavisi BAX

ekspresyonunda, kaspaz 3 aktivasyonunda ve dna fragmantasyonunda artışa yol açmıştır. Bu çalışma TD47 hücre dizilerinde apoptozu güçlendirmek için TMX 'in PQ1 ile kombine kullanılabileceğini göstermiştir (91).

Khamis ve arkadaşları Hesperidin, piperin ve arı venomunun TMX ile kombinasyonlarının meme kanseri hücre dizileri (MCF-7,TD47) üzerinde sinerjistik etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmada TMX değişen konsantrasyonlarda 0.01-100 µg/ml(0.02-200 µM) tek başına ve diğer moleküllerin değişik konsantrasyonları ile kombinasyon şeklinde uygulanmıştır ve 24.saat inkübasyon sonuçları değerlendirilmiştir. Toplam 67 kombinasyon elde edilmiş olup hepsi apoptozu arttırmıştır ayrıca 10 kombinasyon TMX'in en düşük dozları ile yapılmış olup her hücre dizisi için 5 kombinasyon Kİ analizine göre sinerjistik etki göstermiştir (92).

Khazaei ve arkadaşları Trifolium pratense özünün meme kanseri hücre dizilerinde (MCF-7,MDA-MB-231) TMX sitotoksitesine olan etkisini araştırmıştır. Bu çalışma da TMX (1.25-80 µM) ve Trifolium pratense özü (15.62-10000 µg/ml) değişen dozlarda kullanılmıştır ve 48.saat sonuçları değerlendirilmeye alınmıştır. Kombinasyonun etkisi Kİ kullanılarak değerlendirilmiştir ve TMX ve Trifolium pratense özü sinerjistik sitotoksik etki göstermiştir (93).

Darakhshan ve arkadaşları Tranilast ve TMX'in meme kanseri hücre dizilerine (MCF-7,MDA-MB-231) olan etkisini araştırmıştır. Bu çalışma da TMX (1-20 µM) ve Tranilast (10-200 µM) değişik konsantrasyonlarda kullanılmıştır. MCF-7 hücre dizileri için 24., 48. ve 72. saat sonuçları değerlendirilmiştir. Kombinasyon TMX'in 2 µM ve Tranilastın artan dozları ile gerçekleştirilmiştir (2µM/20µM,2µM/50µM,2µM/100µM,2/200µM). Bu kombinasyonlar Kİ ile değerlendirilmiştir ve tüm kombinasyonlar 72. saatte sinerjistik sitotoksitate göstermiştir (94).

Lee ve arkadaşları yüksek doz c vitamininin meme kanserinde kullanılan ilaçlarla (TMX, Fulvestrant, Eribulin, Transtuzumab) kombinasyonunu, meme kanseri hücre dizilerinde (MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR3) ve meme kanseri epitel hücresi olan MCF10A hücre dizisinde araştırmıştır. Bu çalışmada C vitamininin 5mM, 10mM ve 20 mM dozları kullanılırken TMX için 4 µM kullanılmıştır. Çalışma da TMX tek başına, TMX +C vitaminin artan dozları ve TMX+ 2XC vitaminin artan dozları karşılaştırılmıştır. TMX+ C vitamini kombinasyonları 24. saatte hücresel canlılığı daha fazla azaltmıştır ayrıca c vitaminin 2 doz kullanılması tek doz kullanılmasına göre hücresel canlılığı daha fazla azaltmıştır. Bu çalışma da Kİ yapılmadığından sinerjistik ya da aditif etkiden bahsedilmemiştir (95).

Motavi ve arkadaşları MCF-7 hücre dizilerinde TMX ve Kafeik asit fenetil esterin kombine tedavisinin sitotoksosite üzerine olan etkisi, apoptotik ve otofajik yollara olan etkisini araştırmıştır. Bu çalışma da TMX (10-50 μ M) ve Kafeik asit fenetil ester (0.1- 200 μ M) değişen dozlarda kullanılmış ve 48. saat sonundaki sonuçlar değerlendirilmiştir. TMX'in maksimum sitotoksosite dozu 50 μ M ve IC50 değeri de 20 μ M olarak bulunurken CAPE'in maksimum sitotoksosite dozu 200 μ M ve IC50 değeri de 10 μ M olarak bulunmuştur. TMX ve CAPE yapılan Kİ analizine göre sinerjistik sitotoksik etki göstermiştir (85). Bizim çalışmamız da da 48.saat TMX IC50 değeri 21.63 μ M olarak hesaplanmıştır ve literatür ile uyumludur.

Mannal ve arkadaşları pterostilben ve TMX'in HR(+) olan MCF-7 ve ZR-751 hücre dizilerinde hücre sel canlılığı olan etkisini araştırmıştır. Bu çalışma da TMX 5 μ M olarak sabit dozda çalışılırken, Pterostilben değişen dozlarda kullanılmıştır (10 μ M,20 μ M,30 μ M). Hücre dizilerinde sonuçları değerlendirmek için 24. saat verileri değerlendirilmeye alınmıştır ve TMX ve Pterostilbenin aditif etki gösterdiği bulunmuştur (96). Bizim çalışmamızda da TMX ve Borik asit MCF-7 hücre dizilerinde Kİ analizine göre aditif etki göstermiştir.

Meme kanserinde HR(+) olan hastalarda endokrin tedavi olmazsa olmazdır. Ancak TMX'de dahil olmak üzere bu ajanlara uzun dönem kullanımda neredeyse yüzde 50 direnç gelişmektedir. Bu durum bize tedavi de kullanılan ajanların yeni türevlerin ya da yeni kombinasyonlarının gerekliliğini düşündürmektedir, bu yüzden literatürde TMX'in sitotoksitesini arttırabileceğini düşünülen moleküllerle farklı çalışmalar bulunmaktadır, ancak literatürde borik asit ve TMX kombinasyonunun MCF-7 hücre dizilerinde etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma borik asit ve TMX kombinasyonunun mcf-7 hücre dizilerinde etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Çalışmamızda TMX ve borik asitin değişen dozları ve kombinasyonları kullanılmıştır ve 24., 48. ve 72. saat sonuçları değerlendirilmiştir ve Kİ analizine göre TMX ve borik asit MCF-7 hücre dizilerinde aditif etki göstermiştir.

6. SONUÇ

Kanser global olarak temel sağlık sorunu olmaya devam etmektedir (1). Meme kanseri dñnyada ve ÷lkemizde kadınlarda en sık gözlenen kanserdir (3,4). Meme kanserinin tedavisinde farklı tedavi modaliteleri bulunmaktadır. Özellikle (HR+) kanserlerde endokrin tedavi olmazsa olmazdır. Endokrin tedavide kullanılan ajanlardan biri olan TMX uzun yıllardır HR(+) olan meme kanserinde kullanılmaktadır. TMX tedavisiyle alakalı en endişe verici durumlardan birisi TMX kullanan hastalarda ilaca karşı gelişen dirençtir. Bu direnç tedavide başarısızlığa yol açmaktadır. Bu yüzden TMX'in farklı ilaçlarla kombinasyon çalışmaları literatürde bulunmaktadır. Literatürde TMX ve borik asit kombinasyonunun HR(+) meme kanseri hücre dizisi olan MCF-7 üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma TMX ve borik asit kombinasyonunun MCF-7 meme kanseri hücre dizilerinde etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Bu çalışma da TMX (5µM-40µM) ve borik asit (1-160mM) değişen konsantrasyonlarda ayrı ayrı ve kombine olarak (tmx 10µM/Borik asit 10-20-40 mM ve TMX 15µM/Borik asit 10mM) 24., 48. ve 72. saatte değerlendirilmiştir. Hem TMX hem de Borik asit doz ve zaman bağımlı olarak hücre sel canlılığı azaltmaktadır. Kombinasyonlar hücre sel canlılığı tek başına TMX'den ve tek başına Borik asitten daha fazla azaltmıştır. Kombinasyon analizi için KI kullanılmış ve 72.saat sonuçları değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda TMX ve Borik asit MCF-7 hücre dizilerinde aditif etki göstermektedir. Bu çalışma meme kanseri hücre dizilerinde, tamoksifenin borik asit kombinasyonlarına temel oluşturabilecek orjinal bir araştırmadır. Ancak borik asit ve tamoksifen kombinasyonlarının hücre canlılığına olan etkisinin altında yatan mekanizmaları açıklayabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020 Jan;70(1):7–30.
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2019 Apr;144(8):1941–53.
3. Sancho-Garnier H, Colonna M. Breast cancer epidemiology, 2019. *Presse Medicale.* 2019 Oct;48(10):1076-84.
4. Başara BB, Çağlar İS, Aygün A, Özdemir TA. Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2018 [Internet]. Ankara: Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Sağlık Bilgi Sistemleri Genel Müdürlüğü; 2019 [cited 2021 Feb 18]. 44 p. Available from:<https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/36134,siy2018trpdf.pdf?>
5. NCIthesaurus. Tamoxifen [Internet]. 2021 [updated 2021 Jan 25; cited 2021 Feb 20]. Available from: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&version=21.01d&ns=ncit&code=C855&key=1619551609&b=1&n=null
6. Devirian TA, Volpe SL. The physiological effects of dietary boron. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003;43(2):219–31.
7. Moore JA; Expert Scientific Committee. An assessment of boric acid and borax using the IEHR evaluative process for assessing human developmental and reproductive toxicity of agents. *Reprod Toxicol.* 1997 Jan-Feb;11(1):123–60.
8. NCIthesaurus. Boric acid [Internet]. 2021 [updated 2021 Jan 25; cited 2021 Feb 20]. Available from: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C47416
9. Bradke TM, Hall C, Carper SW, Plopper GE. Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability. *Cell Adhes Migr.* 2008 Jul-Sep;2(3):153–60.
10. Zafar H, Ali S. Boron inhibits the proliferating cell nuclear antigen index, molybdenum containing proteins and ameliorates oxidative stress in hepatocellular carcinoma. *Arch Biochem Biophys.* 2013 Jan;529(2):66–74.
11. National Cancer Institute. Breast Cancer Screening (PDQ®)–Health Professional Version [Internet]. 2020 [updated 2020 Aug 27; cited 2021 Feb 5]. Available from:<https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-screening-pdq>
12. Doren A, Vecchiola A, Aguirre B, Villaseca P. Gynecological-endocrinological aspects in women carriers of BRCA1/2 gene mutations. *Climacteric.* 2018 Dec;21(6):529–35.

13. Anderson BO, Yip CH, Smith RA, Shyyan R, Sener SF, Eniu A, et al. Guideline implementation for breast healthcare in low-income and middle-income countries: overview of the Breast Health Global Initiative Global Summit 2007. *Cancer*. 2008 Oct;113(8 Suppl):2221–43.
14. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015 Mar;65(2):87–108.
15. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019 Jan;69(1):7–34.
16. Clark BZ, Onisko A, Assylbekova B, Li X, Bhargava R, Dabbs DJ. Breast cancer global tumor biomarkers: a quality assurance study of intratumoral heterogeneity. *Mod Pathol*. 2019 Mar;32(3):354–66.
17. Liedtke C, Kolberg HC, Kerschke L, Görlich D, Bauerfeind I, Fehm T, et al. Systematic analysis of parameters predicting pathological axillary status (ypN0 vs. ypN+) in patients with breast cancer converting from cN+ to ycN0 through primary systemic therapy (PST). *Clin Exp Metastasis*. 2018 Dec;35(8):777–83.
18. Kitamura M, Nakayama T, Mukaiho KI, Mori T, Umeda T, Moritani S, et al. Progression Potential of Ductal Carcinoma in situ Assessed by Genomic Copy Number Profiling. *Pathobiology*. 2019;86(2-3):92–101.
19. Radovic N, Ivanac G, Divjak E, Biondic I, Bulum A, Brkljacic B. Evaluation of Breast Cancer Morphology Using Diffusion-Weighted and Dynamic Contrast-Enhanced MRI: Intermethod and Interobserver Agreement. *J Magn Reson Imaging*. 2019 May;49(5):1381–90
20. Pediconi F, Marzocca F, Cavallo Marincola B, Napoli A. MRI-guided treatment in the breast. *J Magn Reson Imaging*. 2018 Dec;48(6):1479–88.
21. Watanabe Y, Anan K. The decision to perform or omit sentinel lymph node biopsy during mastectomy for ductal carcinoma in situ should be tailored in accordance with preoperative findings. *Breast Cancer*. 2019 Mar;26(2):261–2.
22. Breast cancer 8th edition
23. Wang X, Xu L, Yin Z, Wang D, Wang Q, Xu K, et al. Locoregional recurrence-associated factors and risk-adapted postmastectomy radiotherapy for breast cancer staged in cT1-2N0-1 after neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Manag Res*. 2018 Oct;10:4105–12.
24. Tang L, Matsushita H, Jingu K. Controversial issues in radiotherapy after breast-conserving surgery for early breast cancer in older patients: a systematic review. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2018 Nov;59(6):789–93.

25. Wu YT, Xu Z, Zhang K, Wu JS, Li X, Arshad B, et al. Efficacy and cardiac safety of the concurrent use of trastuzumab and anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy for HER2-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ther Clin Risk Manag.* 2018 Sep;14:1789–97.
26. Dieci MV, Vernaci G, Guarneri V. Escalation and de-escalation in HER2 positive early breast cancer. *Curr Opin Oncol.* 2019 Jan;31(1):35–42.
27. Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, et al.; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2011 Aug;378(9793):771–84.
28. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, et al.; Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter (ATLAS) Collaborative Group. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial [Erratum in: *Lancet.* 2013 Mar 9;381] [9869] [:804. Erratum in: *Lancet.* 2017 May 13;389] [10082] [:1884. PMID: 23219286; PMCID: PMC3596060]. *Lancet.* 2013 Mar;381(9869):805–16.
29. Reinbolt RE, Mangini N, Hill JL, Levine LB, Dempsey JL, Singaravelu J, et al. Endocrine therapy in breast cancer: the neoadjuvant, adjuvant, and metastatic approach. *Semin Oncol Nurs.* 2015 May;31(2):146–55.
30. Sunderland MC, Osborne CK. Tamoxifen in premenopausal patients with metastatic breast cancer: a review. *J Clin Oncol.* 1991 Jul;9(7):1283–97.
31. Mauri D, Pavlidis N, Polyzos NP, Ioannidis JP. Survival with aromatase inhibitors and inactivators versus standard hormonal therapy in advanced breast cancer: meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Sep;98(18):1285–91.
32. NCIthesaurus. Anhydrous Citic Acid [Internet]. 2021 [updated 2021 Jan 25; cited 2021 Feb 20]. Available from: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C80088
33. Eggemann H, Altmann U, Costa SD, Ignatov A. Survival benefit of tamoxifen and aromatase inhibitor in male and female breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018 Feb;144(2):337–41.
34. Staley H, McCallum I, Bruce J. Postoperative Tamoxifen for ductal carcinoma in situ: cochrane systematic review and meta-analysis. *Breast.* 2014 Oct;23(5):546–51.
35. Sauter ER. Breast Cancer Prevention: Current Approaches and Future Directions. *Eur J Breast Health.* 2018 Apr;14(2):64–71.

36. Drugbank. Tamoxifen [Internet]. 2021 [updated 2021 Feb 19; cited 2021 Feb 20]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00675>
37. Pubchem. Tamoxifen [Internet]. 2021 [updated 2021 Feb 20; cited 2021 Feb 20]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/6782>
38. Lee WL, Cheng MH, Chao HT, Wang PH. The role of selective estrogen receptor modulators on breast cancer: from tamoxifen to raloxifene. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2008 Mar;47(1):24–31.
39. Burstein HJ, Temin S, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, et al. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline focused update. *J Clin Oncol*. 2014 Jul;32(21):2255–69.
40. Bratherton DG, Brown CH, Buchanan R, Hall V, Kingsley Pillers EM, Wheeler TK, et al. A comparison of two doses of tamoxifen (Nolvadex) in postmenopausal women with advanced breast cancer: 10 mg bd versus 20 mg bd. *Br J Cancer*. 1984 Aug;50(2):199–205.
41. Stearns V, Ullmer L, López JF, Smith Y, Isaacs C, Hayes D. Hot flushes. *Lancet*. 2002 Dec;360(9348):1851–61.
42. Day R; National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study (NSABP-1); National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project. Quality of life and tamoxifen in a breast cancer prevention trial: a summary of findings from the NSABP P-1 study. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Dec;949(1):143–50.
43. Jin Y, Hayes DF, Li L, Robarge JD, Skaar TC, Philips S, et al. Estrogen receptor genotypes influence hot flash prevalence and composite score before and after tamoxifen therapy. *J Clin Oncol*. 2008 Dec;26(36):5849–54.
44. Crandall C, Petersen L, Ganz PA, Greendale GA. Association of breast cancer and its therapy with menopause-related symptoms. *Menopause*. 2004 Sep;11(5):519-30.
45. Biglia N, Cozzarella M, Cacciari F, Ponzzone R, Roagna R, Maggiorotto F, et al. Menopause after breast cancer: a survey on breast cancer survivors. *Maturitas*. 2003 May;45(1):29–38.
46. Goetz MP, Rae JM, Suman VJ, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, et al. Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol*. 2005 Dec;23(36):9312–8.

47. Bonanni B, Macis D, Maisonneuve P, Johansson HA, Gucciardo G, Oliviero P, et al. Polymorphism in the CYP2D6 tamoxifen-metabolizing gene influences clinical effect but not hot flashes: data from the Italian Tamoxifen Trial. *J Clin Oncol*. 2006 Aug;24(22):3708–9.
48. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Sep;90(18):1371–88.
49. Cuzick J, Forbes J, Edwards R, Baum M, Cawthorn S, Coates A, et al.; IBIS investigators. First results from the International Breast Cancer Intervention Study (IBIS-I): a randomised prevention trial. *Lancet*. 2002 Sep;360(9336):817–24.
50. Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, et al.; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2011 Aug;378(9793):771–84.
51. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, et al.; Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter (ATLAS) Collaborative Group. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial [Erratum in: *Lancet*. 2013 Mar 9;381] [9869] [:804. Erratum in: *Lancet*. 2017 May 13;389] [10082] [:1884. PMID: 23219286; PMCID: PMC3596060]. *Lancet*. 2013 Mar;381(9869):805–16.
52. Garber JE, Halabi S, Tolaney SM, Kaplan E, Archer L, Atkins JN, et al.; Cancer and Leukemia Group B. Factor V Leiden mutation and thromboembolism risk in women receiving adjuvant tamoxifen for breast cancer [Erratum in: *J Natl Cancer Inst*. 2010 Aug 4;102] [15] [:1210. Paskett, Electra M] [corrected to Paskett, Electra D] [. PMID: 20554945; PMCID: PMC2897879]. *J Natl Cancer Inst*. 2010 Jul;102(13):942–9.
53. Runowicz CD. Gynecologic surveillance of women on tamoxifen: first do no harm. *J Clin Oncol*. 2000 Oct;18(20):3457–8.
54. Hong N, Yoon HG, Seo DH, Park S, Kim SI, Sohn JH, et al. Different patterns in the risk of newly developed fatty liver and lipid changes with tamoxifen versus aromatase inhibitors in postmenopausal women with early breast cancer: A propensity score-matched cohort study. *Eur J Cancer*. 2017 Sep;82:103–14.
55. Yang G, Newshean S, Aziz K, Georgakilas AG. Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. *Pharmacol Ther*. 2013 Sep;139(3):392–404.
56. Mulvenna PM, Wright AJ, Podd TJ. Life-threatening tamoxifen-induced hypercalcaemia. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 1999;11(3):193–5.

57. Antunes MV, Timm TA, de Oliveira V, Staudt DE, Raymundo S, Gössling G, et al. Influence of CYP2D6 and CYP3A4 Phenotypes, Drug Interactions, and Vitamin D Status on Tamoxifen Biotransformation. *Ther Drug Monit.* 2015 Dec;37(6):733–44.
58. Singh HK, Prasad MS, Kandasamy AK, Dharanipragada K. Tamoxifen-induced hypertriglyceridemia causing acute pancreatitis. *J Pharmacol Pharmacother.* 2016 Jan-Mar;7(1):38–40.
59. Givens CB, Bullock LN, Franks AS. Safety of concomitant tamoxifen and warfarin. *Ann Pharmacother.* 2009 Nov;43(11):1867–71.
60. Barthelmes L, Gateley CA. Tamoxifen and pregnancy. *Breast.* 2004 Dec;13(6):446–51.
61. Paganini-Hill A, Clark LJ. Eye problems in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 2000 Mar;60(2):167–72.
62. Pubchem. Boric acid [Internet]. 2021 [updated 2021 Feb 20; cited 2021 Feb 21]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7628>
63. Van Slyke KK, Michel VP, Rein MF. Treatment of vulvovaginal candidiasis with boric acid powder. *Am J Obstet Gynecol.* 1981 Sep;141(2):145–8.
64. Gilman AG, Goodman LS, Gilman A, editors. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 6th ed. New York: Macmillan ; 1980. p. 971.
65. Seiler HG, Sigel H, Sigel A, editors. *Handbook on the Toxicity of Inorganic Compounds.* New York: Marcel Dekker; 1988. p. 135.
66. Krieger R. *Handbook of Pesticide Toxicology.* 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2001. p. 1414.
67. Yenmez N. STRATEJİK BİR MADEN OLARAK BOR MİNERALLERİN TÜRKİYE İÇİN ÖNEMİ. *Coğrafya Dergisi.* 2011; 0(19): 59-94.
68. Scorei R, Ciubar R, Ciofrangeanu CM, Mitran V, Cimpean A, Iordachescu D. Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells. *Biol Trace Elem Res.* 2008 Jun;122(3):197–205.
69. Barranco WT, Eckhert CD. Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Lett.* 2004 Dec;216(1):21–9.
70. Meacham SL, Elwell KE, Ziegler S, Carper SW. Boric Acid Inhibits Cell Growth in Breast and Prostate Cancer Cell Lines. In: Xu F, et al., editors. *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition.* Dordrecht: Springer; 2007. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5382-5_29.
71. Groziak MP. Boron therapeutics on the horizon. *Am J Ther.* 2001 Sep-Oct;8(5):321–8.
72. Yang W, Gao X, Wang B. Boronic acid compounds as potential pharmaceutical agents. *Med Res Rev.* 2003 May;23(3):346–68.

73. Jansen JA, Andersen J, Schou JS. Boric acid single dose pharmacokinetics after intravenous administration to man. *Arch Toxicol*. 1984 Mar;55(1):64–7.
74. Schou JS, Jansen JA, Aggerbeck B. Human pharmacokinetics and safety of boric acid. *Arch Toxicol Suppl*. 1984;7:232–5.
75. Linden CH, Hall AH, Kulig KW, Rumack BH. Acute ingestions of boric acid. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 1986 Jan 1;24(4):269-79.
76. Litovitz TL, Klein-Schwartz W, Oderda GM, Schmitz BF. Clinical manifestations of toxicity in a series of 784 boric acid ingestions. *Am J Emerg Med*. 1988 May;6(3):209–13.
77. Moseman RF. Chemical disposition of boron in animals and humans. *Environ Health Perspect*. 1994 Nov;102 Suppl 7:113–7.
78. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*. 2010 Jan;70(2):440–6.
79. Rondón-Lagos M, Rangel N, Di Cantogno LV, Annaratone L, Castellano I, Russo R, et al. Effect of low doses of estradiol and tamoxifen on breast cancer cell karyotypes. *Endocr Relat Cancer*. 2016 Aug;23(8):635–50.
80. Zheng A, Kallio A, Härkönen P. Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen [Erratum in: *Endocrinology*. 2007 Aug;148] [8] [:3931. PMID: 17363451]. *Endocrinology*. 2007 Jun;148(6):2764–77.
81. Rouhimoghadam M, Safarian S, Carroll JS, Sheibani N, Bidkhorji G. Tamoxifen-induced apoptosis of MCF-7 cells via GPR30/PI3K/MAPKs interactions: verification by ODE modeling and RNA sequencing. *Front Physiol*. 2018 Jul;9:907.
82. Hassan F, Abdul-Hameed A, Alshanon A, Abdullah MB, Huri HZ, Hairunisa N, et al. Antitumor activity for gold (III) complex by high content screening technique (HCS) and cell viability assay. *Asian J Biochem*. 2015;10(6):252–66.
83. Bardon S, Vignon F, Derocq D, Rochefort H. The antiproliferative effect of tamoxifen in breast cancer cells: mediation by the estrogen receptor. *Mol Cell Endocrinol*. 1984 May;35(2-3):89–96.
84. Li W, Shi X, Xu Y, Wan J, Wei S, Zhu R. Tamoxifen promotes apoptosis and inhibits invasion in estrogen-positive breast cancer MCF-7 cells. *Mol Med Rep*. 2017 Jul;16(1):478–84.
85. Motawi TK, Abdelazim SA, Darwish HA, Elbaz EM, Shouman SA. Could Caffeic Acid Phenethyl Ester Expand the Antitumor Effect of Tamoxifen in Breast Carcinoma? *Nutr Cancer*. 2016;68(3):435–45.

86. Barranco WT, Eckhert CD. Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells. *Br J Cancer*. 2006 Mar;94(6):884–90.
87. Hacıoğlu C, Kar F, Kacar S, Sahintürk V, Kanbak G. High concentrations of boric acid trigger concentration-dependent oxidative stress, apoptotic pathways and morphological alterations in DU-145 human prostate cancer cell line. *Biol Trace Elem Res*. 2020 Feb;193(2):400–9.
88. Cigel A, Bilgin MD, Ek RO. Evaluation of the Anti-cancer and Biological Effects of Boric Acid on Colon Cancer Cell Line/Kolon Kanseri Hücrelerinde Borik Asidin Anti-kanser ve Biyolojik Etkilerinin Değerlendirilmesi. *Meandros Medical and Dental Journal*. 2020;21(3):238–44.
89. El-Hefny IM, Al Senosy NK, Hozayen WG, Ahmed AE, Diab A, Basal WT. Evaluation of the Cytotoxicity and Apoptotic Induction in Human Liver Cell Lines Exposed to Three Food Additives. *Recent Pat Food Nutr Agric*. 2020;11(3):193–201.
90. Bayrak AO. İnsan meme kanseri mcf-7 hücrelerinde borun genotoksik ve anjiogenik etkilerinin araştırılması [thesis]. Uşak:Uşak üniversitesi; 2020. 37 p.
91. Gakhar G, Hua DH, Nguyen TA. Combinational treatment of gap junctional activator and tamoxifen in breast cancer cells. *Anticancer Drugs*. 2010 Jan;21(1):77–88.
92. Khamis AA, Ali EM, El-Moneim MA, Abd-Alhaseeb MM, El-Magd MA, Salim EI. Hesperidin, piperine and bee venom synergistically potentiate the anticancer effect of tamoxifen against breast cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2018 Sep;105:1335–43.
93. Khazaei M, Pazhouhi M. Antiproliferative Effect of *Trifolium Pratens L.* Extract in Human Breast Cancer Cells. *Nutr Cancer*. 2019;71(1):128–40.
94. Darakhshan S, Ghanbari A, Gholami Rad F, Bidmeshki Pour A. Tamoxifen and tranilast show a synergistic effect against breast cancer in vitro. *Bratisl Lek Listy*. 2015;116(1):69–73.
95. Lee SJ, Jeong JH, Lee IH, Lee J, Jung JH, Park HY, et al. Effect of high-dose vitamin C combined with anti-cancer treatment on breast cancer cells. *Anticancer Res*. 2019 Feb;39(2):751–8.
96. Mannal P, McDonald D, McFadden D. Pterostilbene and tamoxifen show an additive effect against breast cancer in vitro. *Am J Surg*. 2010 Nov;200(5):577–80.