



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

BOR VE KEMOTERAPATİKLERLE OLUŞTURULAN KOMBİNASYONUN MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDE IN VITRO ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Recep ERGÜN

DANIŞMAN

Doç. Dr. Muzaffer Başak TUNALI

II. DANIŞMAN

Doç. Dr. Gül İpek GÜNDOĞAN

Veterinerlik Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Veterinerlik Histoloji ve Embriyoloji Programı

Nisan, 2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Recep ERGÜN tarafından, **Doç. Dr. Muzaffer Başak TUNALI** danışmanlığında hazırlanan **BOR VE KEMOTERAPATİKLERLE OLUŞTURULAN KOMBİNASYONUN MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDE IN VITRO ETKİSİNİN BELİRLENMESİ** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **25/04/2023** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi		İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Doç. Dr. Muzaffer Başak TUNALI		☐
	İstanbul-Cerrahpaşa Üniversitesi		Kabul ☐
	Veterinerlik - Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı		Ret
ÜYE	Prof. Dr. Abit AKTAŞ		☐
	İstanbul-Cerrahpaşa Üniversitesi		Kabul ☐
	Veterinerlik - Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı		Ret
ÜYE	Prof. Dr. H. Hakan BOZKURT		☐
	Gelişim Üniversitesi		Kabul ☐
	Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı		Ret

YEDEK	Doç. Dr. İlknur KESKİN	☐
ÜYE	Medipol Üniversitesi	Kabul
	Histoloji ve Embriyoloji	☐
	Anabilim Dalı	Ret
YEDEK	Doç. Dr. Funda YİĞİT	☐
ÜYE	İstanbul-Cerrahpaşa	Kabul
	Üniversitesi	☐
	Veterinerlik - Histoloji ve	Ret
	Embriyoloji Anabilim Dalı	



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Recep ERGÜN

Bu çalışmayı tüm kanser çalışmalarında bulunan bilim insanlarına ve kanser dolayısıyla vefat eden insanlara ithaf ediyorum...

BÜTÇE DESTEKLERİ

BOR VE KEMOTERAPATİKLERLE OLUŞTURULAN KOMBİNASYONUN MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDE IN VITRO ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TYL-2018-32997

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması TYL-2018-32997 numaralı proje ile İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa BAP Birimi tarafından desteklenmiştir.

Yüksek Lisans eğitimim süresince bana her türlü desteği esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. M. Başak Tunalı'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın ilk aşamalarını yapmış olduğum İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi altyapısını kullanabilmemizi sağlayan eş danışmanım Sayın Doç. Dr. Gül İpek Gündoğan'a çok teşekkür ederim.

MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinin temininde bizlere destek olan Yeditepe Üniversitesi'nden Sayın Prof. Dr. Fikrettin Şahin'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın son aşamalarını yapmış olduğum Gebze Teknik Üniversitesi altyapısını kullanabilmemizi sağlayan Sayın Prof. Dr. Uygur Halis Tazebay'a çok teşekkür ederim.

Her zaman olduğu gibi tez dönemimde de bana her türlü desteğini sunan sevgili eşim Esma Ergün'e çok teşekkür ederim.

Nisan 2023

Recep ERGÜN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI	ii
BEYAN	iv
BÜTÇE DESTEKLERİ	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ.....	xv
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xvi
ÖZET	xviii
ABSTRACT	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	3
2.1. MEME KANSERİ	3
2.2. MEME KANSERİNİN OLUŞUMU	3
2.3. MEME KANSERİNİN HETEROJENLİĞİ	4
2.4. MEME KANSERİNİN SINIFLANDIRILMASI	5
2.5. MEME KANSERİNİN TEDAVİSİ.....	5
2.5.1. Meme Kanserinin Tedavisinde Kullanılan Kemoteropatik İlaçlar	6
2.5.1.1. Doksorubisin (DOX).....	6
2.5.1.2. Docetaksiel (DOC)	6
2.6. BOR	8
2.6.1. Fenilboronik asit (C ₆ H ₇ BO ₂) (PBA)	11
2.7. HÜCRE HATLARI	12
2.7.1. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı.....	12
2.7.2. MCF 10A Meme Hücre Hattı.....	13
3. YÖNTEM	14
3.1. HÜCRELERİN TEMİNİ	14
3.2. HÜCRE BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI.....	14

3.3. ÇALIŞMA KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI	14
3.4. ÇALIŞMA GRUPLARININ BELİRLENMESİ	15
3.5. HÜCRE KÜLTÜRÜ	16
3.6. HÜCRELERİN PASAJLANMASI	17
3.7. HÜCRELERİN SAYIMI	18
3.8. HÜCRELERİN DONDURULMASI.....	18
3.9. HÜCRELERİN ÇALIŞMA KÜLTÜR PETRİLERİNE EKİLMESİ	19
3.10. WST-1 TESTİ İLE HÜCRE CANLILIĞININ SAPTANMASI	19
3.11. APOPTOZUN TESPİT EDİLMESİ	20
3.12. HÜCRELERDEKİ OKSİDATİF STRES (ROS) DÜZEYİNİN SAPTANMASI.....	20
3.13. HÜCRE MİGRASYONUNUN ÖLÇÜLMESİ	21
3.14. SONUÇLARIN ANALİZ EDİLMESİ	22
4. BULGULAR	23
4.1. WST-1 TESTİ İLE HÜCRE CANLILIĞININ SAPTANMASI	23
4.1.1. 1. gün (24. saat) WST-1 Test sonuçları.....	23
4.1.2. 2. gün (48. saat) WST-1 Test sonuçları.....	26
4.1.3. 4. gün (96. saat) WST-1 Test sonuçları.....	29
4.1.4. 7. gün (168. saat) WST-1 Test sonuçları.....	32
4.2. APOPTOZ SONUÇLARI.....	37
4.3. HÜCRELERDEKİ OKSİDATİF STRES (ROS) DÜZEYİNİN SAPTANMASI.....	41
4.3.1. 1. gün (24. saat) ROS Test sonuçları.....	42
4.3.2. 2. gün (48. saat) ROS Test sonuçları.....	45
4.3.3. 4. gün (96. saat) ROS Test sonuçları.....	49
4.3.4. 7. gün (168. saat) ROS Test sonuçları.....	52
4.4. HÜCRE MİGRASYONU SONUÇLARI	56
5. TARTIŞMA.....	68
5.1. CANLILIK.....	68
5.2. APOPTOZ	71
5.3. ROS DÜZEYİ.....	73
5.4. HÜCRE MİGRASYONU	74
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR.....	76
EKLER.....	84
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	85

ETİK KURUL İZİN YAZISIHata! Yer işareti tanımlanmamış.
KURUM İZNİ YAZILARI.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1: Doksorubisin'in Kimyasal Yapısı [36].	6
Şekil 2: Docetaxel (üstte) ve Paklitaksel (altta) Kimyasal Yapıları [44].	8
Şekil 3: PBA'nın kimyasal yapısı [59].	11
Şekil 4: MCF7 Hücre Hattının Mikroskoptaki Görüntüsü (Büyütme: 10X).....	16
Şekil 5: MCF10A Hücre Hattının Mikroskoptaki Görüntüsü (Büyütme: 10X).....	17
Şekil 6: Neubauer Lamı Sayım Alanları.....	18
Şekil 7: 1. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri	23
Şekil 8: 1. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri.....	24
Şekil 9: 1. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri.....	25
Şekil 10: 2. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri	26
Şekil 11: 2. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri.....	27
Şekil 12: 2. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri.....	28
Şekil 13: 4. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri	29
Şekil 14: 4. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri.....	30
Şekil 15: 4. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri.....	31
Şekil 16: 7. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri	33

Şekil 17: 7. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri.....	34
Şekil 18: 7. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri.....	35
Şekil 19: MCF7 hücrelerinde kontrol grubu ile en yüksek apoptoz oranına sahip olan 10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX kombinasyonunun sonuçları	37
Şekil 20: MCF7 Hücrelerinde Dozlara Göre Apoptoz Yüzde % Oran Değişimleri	38
Şekil 21: MCF10A hücrelerinde kontrol grubu ile en yüksek apoptoz oranına sahip olan 10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX kombinasyonunun sonuçları.....	39
Şekil 22: MCF10A Hücrelerinde Dozlara Göre Apoptoz Yüzde % Oran Değişimleri	40
Şekil 23: 1. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri	42
Şekil 24: 1. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri	43
Şekil 25: 1. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri	44
Şekil 26: 2. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri	45
Şekil 27: 2. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri	46
Şekil 28: 2. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri	48
Şekil 29: 4. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri	49
Şekil 30: 4. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri	50
Şekil 31: 4. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri	51
Şekil 32: 7. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri	52

Şekil 33: 7. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri	53
Şekil 34: 7. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri	55
Şekil 35: MCF7 kontrol hücrelerinin 0. gün (A) ve 4. gün (B) yara kapanma sonuçları (Büyütme: 10X).....	57
Şekil 36: 1 mM PBA dozu kullanılan MCF7 hücrelerinin 0. gün (A) ve 4. gün (B) yara kapanma sonuçları (Büyütme: 10X).....	57
Şekil 37: 10 mM PBA dozu kullanılan MCF7 hücrelerinin 0. gün (A) ve 7. gün (B) yara kapanma sonuçları (Büyütme: 10X).....	58
Şekil 38: 7. gün sonunda 10 nM DOC (A), 100 nM DOC (B), 100 nM DOX (C), 1000 nM DOX (D) doza sahip MCF7 hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X).....	58
Şekil 39: 7. gün sonunda 1 mM PBA + 10 nM DOC (A), 1 mM PBA + 100 nM DOC (B), 10 mM PBA + 10 nM DOC (C), 10 mM PBA + 100 nM DOC (D) doza sahip MCF7 hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X).....	59
Şekil 40: 7. gün sonunda 1 mM PBA + 100 nM DOX (A), 1 mM PBA + 1000 nM DOX (B), 10 mM PBA + 100 nM DOX (C), 10 mM PBA + 1000 nM DOX (D) doza sahip MCF7 hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X).....	59
Şekil 41: 7. gün sonunda 1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX (A), 1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX (B), 1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX (C), 1 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX (D) doza sahip MCF7 hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X).....	60
Şekil 42: 7. gün sonunda 10 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX (A), 10 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX (B), 10 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX (C), 10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX (D) doza sahip MCF7 hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X).....	60
Şekil 43: MCF7 Grup 1 Hücrelerinin Hücre Migrasyonu	61
Şekil 44: MCF7 Grup 2 Hücrelerinin Hücre Migrasyonu	61
Şekil 45: MCF7 Grup 3 Hücrelerinin Hücre Migrasyonu	62
Şekil 46: MCF10A kontrol hücrelerinin 0. gün (A) ve 7. gün (B) yara kapanma sonuçları (Büyütme: 10X).....	63
Şekil 47: 10 nM DOC dozu içeren MCF10A hücrelerinin 0. gün (A) ve 7. gün (B) yara kapanma sonuçları (Büyütme: 10X).....	63

Şekil 48: 100 nM DOX dozu içeren MCF10A hücrelerinin 0. gün (A) ve 7. gün (B) yara kapanma sonuçları (Büyütme: 10X).....	63
Şekil 49: 7. gün sonunda 1 mM PBA (A), 10 mM PBA (B), 100 nM DOC (C), 1000 nM DOX (D) doza sahip MCF10A hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X).....	64
Şekil 50: 7. gün sonunda 1 mM PBA + 10 nM DOC (A), 1 mM PBA + 100 nM DOC (B), 10 mM PBA + 10 nM DOC (C), 10 mM PBA + 100 nM DOC (D) doza sahip MCF10A hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X).....	64
Şekil 51: 7. gün sonunda 1 mM PBA + 100 nM DOX (A), 1 mM PBA + 1000 nM DOX (B), 10 mM PBA + 100 nM DOX (C), 10 mM PBA + 1000 nM DOX (D) doza sahip MCF10A hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X).....	65
Şekil 52: 7. gün sonunda 1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX (A), 1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX (B), 1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX (C), 1 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX (D) doza sahip MCF10A hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X).....	65
Şekil 53: 7. gün sonunda 10 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX (A), 10 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX (B), 10 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX (C), 10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX (D) doza sahip MCF10A hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X).....	66
Şekil 54: MCF10A Grup 1 Hücrelerinin Hücre Migrasyonu	66
Şekil 55: MCF10A Grup 2 Hücrelerinin Hücre Migrasyonu	67
Şekil 56: MCF10A Grup 3 Hücrelerinin Hücre Migrasyonu	67

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1: Çalışma Grupları ve Doz İçerikleri	15
Tablo 2: 1. gün (24 saat), 2. gün (48 saat), 4. gün (96 saat), 7. gün (168 saat) sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarının, PBA+DOC, PBA+DOX ve PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 analizi ile değerlendirilmesi.....	36
Tablo 3: MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarının, PBA+DOC, PBA+DOX ve PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen canlılık, apoptotik ve nekrotik hücre yüzdelerinin apoptoz testi ile değerlendirilmesi.....	41
Tablo 4: 1. gün (24 saat), 2. gün (48 saat), 4. gün (96 saat), 7. gün (168 saat) sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarının, PBA+DOC, PBA+DOX ve PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen kontrole göre DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testinin katlı sonuçları.....	56

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
B	: Bor Element Simgesi

Kisaltmalar	Açıklama
BA	: Borik Asit
BRCA1	: Meme Kanseı Tip 1 Duyarlılık Proteini
BRCA2	: Meme Kanseri Tip 2 Duyarlılık Proteini
DCFDA	: 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate
DCIS	: Duktal Karsinoma In Situ
DOC	: Docetaxel
DOX	: Doksorubisin
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DU-145	: Metastatik Prostat Kanseri Hücreleri
ER	: Östrojen Reseptörü
FBS	: Fetal Sığır Serumı
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HDACi	: Histon Deasetilaz İnhibitörü
hs-CRP	: Yüksek Duyarlı C-Reaktif Protein
IDC	: İnvaziv Duktal Karsinom
ILC	: İnvaziv Lobüler Karsinom
LCIS	: Lobüler Karsinom In Situ
MCF-7	: İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
MCF-10A	: İnsan Sağlıklı Meme Hücre Hattı
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinüklotit
PBA	: Fenilboronik Asit
PBS	: Fosfat Tamponu
PC-3	: İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı
p53	: Tümör Protein 53
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri

SK-BR-3	: İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TG2	: Transglütaminaz 2
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör Alfa
TNM	: Tümör, Nod, Metastaz Evrelemesi
WST-1	: Suda Çözünen Formazan 1
ZR-75-1	: İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BOR VE KEMOTERAPATİKLERLE OLUŞTURULAN KOMBİNASYONUN MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDE IN VITRO ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Recep ERGÜN

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Veterinerlik Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Veterinerlik Histoloji ve Embriyoloji Programı

Danışman : Doç. Dr. M. Başak TUNALI

II. Danışman : Doç. Dr. Gül İpek GÜNDOĞAN

Fenilboronik asit, serin proteaz inhibitörleri olarak hareket eden en etkili boronik asit türevidir. Kanser hücreleri üzerinde seçici bir anti-migrasyon oluşturması ve apoptozisi indüklemesi ile kanser tedavisi için umut verici bir aday olmasını sağlamaktadır. Meme kanseri tedavisinde etkin bir şekilde doksorubisin ve docetaksel kullanılmaktadır. Doksorubisin ve docetakseli, fenilboronik asitle kombine ederek meme kanseri tedavisinde potansiyel doz kombinasyonlarının anti-kanserojenik etkilerini arttırması hedeflenmiştir.

Çalışmamızda 1 mM ve 10 mM PBA, 10 nM DOC ve 100 nM DOC, 100 nM DOX ve 1000 nM DOX dozları kullanılmış olup, tüm dozlar tekil olarak, PBA+DOC ve PBA+DOX ikili ve PBA+DOC+DOX üçlü doz kombinasyon grupları uygulanmıştır. Bu uygulamalar hücre kültürü çalışmaları ile MCF7 ve MCF10A hücrelerinde, WST-1 ile proliferasyon testi kullanılarak hücre canlılığı, scratch assay yöntemi ile hücre migrasyon hızları, DCF-DA ROS testi ile hücrelerdeki oksidatif stres düzeyleri, anneksin V ve PI ile apoptoz analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızın sonunda uyguladığımız tüm kombine dozlar içerisindeki 10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX dozu birbirinin etkilerini artırarak anti-kanserojenik özellik gösterdiğini analiz sonuçlarında göstermiş bulunmaktayız.

Nisan 2023 , 107 sayfa.

Anahtar kelimeler: Fenilboronik asit, Docetaksel, Doksorubisin, Meme Kanseri

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

**DETERMINATION OF IN VITRO EFFECTS OF COMBINATION WITH BORON
AND CHEMOTHERAPATICS ON BREAST CANCER CELLS**

Recep ERGÜN

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Veterinary Department of Histology and Embryology

Veterinary Histology and Embryology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. M. Başak TUNALI

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gül İpek GÜNDOĞAN

Phenylboronic acid is the most effective derivative of boronic acid, acting as serine protease inhibitors. It is a promising candidate for cancer therapy, with selective anti-migration and induction of apoptosis on cancer cells. Doxorubicin and docetaxel are used effectively in the treatment of breast cancer. It is aimed to increase the anti-carcinogenic effects of potential dose combinations in the treatment of breast cancer with combining doxorubicin and docetaxel with phenylboronic acid

In our study, 1 mM PBA, 10 mM PBA, 10 nM DOC, 100 nM DOC, 100 nM DOX, 1000 nM DOX doses were selected and then all these doses were used individually, PBA+DOC and PBA+DOX double and PBA+DOC+DOX triple dose combination groups at cell culture. Cell culture studies with MCF7 and MCF10A cells, cell viability studies using the proliferation test with WST-1, cell migration rates with the scratch assay method, oxidative stress levels in the cells with the DCF-DA ROS test, apoptosis analyzes with annexin V and PI were performed in our study with these doses and combinations.

We showed that 10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX dose was increased the effects of each components and showed higher anti-carcinogenic effect than other doses and groups in our study.

April 2023, 107 pages.

Keywords: Phenylboronic acid, Docetaxel, Doxorubicin, Breast Cancer,

1. GİRİŞ

Meme kanseri, her yıl tahminen bir buçuk milyon yeni vaka ve yılda yaklaşık yarım milyon ölümlle sonuçlanan, dünya çapında kadınlarda en sık teşhis edilen bir kanser türüdür [1]. Her yıl dokuz kadından biri meme kanserine yakalanmaktadır [2]. Dünya kanser istatistiklerini işleyen Globocan'ın 2020 yılı verilerine göre dünyada tüm kanser vakalarının %11,7'si ile meme kanseri en yüksek orana sahip kanser tipidir. Kadınlarda, %24,5'lik oranında görülen meme kanseri birinci sıradaki kanser tipini oluşturur. Aynı yıl içerisinde kanser tanısı konulan vakalarda meme kanseri %6,9 ölüm oranına sahiptir. Türkiye tüm kanser vakalarının %10,3'ü ile meme kanseri, akciğer kanserinden sonra ikinci en yüksek orana sahip kanser tipi olmuştur [3]. Meme kanseri klinik olarak heterojen bir kanser tipidir. Kanser hastalarında, genelde birincil bölgedeki tümörlerden ziyade metastazlar sonucu oluşan tümörler ölüme neden olmaktadır. Meme kanserine sahip olan hastaların yaklaşık %10-15'i agresif tipe sahiptir, dolayısıyla ilk tanının konulmasından itibaren 10 yıl veya daha uzun yıllar sonra bile farklı organlarda metastazların ortaya çıkması olasıdır. Meme kanseri metastatik olarak kemik, akciğer ve karaciğer dokularında yayılma göstermektedir [4].

Fenilboronik asitin (PBA) yüksek stabilite, düşük bağışıklık tepkisi ve kolay kimyasal modifikasyon avantajlarına sahip olmasından dolayı fonksiyonel hale getirilerek oluşturulan malzemeler biyolojik alanda çok farklı kullanım alanlarına sahiptir [5]. PBA BA'dan daha güçlü ve seçici bir hücre göçü, canlılık inhibitörü olduğu ortaya konulmuştur, bundan dolayı kanser tedavisi için umut verici yeni bir aday olarak düşünülmektedir [6].

Doksorubisinin (DOX) etki mekanizması, ilacın DNA baz çiftlerinin içine araya girerek DNA zincirlerinin kırılmasına ve sentez inhibisyonuna sebep olarak çalışmaktadır [7]. Dosetakselin (DOC) etki mekanizması, hücre döngüsünü durdurarak proliferasyonunu arttırarak çalışmaktadır [8].

Kemoterapötiklerin kanser tedavisinin oluşturduğu yan etkilere karşı alternatif bir tedavi yöntemine öncü olması amacıyla bu çalışma planlandı. PBA'nın meme kanseri hücresi hattı (MCF7) ve sağlıklı hücre hattı (MCF10A) üzerindeki hücre proliferasyon etkisi daha düşük dozlardaki kemoterapötik ilaçların etkileriyle birleştirilerek sinerjik bir etki oluşması

amaçlandı. Bu doğrultuda DOC ve DOX'un PBA ile hem ikili hem de üçlü doz kombinasyonları oluşturarak etkilerinin tespiti için analizler yapılmıştır.

Çalışmamızın özgün değeri olan PBA'nın kanser tedavisinde etkin olarak kullanılan anti-kanserojenik ilaçların etkisini in-vitro modelde artırdığını kantitatif olarak gösteren ilk çalışmadır. Uyguladığımız kombinasyon dozları, daha sonra yapılacak çalışmalara anti-kanserojen hücre moleküler mekanizmalarına katkı sağlaması düşünülmektedir.



2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. MEME KANSERİ

Karsinomu tanımlamak için, ilk olarak M.Ö. 460-370 yıllarında yaşamış olan Hipokrat tarafından, Yunanca'da yengeç anlamındaki “karkinos” terimini kullanmıştır. Kanser vakalarının ilk kayıtları, M.Ö. 1600 yıllarında Mısır'daki el yazmalarında bulunmuştur. Yazıtlara göre M.Ö. 1500'lerde meme kanseri vakalarının olduğu, tedavisinin olmadığı ve tümörlerin günümüzde olduğu gibi cerrahi yöntemle çıkarıldığı belirtilmiştir [9].

Meme kanserine sebep olan birçok iç ve dış faktörler vardır. İlerleyen yaşlarda doğum yapma, erken menarş, menopozda veya sonrasında hormon tedavisi, tütün kullanımı veya çok fazla tütün dumanına maruz kalma, alkol kullanımı, yağlı beslenme, dış etkenlerden bazılarıdır. Aile kanser geçmişi ve genetik yatkınlıklar ise iç etkenlerden en önemlileridir [10, 11, 12]. Östrojen ve progesteron hormonlarının, meme hücresi bölünme oranı üzerinde etkisi olduğu kanıtlanmıştır. Bu da kadınlarda meme kanserinin yüksek oranda görülmesini açıklamaktadır (meme kanserinin %99'u kadınlarda görülür). Ayrıca BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonlarına sahip olan kişilerin hayatları boyunca meme kanserine yakalanma riskinin yüksek olduğu tespit edilmiştir [13].

2.2. MEME KANSERİNİN OLUŞUMU

Meme kanseri tipi, tümörün şekillendiği hücreler tarafından belirlenir. Meme epitel hücrelerinde geliştiğinde, bu tip tümöre karsinom denir. Primer tümör ayrıca kas, yağ veya bağ dokuları gibi diğer dokulardan gelen hücrelerde başlarsa, bu tip tümörlere sarkomlar, filloidler, paget hastalığı ve anjiyosarkomlar denir ancak daha az sıklıkta görülürler [14].

Meme kanseri, glandüler süt kanallarının epitel hücrelerinden veya meme lobüllerinden kaynaklanırsa malign bir tümördür [15]. Bir meme kanseri hücresi anormal bir bölünme sırasında üç farklı aşamadan geçer. Bu aşamalar enfeksiyon yoğunluğuna göre belirlenir. Aşama-1'de hücreler normal meme hücreleri gibi görünürler ve genellikle yavaş büyürler. Aşama-2'de normal hücrelerden biraz farklı görünürler ve Aşama-1'e göre daha

hızlı büyürler. Aşama 3'te normal meme hücrelerinden tamamen farklı yapıdadırlar ve genellikle diğer aşamalardan çok daha hızlı büyürler [16].

Meme kanserlerinin çoğunluğu süt kanallarında ortaya çıkar ve duktal karsinom olarak adlandırılırlar [16]. Meme kanserinin yaklaşık üçte ikisi duktal karsinom olarak görülmektedir [17]. Duktal karsinom herhangi bir belirleyici semptom göstermediği için meme muayenesi veya mamografisine kadar tespit edilmesi zordur. Bazen meme kanseri süt üreten bölgede yani, lobüllerde de ortaya çıkabilir, bu kanser tipine lobüler karsinom adı verilmektedir [18]. Meme kanserinin yaklaşık üçte biri lobüler karsinom olarak görülmektedir [17]. Her ikisi de çevre dokulara ve diğer organlara kan dolaşımı ve lenf düğümleri yoluyla metastaz yapabilir [19].

2.3. MEME KANSERİNİN HETEROJENLİĞİ

Meme kanseri tek başına bir hastalık değildir. Moleküler düzeyde, histopatolojik ve klinik düzeyde heterojenlik gösteren ayrıca hastadan hastaya çok farklı klinik seyiri ve tedavi yanıtları oluşturan bir hastalıklar topluluğudur. Meme kanserinin heterojen yapısı iki farklı düzeyde gösterilmektedir. Aynı organ içinde farklı histolojik alt tiplerine sahip tümörler, patologlar tarafından kanser heterojenliği olarak tanımlanmıştır. Tümör örnekleri genellikle morfolojik düzeyde heterojendir ve farklı hücre tiplerini ve farklı bölgeler arasında değişken bir stromal bileşimi içerir [20].

Farklı hastaların, farklı genetik ve fenotipik profillere sahip tümörleri olduğu ve aynı hastada genetik heterojenliğin sergilendiği bir intratümör heterojenliği olduğu gözlemlenmiştir [20, 21].

Meme tümörlerinin hücresel ve moleküler heterojenliği ve hücre büyümesini, ölümünü ve farklılaşmasını kontrol etmede potansiyel olarak rol oynayan çok sayıda gen, uyum içinde çoklu genetik değişikliklerin incelenmesinin önemini vurgulanmaktadır. cDNA mikrodizileri kullanılarak tümörlerde binlerce genin ekspresyon paternlerinin sistematik olarak araştırılması ve bunların fenotipik varyasyonun spesifik özellikleriyle korelasyonu, kanserin gelişmiş bir taksonomisine temel oluşturabilir [21].

Bu tümörlerin farklı heterojen seviye göstermeleri ve tedavi sürecinde üstesinden gelinmesini zorlaştıran biyolojik davranışlarına yol açar. Ayrıca bu tür heterojenlikten dolayı meme kanserinde geleneksel tedaviye olan direnç en büyük klinik problemlerin başındadır [22].

2.4. MEME KANSERİNİN SINIFLANDIRILMASI

Meme kanseri ilk olarak fiziksel muayene ile ardından mamogram, ultrason ve doku biyopsisi gibi çeşitli teknikler ile teşhis edilebilir. Meme biyopsisi ile şüpheli bölgeden doku veya sıvı alınarak yapılmaktadır ve yapılacak olan testler ile şüpheli bölgenin kanser olup olmadığı kesin olarak belirlenebilmektedir [23].

Meme kanserinin heterojenliğinden dolayı bu tümörler temel olarak dört farklı parametreye göre sınıflandırılmışlardır. Duktal karsinom in situ (DCIS), çevreleyen dokuyu istila etmeden meme kanallarının lümeninde biriken malign hücrelerin proliferasyonu ile açıklanır [22, 23]. DCIS çoğunlukla meme kanserlerde en çok görülen ve alt tipi olan invaziv duktal karsinom (IDC) tipinin öncüsü olarak kabul edilmektedir. IDC, metastatik yayılımın ilk adımı olan stromal dokuda ve ayrıca çevre dokularda kanser hücrelerinin infiltrasyonu ile açıklanır [24, 25, 26].

Meme kanserinin derecesi patoloğlar tarafından histopatolojik parametrelere dayalı olarak tanımlanır ve tümörün agresifliğini açıklar. Lüminal ve duktal epitel hücreler morfolojik yapıları ile hücre çekirdekleri tekdüzeliklerini kaybederler ve kontrolsüz bölünmeye başlarlar [27]. Meme kanserinin evresi, diğer tümörlerde olduğu gibi tümör, nodül, metastaz (TNM) sınıflandırması kullanılarak belirlenir. Tümör boyutu (T1 ila T4), lenf düğümlerinin tutulumu (N0 ila N3) ve metastaz varlığı (M0 veya M1) ile hesaplanır [28].

2.5. MEME KANSERİNİN TEDAVİSİ

Meme kanserinin tedavisine yönelik çeşitli bilimsel yollar kabul edilerek seçenekler oluşturulmuştur. Kanser dokusunun ciddiyeti ve yoğunluğuna bağlı olarak, kanserli dokunun ve bu doku çevresinde bulunan bir miktar temiz dokunun da alındığı lumpektomi veya tüm memenin alındığı mastektomi olmak üzere çeşitli cerrahi tedavi seçenekleri mevcuttur [29].

Kemoterapi bir diğer tedavi seçeneğidir. Bu tedavide kanser hücrelerini öldürmek veya bölünmelerini durdurmak için antikanserojen ilaçlar kullanılır [30]. Ayrıca cerrahi tedavilerden sonra vücutta kalan kanserli hücreler için radyasyon tedavisi bazen kemoterapi ile birlikte verilir. Yüksek radyasyon ışınları kanserli hücrelerin ölümünü sağlar ve büyümelerini durdurur [31]. Yapılan tüm kanser tedavilerinden sonra hormon tedavisi yapılması ile hormona duyarlı olan meme kanseri hastalarında meme kanseri gelişme riskini

azaltır ve ayrıca hormona duyarlı tümörleri olan hastalarda da metastatik meme kanserinin büyüme ve ilerleme riskini etkili bir şekilde azaltabilir [32].

2.5.1. Meme Kanserinin Tedavisinde Kullanılan Kemoteropatik İlaçlar

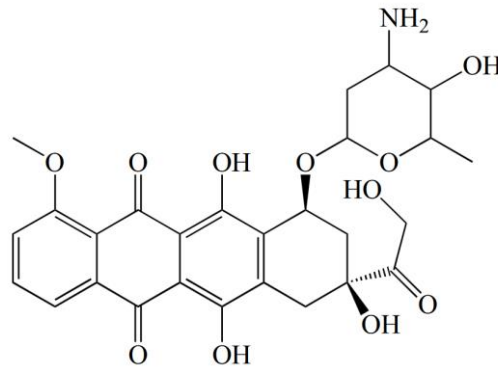
2.5.1.1. Doksorubisin (DOX)

DOX *Streptomyces peucetius* var. *caesius* bakterisinden izole edilen bir antrasiklin antibiyotiktir. DOX'un suda ve sulu alkollerde çözünen bir ilaç olup polar olmayan organik çözücülerde çözünmemektedir [33]. DOX, genel olarak meme kanserinin tedavisinde en aktif tek ajan olarak kabul edilmektedir [34, 35]. Ayrıca, DOX yumurtalık, mesane ve akciğer karsinomlarına karşı da etki göstermektedir. DOX, DNA enterkalasyonu, serbest radikalleri açığa çıkarmak, ya da topoizomerez inhibisyonu yoluyla hücre ölümünü indükleyerek etki gösterir [35, 36].

Antrasiklinler reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olabilir ve hücrelerde serbest radikal hasarı oluşturarak ilacın antitümör aktivitesine katkıda bulunurlar [37].

DOX'un kanser hücrelerine basit bir difüzyonla girip sitoplazmada bulunan proteazoma yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Daha sonra 20S proteazomal alt birimine bağlanarak, bir DOX proteazom kompleksi oluşturur ve DOX proteazomdan ayrışarak proteazomdan daha yüksek afiniteye sahip olarak DNA'ya bağlanır [36].

DOX'un klinik uygulamalarında tümör hücrelerindeki direnç gelişimi veya sağlıklı dokulardaki toksisitede ciddi sorunlar oluşturmaktadır [36].



Şekil 1: Doksorubisin'in Kimyasal Yapısı [36].

2.5.1.2. Docetaksel (DOC)

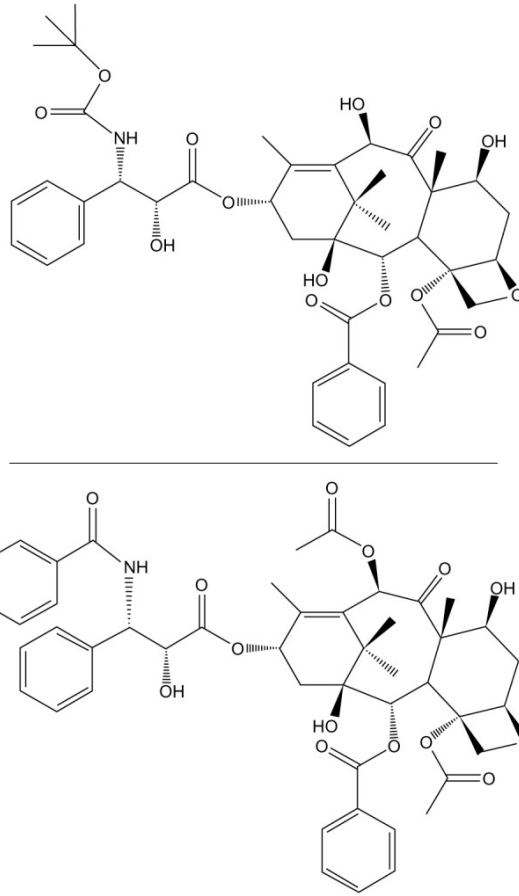
Taksan ilaçları paklitaksel (Taxol®) ve yarı sentetik türevi olan docetaxel (Taxotere®) olarak meme kanserinin tedavisinde kritik öneme sahip anti-mikrotübül ilaçlardır. Diğer

mikrotübül ilaçların aksine, β -tubulin alt birimlerine bağlanarak, serbest tübülün ve mikrotübüller arasındaki dengeyi demontaj yerine montaj yönünde kaydırarak bozar [38, 39].

Docetaxel ((2R,3S)-N-carboxy-3-phenylisoserine, N-tert-butyl ester, 13-ester with 5, 20-epoxy-1, 2, 4, 7, 10, 13-hexahydroxytax-11-en-9-one 4-acetate 2-benzoate, trihydrate) nadir bir Pasifik porsuk ağacı olan *Taxus brevifolia*'dan ekstrakt edilen ve paklitakselin yarı sentetik bir tipidir. Docetaxel paklitakselden kimyasal yapısında bulunan karbon 10'daki fonksiyonel grup değişikliği ile docetaxel paklitakselden daha fazla suda çözünür [40].

Paklitaksel ve docetaksel gibi taksan ilaçları, meme kanserli hastaların tedavisinde kritik olarak önemli antimikrotübül ilaçlar olarak kullanılmaktadır. Taksan tedavisi, mikrotübüllerin anormal mikrotübül demetlerinin oluşumuna yol açan depolimerizasyona karşı stabilizasyonuna neden olur. Anormal demetler fizyolojik parçalanmaya direnir, tümör hücrelerinde birikerek hücre proliferasyonunu inhibe eder. G2 / M evresinde hücre döngüsü tutulmasına, apoptozise, sitotoksositeye ve sonuçta hücre ölümüne yol açar [39, 40].

Docetaxel 1996 yılında Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından meme kanseri tedavisinde kullanım için onaylanmıştır. Böylelikle günümüze kadar docetaxel içeren tedavilerde önemli sonuçlar alınmıştır [41]. İleri evre meme kanserli hastalarda, DOC ve DOX'un tek ajan olarak en büyük aktiviteye sahiptir [34, 39, 42]. İn vitro ve in vivo olarak DOC çok çeşitli kanser hücrelerine karşı antineoplastik aktiviteye sahiptir, birkaç antineoplastik ajan ile sinerjistik aktivite gösterir ve genellikle insan meme kanseri hücre hatlarına karşı paklitakselden daha fazla sitotoksik aktiviteye sahiptir [43].



Şekil 2: Docetaxel (üstte) ve Paklitaksel (altta) Kimyasal Yapıları [44].

2.6. BOR

Bor, atomik sayısı 5, atomik kütlesi 10.811 g / mol ve kimyasal sembolü B olan periyodik tabloda grup 13'te yer alan bir metaloiddir [45]. Bu element, genellikle diğer elementlerle birlikte yaklaşık 230 bileşik oluşturan kimyasal olarak dinamik bir eser elementtir. Borun doğada elemental bir formda bulunmadığı, organizmalardaki fizyolojik açıdan önemli olan bor formları olan sodyum ve oksijen içeren organoboron komplekslerini oluşturarak yer aldığı tespit edilmiştir. Doğal olarak kayalarda, toprakta ve suda bulunur [46].

Borik asit ve borun sodyum tuzları (boraks, disodyum tetraborat) yaygın olarak antiseptik ve bakterisit olarak sabun ve deterjanlarda, konservelerde koruyucu madde olarak, gübrelerde, böcek öldürücüler ve herbisitlerde kullanıldığı bilinmektedir. Bor ayrıca cam üretimi, cam elyafı izolasyonu, porselen, emaye, seramik sırları ve metal alaşımları dahil olmak üzere birçok endüstriyel uygulamalarda da kullanılmaktadır [45].

Bor, çeşitli sebze ve meyvelerde eser element olarak bulunmaktadır. Bu mikro-mineral, günlük olarak besinler ile tüketilmekte ve alınan miktar tüketilen yiyecek ve içeceklerde ortaya çıkan düzeylere göre değişmektedir. Meyveler, sebzeler, kabuklu yemişler ve baklagiller gibi besinleri tüketerek bor alımının artırılmasını ve diyet önerisi olarak kabul edilmesi gerektiği bildirilmiştir [47]. Günde 1 mg'dan fazla bor tüketilmesi durumunda insan sağlığına yararları olacağı düşünülerek yaşam süresini de uzatacağı ön görülmektedir. Borun, kalsiyum, magnezyum, triasilgliseroller, glukoz, aminoasitler, reaktif oksijen türleri, 17 β -östradiol, kalsitonin, 25-hidroksikolekalsiferol gibi hormonların metabolizmasında rol aldığı bilinmektedir [48, 49].

Borun eksikliğinin veya fazlalığının bir takım biyolojik etkilere neden olduğu gösterilmiştir. Hormon ve enzim reaksiyonlarında, hücre membran fonksiyonlarında ve mineral metabolizmasında önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir. Birçok bitkinin büyüme ve çiçeklenme sürecinde esansiyel bir bileşen olduğu belirtilmiştir [50].

Borun tüketilmesi ile hızla bağırsaktan emildiği ve dokularda birikme eğiliminde olmadan vücuttan idrarla tamamen atıldığı tespit edilmiştir [45]. Borun insan biyolojisindeki yeri ile ilgili yapılan çalışmalarda canlılık ve yaşamda aktif rol aldığı gösterilmiştir. Kemiğin büyümesi ve korunmasında, yara iyileşmesinde aktif rol aldığı bildirilmiştir. Sıçanlarda ve piliçlerde yapılan bir çalışmada bor takviyesinin kemik gücünü arttırdığı gösterilmiştir [51]. Östrojen, testosteron ve D vitamini gibi alımlarındaki sonuçları yararlı bir şekilde etkilediği gösterilmiştir. Magnezyum emilimini artırdığı ve yüksek duyarlıklı C-reaktif protein (hs-CRP) ile tümör nekroz faktörü α (TNF- α) gibi inflamatuvar seviyelerini azalttığı tespit edilmiştir. Süperoksit Dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin seviyelerini arttırdığı, pestisit kaynaklı oksidatif stres ve ağır metal toksisitesine karşı koruduğu kanıtlanmıştır. Beyinin elektriksel aktivitesini, bilişsel performansını ve yaşlılar için kısa süreli hafızayı geliştirdiği bildirilmiştir. Prostat, meme, servikal ve akciğer kanserleri gibi bir dizi kansere karşı önleyici olabildiği ileri sürülmüştür. Geleneksel kemoterapötik ajanların olumsuz etkilerini iyileştirmeye yardımcı olabileceğine dair bulgular da literatürlerde bildirilmiştir [48].

Spesifik steroid hormonlarının oluşması için borun gerekli olduğu bildirilmiştir. Bir klinik çalışmada, 7 hafta boyunca 3 mg/gün bor tüketen postmenopozal kadınlarda hem 17-beta-östradiol hem de testosteron düzeylerinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir [56]. Bu nedenle, diyetle alınan borun Hormon Replasman tedavisinin etkilerini taklit edebildiği

düşünülmüştür [51]. Testosteron ve östrojenin meme dokusu üzerindeki proliferatif etkisini önlediği ve meme kanseri için koruyucu bir rol oynadığını göstermişlerdir. Ayrıca tümör büyümesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Klinik öncesi çalışmalar; testosteronun memenin doğal endojen bir koruyucusu olarak hizmet ettiğini desteklemektedir [48, 52]. Premenopozal kadınlarda meme kanseri riskinin, dolaşımdaki testosteron ve androstenedion düzeyleri ile doğrudan ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Günde en az 10 mg borun günlük diyetle alınmasıyla, estradiol düzeyini azalttığını ve testosteron düzeyini arttırdığını bildirmişlerdir [48].

Bor eksikliğinin büyüme, anormal kemik gelişimi, kanda steroid hormon düzeylerinde azalma, üriner kalsiyum atılımındaki artış gibi anormalliklere, insanlarda ve hayvanlarda makromineral durumdaki değişikliklerde bozulmaya neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca farelerin ve kurbağaların bor eksikliğinden kaynaklanan gelişimsel bozukluklara sahip olabileceği de tespit edilmiştir. Bor eksikliğinin sıçan ve fare modellerinde ise osteogenezi azalttığı gösterilmiştir [45].

1990 yılında ilk kez borun inflamatuvar ve oksidatif stresi etkileyebildiği tespit edilmiştir. 2008'den sonraki araştırmalarda ise kemik büyümesini, artriti, kardiyovasküler hastalıkları, osteoporoz ve kanser gibi patolojik durumların duyarlılığını ve şiddetini etkileyen oksidatif ve inflamatuvar stresin modülasyonunu olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir [52].

Borun oksidatif stres yanıtı düzenlediğini gösteren 25'in üzerinde araştırma vardır. Borun anti-inflamatuvar ve antioksidan etkiye sahip olduğu in vitro ve in vivo hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Borun anti-inflamatuvar ve antioksidan biyoaktivitesi ile bazı kanser türleri arasında bir ilişkili olabileceği bildirilmiştir [52].

Kanser tedavisinde toksisiteyi azaltmak için, sodyum klorür ve mannitol ile hazırlanan çözeltiler formunda cisplatin (kemoterapik ajan) uygulanmaktadır. Cisplatin kaynaklı inflamasyonun, oksidatif stresin ve doku hasarının belirli dozlarda borik asit ile azaltılabileceğini gösterilmiştir. Bu bağlamda, borik asit ile oluşturulan tampon çözeltilerle hazırlanacak cisplatin çözeltileri, yan etkilerin azaltılmasında yararlı olabileceği bildirilmiştir [53].

Borun en yaygın inorganik formu boraks (sodyum borat) ve borik asittir (BA). Bazı çalışmalarda borik asidin anti-tümöral özelliklere sahip olduğu ileri sürülmüştür [6, 54, 55, 56] Ölümcül etki mekanizmasının apoptozisi içermediği, ancak histon deasetilaz inhibisyonu ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Ayrıca, borik asit toksisitesinin bitkiler ve böceklerde

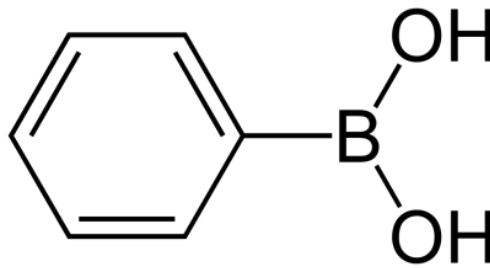
otofaji ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Öte yandan, birçok çalışma histon deasetilaz inhibitörlerini (HDACi) artmış bir otofaji ile ilişkilendirmiştir [57].

Bor içeren bileşiklerden en çok etkilenen kanser türlerinin prostat, meme, servikal ve akciğer kanseri olduğu bildirilmiştir. Kanser hücreleri üzerinde Bor aktivitesini içeren mekanizmalar, serin proteazlar, NAD-dehidrojenazlar, mRNA ekleme ve hücre bölünmesi dahil olmak üzere çeşitli enzimatik aktivitelerin inhibisyonuna, ayrıca reseptör bağlanma taklidine ve apoptozisin indüksiyonuna dayanmaktadır [58].

Metastatik prostat kanseri hücreleri (DU-145) üzerinde anti-kanser tedavi potansiyeli, BA ve PBA'nın spesifik sinyal mekanizmalarını incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, hem BA hem de PBA'nın, fibronektin üzerinde büyümüş DU-145 hücrelerinde aktin dağılımını değiştirdiğini ve aynı zamanda, GTPazların Rho ailesi ve bunların downregulasyonları dahil olmak üzere hücre göçü ve hücre yayılmasında anahtar rol oynayan birkaç proteinin aktivitesini azalttığını gösterilmiştir [6, 56]

2.6.1. Fenilboronik asit (C₆H₇BO₂) (PBA)

Fenilboronik asit, borik aside benzer bir reaktif özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. PBA'nın organik yapısı (Şekil 3) aromatik halka üzerindeki gruplarının konumu ve doğası itibari ile katalitik aktiviteyi ayarlar [59]. PBA'nın bir serin proteaz inhibitörü ve bir peptidil transferaz inhibitörü olarak işlevlerinde cis-diol ve hidroksil kısımları ile kompleks oluşturabildiği belirtilmiştir. [58].



Şekil 3: PBA'nın kimyasal yapısı [59].

Fenilboronik asit (PBA) gibi aromatik borik asitler H₂O₂ ve radikal oksijen türleri (ROS) ile reaksiyona girerek fenollere kolayca dönüştürülür. Tümör dokularında ROS konsantrasyonu anormal derecede (sağlıklı hücrelere göre 10 ila 40 kat) yüksek olduğu gözlemlenmiştir, bu açıdan değerli bir biyolojik tetikleyici konumundadır [60].

Kanser hücrelerinin metastaza ve proliferasyona girmesinde, PBA'nın BA'dan daha güçlü olduğu birkaç çalışmada gösterilmiştir. Özellikle insan prostat ve meme kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalarda PBA'nın hücre göçünü seçici olarak inhibe ettiği ve kanser hücrelerinin canlılığını azalttığı gösterilmiştir. 1000 μ M'lik konsantrasyonda borik asidin DU-145 hücrelerinin migrasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu doz insanlarda ortalama serum borik asit seviyelerinin $\sim$ 100 katıdır. Aksine, PBA'nın, DU-145, PC-3 ve ZR-75-1 kanser hücresi hatlarında hücre göçünü doza bağımlı bir şekilde önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir. PBA ve borik asidin, normal hücre hatlarının canlılıklarında herhangi bir anlamlı etkisi olmadığı gösterilmiştir [6]. 1 mM BA'nın meme kanseri hücrelerinin in vitro olarak büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur. SK-BR-3 ve ZR-75-1 meme kanseri hücrelerini kısmen inhibe ettiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, 7 gün süreyle BA ve PBA ile uygulandıktan sonra ZR-75-1 hücrelerinde apoptotik bir cevap meydana gelmiştir. Bu hücrelerin bor bileşikleri tarafından indüklenen Kaspaz 3 aktiviteleri ile programlanmış ölümleri doğrulanmıştır [47].

Ayrıca tümör taşıyan fareler üzerinde yapılan PBA ile zenginleştirilmiş nanopartiküllerin serbest ilaçlar ile yapılan karşılaştırma çalışmalarında tümörlerin büyümesini yavaşlattığı ve farelerin hayatta kalma süresini uzattığı gösterilmiştir [61].

2.7. HÜCRE HATLARI

2.7.1. MCF-7 Meme Kanser Hücre Hattı

MCF-7 hücreleri, antitümör ilaçların uygulamalarını araştırmak için bir hücre modeli olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. MCF-7, metastatik, epitelyal meme kanseri hücre dizisidir. MCF-7 bir adenokarsinom olması nedeniyle meme dokusundaki birçok farklı bölgede bulunabilir. Bu hücreler östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü pozitif ve ayrıca tümör baskılayıcı gen p53'ü eksprese eder. MCF-7 hücreleri ayrıca hücre dışı, transmembran enzim olan doku transglütaminaz 2 (TG2) eksprese ederler. TG2 çapraz bağlanma reaksiyonları yoluyla inter- veya intra-peptid izopeptid bağları oluşturarak post-translasyonel protein modifikasyonlarını katalize ederler. TG2'nin bu fonksiyonu, MCF-7 hücrelerinin vücuttaki diğer dokulara metastaz yapma yeteneğine katkıda bulunur [59].

Çeşitli çalışmalarla, dirençli hücreler üzerinde farklı ilaçların antiproliferatif etkilerini değerlendirilmiştir [48]. İşeri (2009) [37], kombine ilaç uygulamalarının, DOC ve DOX'a dirençli MCF-7 insan meme karsinom hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkinliğini

geliştirmiştir. Bu çalışmada, DOX ve DOC kombinasyonunun, DOC'a dirençli hücreler üzerinde anlamlı bir sinerjik antiproliferatif etki ile sonuçlandığını göstermiştir.

2.7.2. MCF 10A Meme Hücre Hattı

İnsan meme epitel hücre hattı olan MCF10A, menopoz sonrası memede tümör özelliği barındırmayan kistlere sahip 36 yaşında bir kadının mastektomi dokusundan çoğaltılmıştır [62].

MCF10A hücreleri normal insan meme epitel hücrelerine yakın olup, normal meme hücresi fonksiyonlarını ve dönüşümlerini laboratuvar ortamında incelemek için sık kullanılan bir modeldir. [63, 64]. Bu hücreler östrojen reseptörünü eksprese etmezler [63]. Ayrıca MCF10A hücrelerinin p53 geninde mutasyonlar yoktur fakat p16/p15 lokusunda homozigot kayıp mevcuttur [65].

3. YÖNTEM

Çalışma, in-vitro ortamda meme kanseri hücre hattı ile sağlıklı meme hücre hattı kullanılarak yapılmıştır. Bu hücre hatları kullanılarak borun kemoterapatik kanser ilacı ile birlikte biyolojik etkileri araştırılmıştır.

3.1. HÜCRELERİN TEMİNİ

Çalışmada kullanılmış olan MCF7 ve MCF10A hücreleri sırası ile Yeditepe Üniversitesi'nin Genetik ve Biyomühendislik Bölümünden ve Gebze Teknik Üniversitesi'nin Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden temin edilmiştir.

3.2. HÜCRE BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI

MCF7 hücre hattında ticari Dulbecco'nun Modifiye edilmiş Eagle Besiyeri (DMEM) kullanılmıştır. DMEM içerisinde %10 olacak şekilde Fetal Sığır Serum (FBS), %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin eklenmiştir. Hazırlanan çalışma besiyeri 0.22 µm'lik filtre ile süzülerek kültüre hazır hale getirilmiştir.

MCF10A hücre hattında tüm içeriği ticari kit olarak bulunan Lonza MEGM Bullet Kit kullanılmıştır. Kit içerisindeki bazal besiyerine ilave olarak mevcut olan 2 mL BPE, 0,5 mL hEGF, 0,5 mL Insulin, 0,5 mL Hydrocortisone ve 0,5 mL GA-1000 eklenmiştir. Hazırlanan çalışma besiyeri 0.22 µm'lik filtre ile süzülerek kültüre hazır hale getirilmiştir.

3.3. ÇALIŞMA KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI

PBA konsantrasyonlarının hazırlanması için öncelikle ana stok hazırlanmıştır. 15 mL'lik falkonda 5 mL ethanol içerisinde 61 mg PBA çözündürülmüş ve 100 mM'lık PBA stok solüsyonu elde edilmiştir. Ana stoktan hücre kültürü besiyerleri içerisinde 1 mM ve 10 mM PBA içeren çalışma solüsyonları elde edilmiştir.

2 mg/ml konsantrasyonunda bulunan DOX çalışma konsantrasyonlarının hazırlanması için stok solüsyonu hazırlanmıştır. 15 ml'lik falkon tüpe konulan 10 mL steril distile su

içerisine ana stoktan 28,96 µl DOX eklenerek 10 µM ara stok elde edilmiştir. Ara stoktan hücre kültürü besiyerleri içerisinde 100 nM ve 1000 nM DOX içeren çalışma solüsyonları elde edilmiştir.

20 mg/ml konsantrasyonunda bulunan DOC çalışma konsantrasyonlarının hazırlanması için stok solüsyonu hazırlanmıştır. 15 ml'lik falkon tüpe konulan 10 mL steril distile su içerisine ana stoktan 4,04 µl DOC eklenerek 10 µM ara stok elde edilmiştir. Ara stoktan hücre kültürü besiyerleri içerisinde 10 nM ve 100 nM DOC içeren çalışma solüsyonları elde edilmiştir.

3.4. ÇALIŞMA GRUPLARININ BELİRLENMESİ

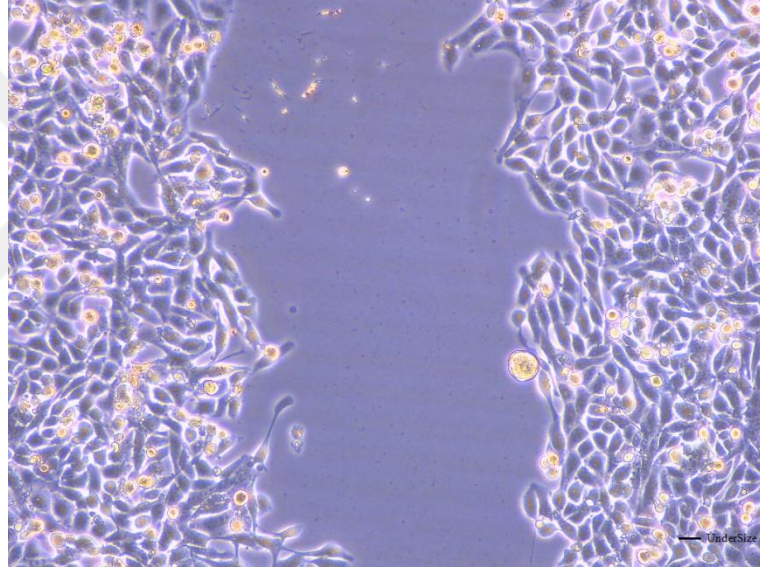
Literatürlerde proliferasyon etikleri bilinen düşük ve yüksek PBA [6, 59], DOC [75, 91] ve DOX [75, 76, 77] dozları seçilerek aşağıdaki kombinasyonlar oluşturulmuştur (Tablo 1).

Tablo 1: Çalışma Grupları ve Doz İçerikleri

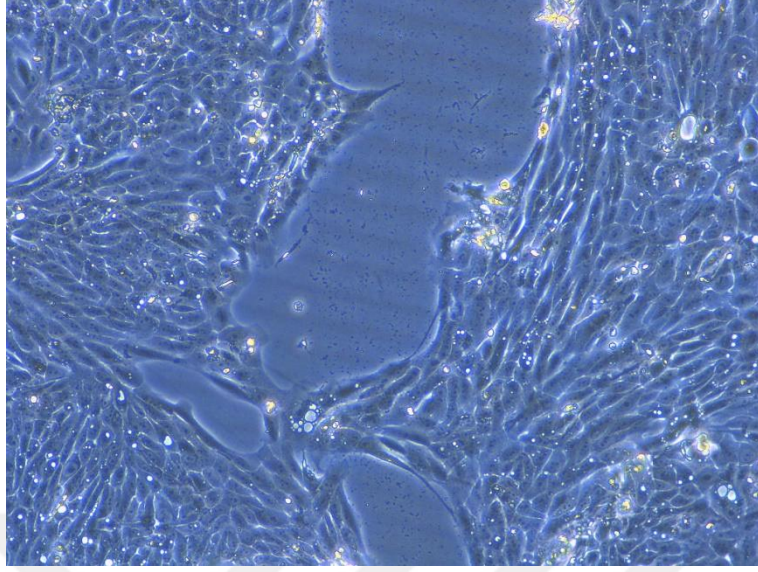
Gruplar	Doz Konsantrasyonları
Kontrol	Kontrol
Grup 1 (Tekli Dozlar)	1 mM PBA
	10 mM PBA
	10 nM DOC
	100 nM DOC
	100 nM DOX
	1000 nM DOX
Grup 2 (İkili Dozlar)	1 mM PBA + 10 nM DOC
	1 mM PBA + 100 nM DOC
	10 mM PBA + 10 nM DOC
	10 mM PBA + 100 nM DOC
	1 mM PBA + 100 nM DOX
	1 mM PBA + 1000 nM DOX
	10 mM PBA + 100 nM DOX
	10 mM PBA + 1000 nM DOX
Grup 3 (Üçlü Dozlar)	1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX
	1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX
	1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX
	1 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX
	10 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX
	10 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX
	10 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX
	10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX

3.5. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Sıvı azotta muhafaza edilen 12. pasajdaki MCF7 hücre stokları ile 17. pasajdaki hücre stokları çözündürölüp taze hazırlanmış besi ortamına hazır hale getirilmiştir. Dondurma besiyerinin içerisindeki Dimetil Sülfoksit'in (DMSO) hücrelere toksik etki etmemesi için DMSO dilüsyonunu azaltmak adına 8 ml çalışma besiyerine çözündürölmüş süspansiyon aktarılıp 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökölerek dibe çöken hücreler çalışma besiyerinde süspanse edilerek 10 cm'lik petri kabına yaklaşık $1 - 2 \times 10^6$ hücre olacak şekilde eklenmiştir. Hücrelerin 10 cm'lik kültür petri kapları içerisinde %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde çoğalmaları sağlanmıştır. Hücre çoğalmasına göre 48 veya 72 saatte bir besi ortamları değıştirilmiştir.



Şekil 4: MCF7 Hücre Hattının Mikroskoptaki Görüntüsü (Büyütme: 10X)



Şekil 5: MCF10A Hücre Hattının Mikroskoptaki Görüntüsü (Büyütme: 10X)

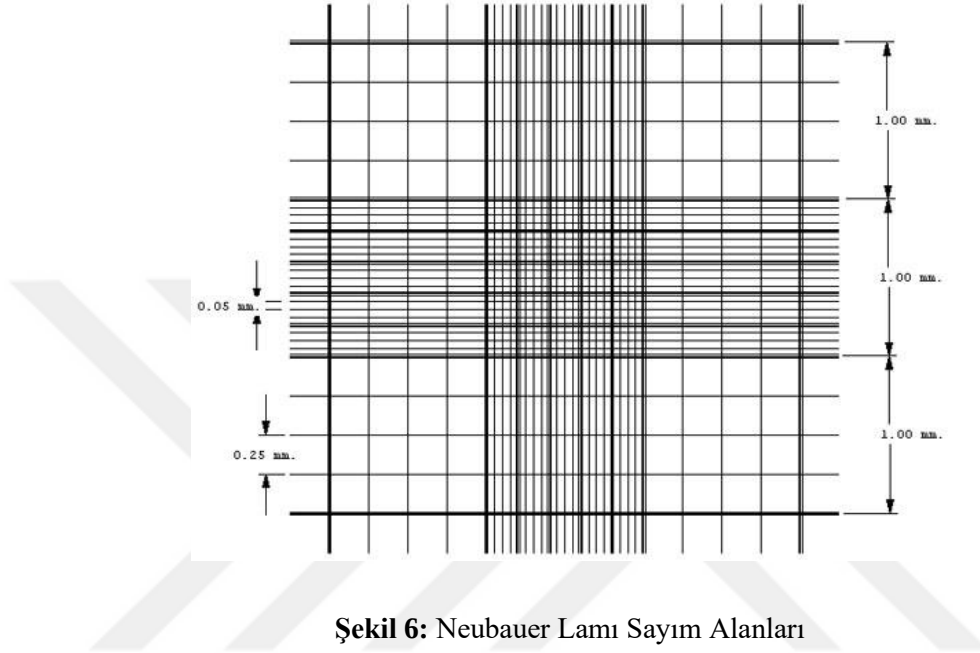
3.6. HÜCRELERİN PASAJLANMASI

Hücrelerin petrilere büyük oranda kaplaması (%70 - 90) tamamlandıktan sonra, yüzeyi kaplayan hücreler tripsin yardımıyla kaldırılarak pasajları yapılmıştır. Öncelikle petri içerisinde bulunan besiyerleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Petri içerisinde kalan besiyeri artıklarını (özellikle FBS) tamamen uzaklaştırmak için 2 mL PBS eklenerek yıkanmış ve sonrasında PBS uzaklaştırılmıştır. Her 10 cm'lik kültür petrilere için 1 mL Tripsin eklenmiştir. Tripsin sıcaklık artışı ile aktive olduğu için petrilere yeniden inkübatöre kaldırılmış ve 3 ila 5 dakika beklenmiştir. Uzun süreli tripsin muamelesi hücrelere zarar vereceği için hücrelerin yüzeyden kalktıkları görüldüğünde inkübatörden çıkarılmıştır. Hızlıca üzerine 2 mL FBS içeren çalışma besiyeri eklenerek aktivasyon durdurulmuş ve tripsin inaktive edilmiştir.

Hücreler 15 mL falkonlara toplanmış ve sonrasında 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülerek dibe çöken hücreler kendi besiyerlerinde çözülerek sayımları yapılmıştır. Bu hücreler yeniden 10 cm'lik petrilere yaklaşık $1 - 2 \times 10^6$ hücre olacak şekilde kendi besiyerleri içerisine ekilmiş ve inkübatöre kaldırılmıştır.

3.7. HÜCRELERİN SAYIMI

Hücreler Neubauer lamı kullanılarak sayılmıştır. Her biri lamda kazınmış olarak 3 x 3 mm karelerden oluşan iki adet sayım alanı mevcuttur. Bu sayma alanları 1 x 1 mm'lik dokuz adet karelere bölünmüştür.



Şekil 6: Neubauer Lamı Sayım Alanları

Besiyer içerisinde bulunan süspanse hücrelerden pipet yardımı ile 10 µl alınarak sayım alanına bırakılmıştır. Üzerine tüm yüzeyi kaplayacak ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde lamel kapatılmıştır. Hazırlanan lamın orta alanında bulunan hücreler 40X objektif kullanılarak faz kontrast mikroskobunda sayılmıştır. Hücre konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Konsantrasyon} = \text{Hücre Sayısı} \times 10,000 / \text{Kare Sayısı}$$

3.8. HÜCRELERİN DONDURULMASI

Hücre sayımı sonrasında her bir cryo tüpe 1 ml besiyeri içerisinde 5×10^6 hücre olacak şekilde hücre eklenmiştir. Üzerine 100 µl DMSO damla damla eklenmiştir. -80°C dolaba kaldırılmıştır ve bir gün sonra uzun süreli saklama için sıvı azot tankına kaldırılmıştır.

3.9. HÜCRELERİN ÇALIŞMA KÜLTÜR PETRİLERİNE EKİLMESİ

WST-1 hücre canlılık testi ve DCFDA ROS testi için 96 kuyucuklu kültür petrileri kullanılmıştır. Uygun besiyeri içerisinde sayımı yapılmış olan hücreler her bir kuyucukta 10.000 hücre / 100 µl olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat inkübatörde bekletilmiş ve hücrelerin yüzeye yapışması beklenmiştir. Ertesi gün belirlenmiş olan deney etken maddesi hücrelere uygulanmış ve yeniden planlanan inkübasyon sürelerini geçirmek üzere inkübatöre kaldırılmıştır.

Hücre göçü testi için 12 kuyucuklu kültür petrileri kullanılmıştır. Uygun besiyeri içerisinde sayımı yapılmış olan hücreler her bir kuyucukta 100.000 hücre / 1 ml olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat inkübatörde bekletilmiş ve hücrelerin yapışması beklenmiştir. Ertesi gün belirlenmiş olan deney etken maddesi hücrelere uygulanmış ve yeniden planlanan inkübasyon sürelerini geçirmek üzere inkübatöre kaldırılmıştır.

Apoptoz testi için 6 kuyucuklu kültür petrileri kullanılmıştır ve uygun besiyer içerisinde sayımı yapılmış olan hücreler her bir kuyucukta 250.000 hücre / 2 ml olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat inkübatörde bekletilmiş ve hücrelerin yapışması beklenmiştir. Ertesi gün belirlenmiş olan deney etken maddesi hücrelere uygulanmış ve yeniden planlanan inkübasyon sürelerini geçirmek üzere inkübatöre kaldırılmıştır.

3.10. WST-1 TESTİ İLE HÜCRE CANLILIĞININ SAPTANMASI

WST-1 testinde tetrazolyum tuzları hücrelerde mevcut olan mitokondriyal solunumu zincir enzimlerinden süksinat tetrazolyum redüktaz enzimi ile formazana çevrilmektedir. Bu enzim canlı hücrelerde çalışmakta olup hücre sayılarındaki artış formazan oluşumunu da artırmaktadır. Böylece hücre kültüründeki hücre sayısı ile direkt korelasyona sahip olduğu bilinmektedir [66, 67].

Kullanılan WST-1 kit içeriğinde belirtilen şekilde 96 kuyucuklu kültür petrilerinde kuyucuk başına 10 µl olacak şekilde besiyerine eklenmiş ve inkübatöre kaldırılmıştır. 30 dakika ile 4 saat arasında 450 nm ve 600 nm dalga boyları kullanılarak eliza okuyucu cihazında absorbans ölçümleri yapılmıştır. Testler arası korelasyon olması açısından her çalışmada 1 saat sonra okuma yapılmıştır.

3.11. APOPTOZUN TESPİT EDİLMESİ

Apoptoz veya nekroz sebepli hücre ölümlerinin saptanması için uygulanan boyama yöntemi kullanılmıştır. Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde, membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme, hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin-V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür (PI) eklenmektedir. Anneksin V-FITC (green fluorescence) ve non-vital boya olan propidyum iyodür (red fluorescence) ile canlı hücreler (FITC-PI-) boya almaz, karanlık görünür. Canlı ve erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) yeşil renkli olarak görünür. Ölü hücre olup geç apoptotik veya nekrotik (hacimce büyük) hücreler (FITC+PI+) ise turuncu/sarı görüntülenmektedir [68].

Apoptotik etkinin incelenmesi Annexin V ve Propidium Iodide boyası içeren apoptoz kiti kullanılarak Flow Cytometry cihazında yapılmıştır. 6 kuyucuklu kültür petrilere hücre süspansiyonundan 250.000 hücre / 2 ml olacak şekilde 2 ml eklenmiş ve inkübatöre kaldırılmıştır. Hücrelerin petrilere tutunması sağlandıktan sonra besiyeri uzaklaştırılıp 2 ml besiyeri içlerine etkisi araştırılacak olan etken madde eklenmiş ve inkübatöre kaldırılmıştır. Apoptozun tespiti için Annexin V bağlanma solüsyonu içerisine $0.25-1.0 \times 10^7$ hücre/ml olacak şekilde hücreler eklenmiştir. Her bir hücre süspansiyonundan 5 ml'lik flow tüplerine 100 µl eklenmiştir. Bu hücrelerin üzerine 5 µl Annexin V ve 10 µl Propidium Iodide solüsyonu eklendikten sonra vortekslenmiş, 15 dakika oda ısısında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her tüpe 400 µl Annexin V bağlanma solüsyonu eklenip Flow Cytometry cihazında sayım yapılmıştır.

3.12. HÜCRELERDEKİ OKSİDATİF STRES (ROS) DÜZEYİNİN SAPTANMASI

Hücrel metabolizma sırasında reaktif oksijen türlerinin özellikle mitokondriyal enerji üretim yoluyla sürekli olarak üretildiği bilinmektedir. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin artışı (ROS) ile onları detoksifiye eden, antioksidanların (enzimatik/enzimatik olmayan) yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanır. ROS artışının

hücrede apoptozu indüklediği bildirilmiştir [ROS: Hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit (H_2O_2) vb.]. Normal hücrelerde: İyonik ve polar olmayan DCF-DA hücre membranından geçer ve hücre sel esterazlar tarafından enzimatik olarak floresan olmayan bir bileşik olan DCFH'a hidrolize edilir. Renk oluşmaz. Reaktif oksijen türlerinin fazlalığında ise; oldukça floresan bir bileşik olan diklorofloroseine (DCF) okside edilir. Yeşil renkli floresan olarak görünür [69].

Hücre içi ROS düzeylerinin araştırılması için siyah kaplamalı 96 kuyucuklu kültür petrilere her bir kuyucukta 10.000 hücre / 100 µl olacak şekilde ekim yapılmış ve inkübatöre kaldırılmıştır. Hücrelerin kültür petrilere tutunması sağlandıktan sonra besiyeri uzaklaştırılmış, 100 µl besiyeri içerisine etkisi araştırılacak olan etken madde eklenerek inkübatöre kaldırılmıştır. Hücrelerin üzerine çalışma konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde serum içermeyen besiyer içinde hazırlanmış olan 0,5 ml DCF-DA çözeltisi eklenmiştir (10 mM DMSO içinde hazırlanmış ve alikotlar halinde -20°C'de saklanan stok çözeltilerden kullanılmıştır). 45 dakika inkübatörde bekletilmiştir ve 529 nm dalga boyuna sahip floresan kapasiteli mikropilaka okuyucuda absorbans ölçülmüştür.

3.13. HÜCRE MİGRASYONUNUN ÖLÇÜLMESİ

Göç hızlarının ölçülmesi amacıyla kullanılan besiyerleri %2 FBS içerecek şekilde ayarlanmıştır. 12 kuyucuklu kültür petrilere hücre süspansiyonundan 100.000 hücre / 1 ml olacak şekilde 1 ml eklenmiş ve inkübatöre kaldırılmıştır. Hücreler tek tabaka olacak şekilde kültür petri yüzeyine tutunduklarından emin olunduktan sonra 10 µl uzun pipet ucuyla her bir kuyucuğa "+" olacak şekilde yatay ve dikey düz iki çizgi çekilmiştir. Besiyeri uzaklaştırılmış ve kalıntıları uzaklaştırmak için 1 ml taze besiyeri ile yıkanmıştır. Hücrelerin üzerine etkisi araştırılacak olan etken maddeler eklendikten sonra 1 ml %2 FBS içeren besiyeri eklenmiştir. Her seferinde doğru yerden ölçüm alabilmek için "+" olarak çizilen çiziklerin kesişim noktasının üst bölgesinden ölçümler alınmıştır.

0. saat için mikroskopta görüntü alınıp inkübasyona kaldırılmıştır. 24, 48, 96 ve 168. saatlerde faz kontrast mikroskopta görüntüler alınmıştır. Çiziğin kapanma hızı kantitatif olarak karşılaştırılmıştır.

3.14. SONUÇLARIN ANALİZ EDİLMESİ

Hücre göçü çalışmasında elde edilen görüntülerdeki yara mesafeleri ImageJ programı kullanılarak sayısal değerler elde edilmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar Graphpad yazılımı ile birlikte One-Way Anova testi kullanılarak analizleri yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri olarak $p \leq 0,05$ kullanılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. WST-1 TESTİ İLE HÜCRE CANLILIĞININ SAPTANMASI

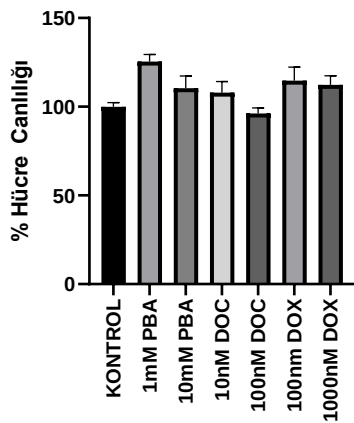
MCF7 ve MCF10A hücrelerinde WST-1 testi analizleri ile hücre canlılığının toplu sonuçları ilgili şekillerde ve tablo 3'te gösterilmiştir. Grup 1'de PBA, DOC, DOX dozlarının, grup 2'de PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarının ve grup 3'de ise PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarının sonuçları kontrole göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

4.1.1. 1. gün (24. saat) WST-1 Test sonuçları

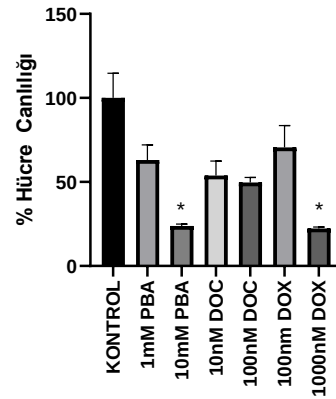
MCF7 ve MCF10A hücrelerinde kullanılan PBA, DOC ve DOX dozlarından, PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından ve PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının 1. gündeki doza bağlı hücre canlılığı üzerindeki etkileri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Grup 1'de PBA, DOC, DOX dozlarının doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkileri (%) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 7, Tablo 2).

MCF7 WST1 1. Gün PBA, DOC, DOX Dozları



MCF10A WST1 1. Gün PBA, DOC, DOX Dozları



Şekil 7: 1. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri

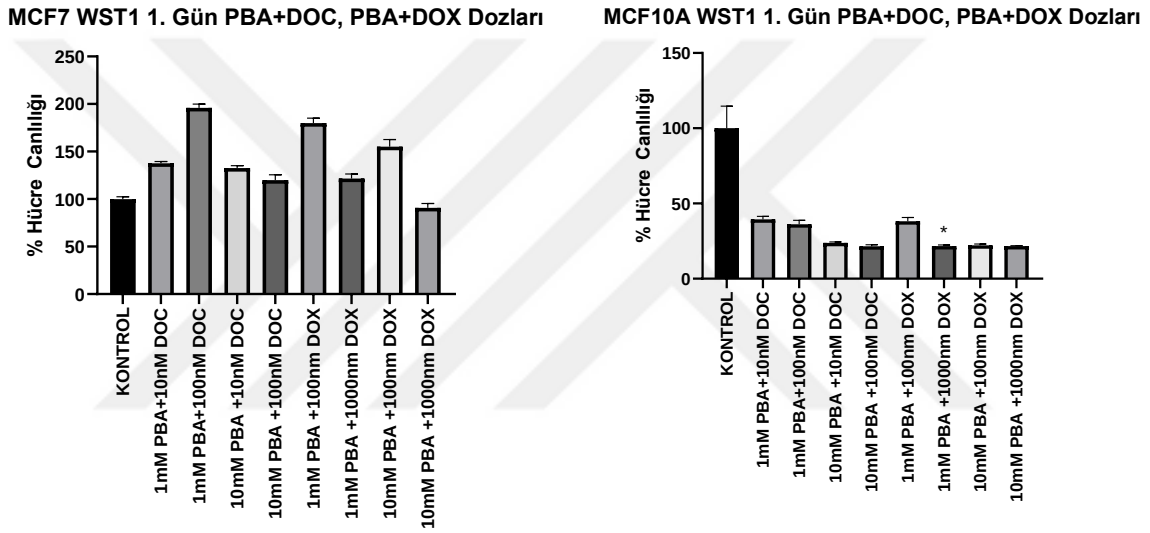
1. günde: MCF7 hücrelerinde kontrol grubuna göre PBA, DOC, DOX dozlarının hücre canlılığına istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi tespit edilmemiştir.

MCF10A hücrelerinde, kontrol hücrelerine göre;

10mM PBA dozu uygulanan hücreler %76,19 oranında ($p=0.0477$),

1000 nM DOX dozu uygulanan hücreler %77,65 oranında ($p=0.0450$) canlılıklarını yitirdikleri gözlemlenmiştir.

Grup 2’de PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarının doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkileri (%) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 8, Tablo 2).

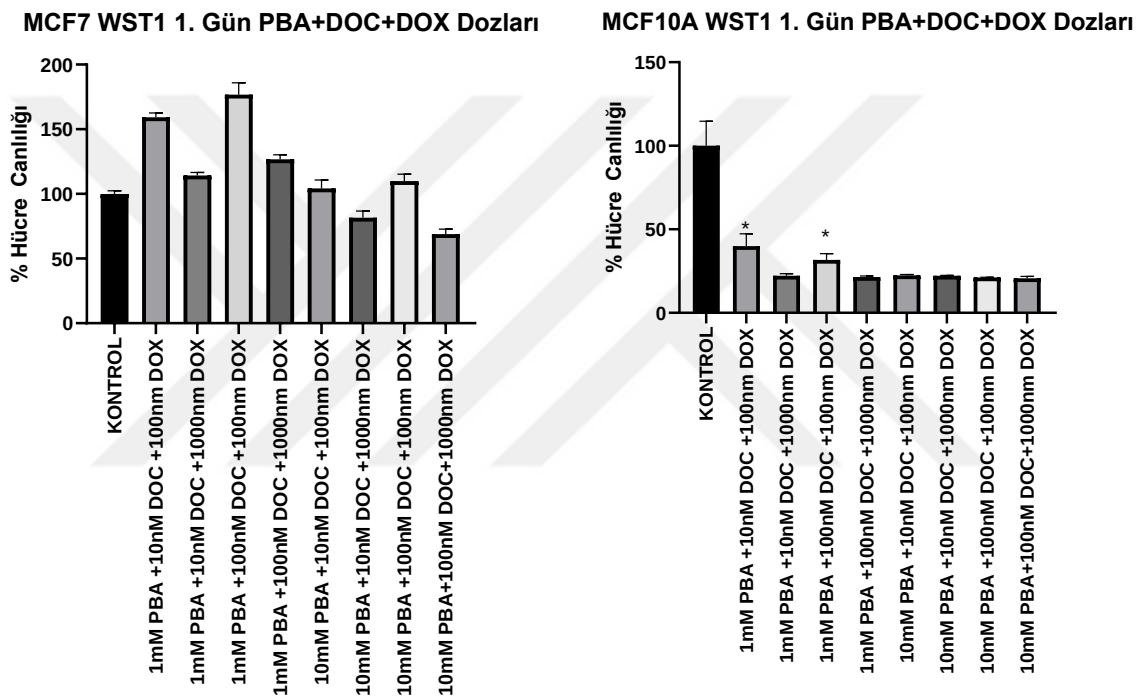


Şekil 8: 1. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri

1. günde: MCF7 hücrelerinde kontrol grubuna göre, PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarının hücre canlılığına istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi tespit edilmemiştir. MCF10A hücrelerinde, kontrol hücrelerine göre;

1 mM PBA + 1000 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan hücreler %78,27 oranında ($p=0.0492$) canlılıklarını yitirdikleri gözlemlenmiştir.

Grup 3'te PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarının doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkileri (%) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 9, Tablo 2).



Şekil 9: 1. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri

1. günde: MCF7 hücrelerinde kontrol grubuna göre, PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarının hücre canlılığına istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi tespit edilmemiştir.

MCF10A hücrelerinde, kontrol hücrelerine göre;

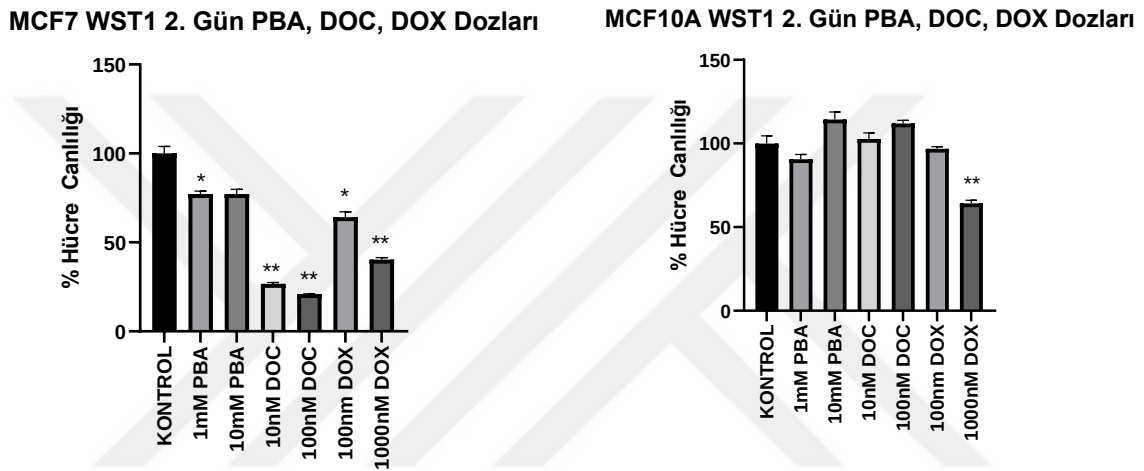
1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nm DOX doz kombinasyonu uygulanan hücreler %60,08 oranında ($p=0.0468$),

1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nm DOX doz kombinasyonu uygulanan hücreler %68,31 oranında ($p=0.0435$) hücre canlılıklarını yitirdikleri gözlemlenmiştir.

4.1.2. 2. gün (48. saat) WST-1 Test sonuçları

MCF7 ve MCF10A hücreleri PBA, DOC ve DOX dozları, PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonları ve PBA+DOC+DOX doz kombinasyonları ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda elde edilen % hücre canlılıklarının 2. gündeki doza bağlı hücre canlılığı üzerindeki etkileri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Grup 1’de PBA, DOC, DOX dozlarının doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkileri (%) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 10, Tablo 2).



Şekil 10: 2. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri

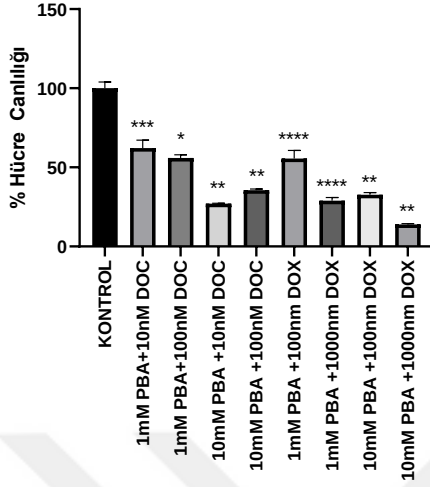
Grup 1;

1 mM PBA dozu uygulanan hücreler %22,87 oranında ($p=0.0158$),
 10 nM DOC dozu uygulanan hücreler %73,31 oranında ($p=0.0011$),
 100 nM DOC dozu uygulanan hücreler %79,05 oranında ($p=0.0024$),
 100 nM DOX dozu uygulanan hücreler %35,81 oranında ($p=0.0124$),
 1000 nM DOX dozu uygulanan hücreler %59,68 oranında ($p=0.0097$) canlılıklarını yitirdikleri gözlemlenmiştir.

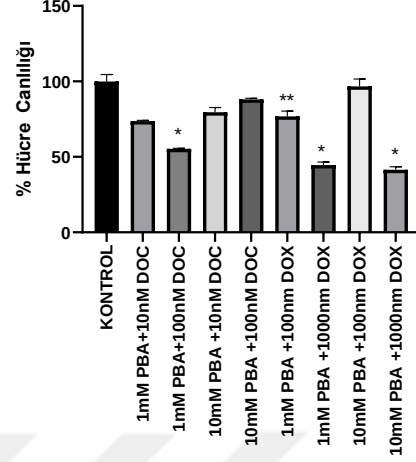
Sadece, 1000 nM DOX dozu uygulanan MCF10A hücrelerinde %35,77 oranında ($p=0.0089$) hücre canlılığı üzerinde negatif etkisi olduğu belirlenmiştir.

Grup 2’de PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarının doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkileri (%) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 11, Tablo 2).

MCF7 WST1 2. Gün PBA+DOC, PBA+DOX Dozları



MCF10A WST1 2. Gün PBA+DOC, PBA+DOX Dozları



Şekil 11: 2. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri

Grup 2;

1 mM PBA + 10 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde; %37,84 oranında ($p=0.0002$),

1 mM PBA + 100 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde; %44,10 oranında ($p=0.0223$), MCF10A hücrelerinde; %44,73 oranında ($p=0.0139$),

10 mM PBA + 10 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde; %73,00 oranında ($p=0.0042$),

10 mM PBA + 100 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde; %64,48 oranında ($p=0.0095$),

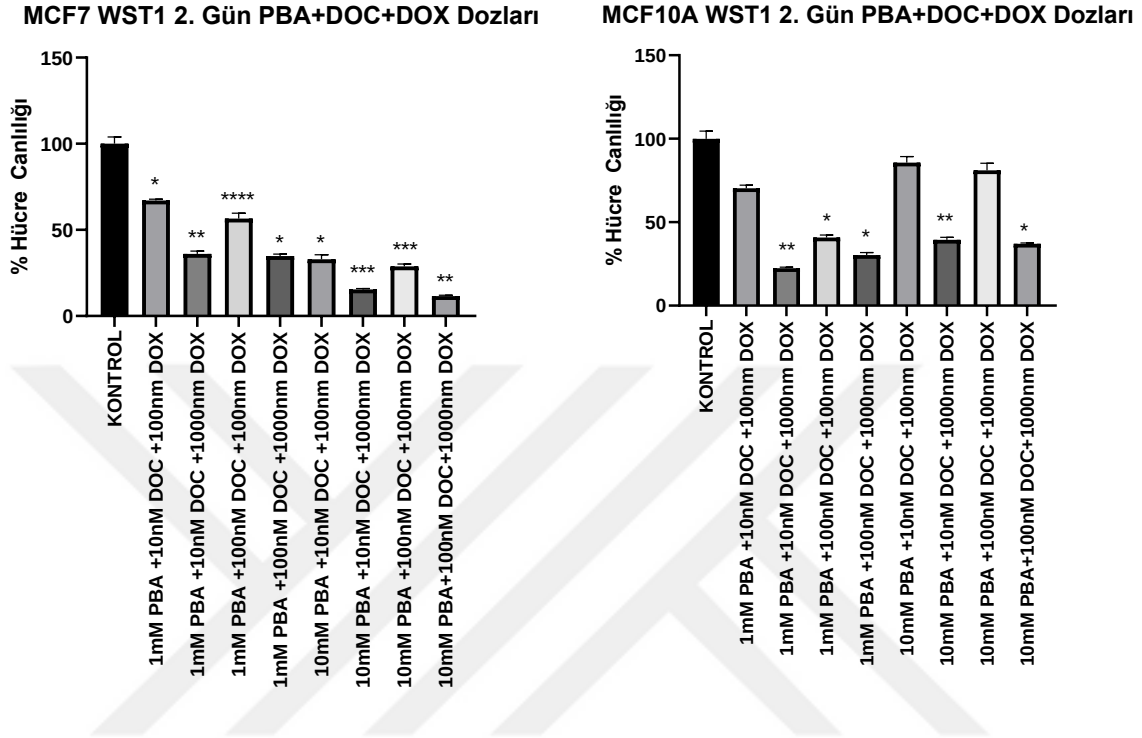
1 mM PBA + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde; %44,40 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %23,24 oranında ($p=0.0033$),

1 mM PBA + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde; %71,06 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %55,41 oranında ($p=0.0192$),

10 mM PBA + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde; %67,31 oranında ($p=0.0061$),

10 mM PBA + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde; %86,05 oranında ($p=0.0027$), MCF10A hücrelerinde; %58,62 oranında ($p=0.0140$), hücre canlılıkları üzerinde negatif etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Grup 3'te PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarının doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkileri (%) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 12, Tablo 2).



Şekil 12: 2. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri

Grup 3;

1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde; %32,88 oranında ($p=0.0165$),

1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde; %63,95 oranında ($p=0.0023$), MCF10A hücrelerinde; %77,59 oranında ($p=0.0055$),

1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde; %43,44 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %59,21 oranında ($p=0.0157$),

1 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde; %65,16 oranında ($p=0.0108$), MCF10A hücrelerinde; %69,65 ($p=0.0113$),

10 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde; %67,06 oranında ($p=0.0149$),

10 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde; %84,62 oranında ($p=0.0006$), MCF10A hücrelerinde; %60,58 oranında ($p=0.0033$),

10 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde; %71,22 oranında ($p=0.0002$),

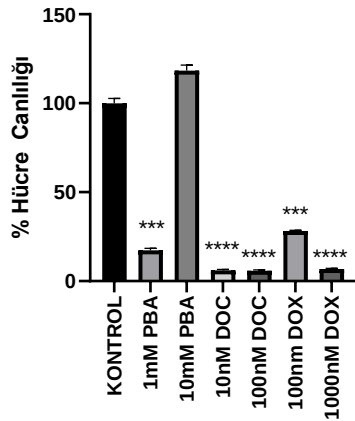
10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde; %88,39 oranında ($p=0.0018$), MCF10A hücrelerinde; %62,90 oranında ($p=0.0108$), hücre canlılıklarını yitirdikleri gözlemlenmiştir.

4.1.3. 4. gün (96. saat) WST-1 Test sonuçları

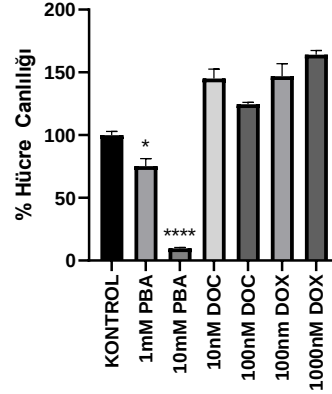
MCF7 ve MCF10A hücrelerinde kullanılan PBA, DOC ve DOX dozlarından, PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından ve PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının 4. gündeki doza bağlı hücre canlılığı üzerindeki etkileri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Grup 1’de PBA, DOC, DOX dozlarının doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkileri (%) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 13, Tablo 2).

MCF7 WST1 4. Gün PBA, DOC, DOX Dozları



MCF10A WST1 4. Gün PBA, DOC, DOX Dozları



Şekil 13: 4. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri

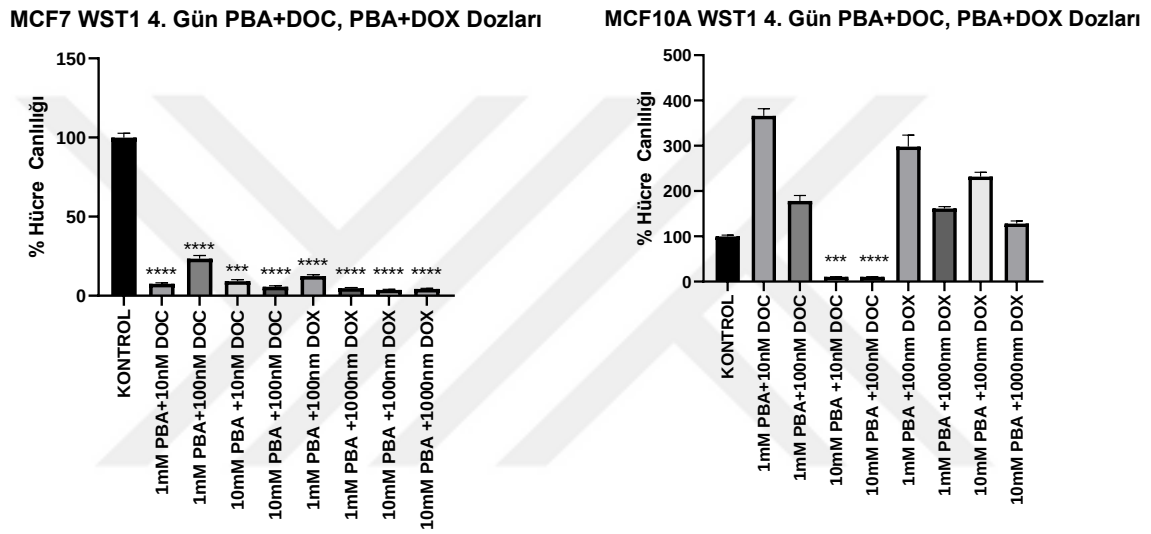
Grup 1;

1 mM PBA dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde %82,65 ($p=0.0008$), MCF10A hücrelerinde %24,78 ($p=0.0483$),

10 mM PBA dozu uygulanan MCF10A hücrelerinde; %90,24 oranında ($p<0.0001$),

10 nM DOC dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %93,89 ($p<0.0001$),
 100 nM DOC dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %94,19 ($p<0.0001$),
 100 nM DOX dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %71,79 oranında ($p=0.0004$),
 1000 nM DOX dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %92,23 oranında ($p<0.0001$),
 hücre canlılıklarını yitirdikleri gözlemlenmiştir (Şekil 3 ve tablo 1).

Grup 2’de PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarının doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkileri (%) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 14, Tablo 2).



Şekil 14: 4. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri

Grup 2;

1 mM PBA + 10 nM DOC doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %92,44 oranında ($p<0.0001$),

1 mM PBA + 100 nM DOC doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %76,53 oranında ($p<0.0001$),

10 mM PBA + 10 nM DOC doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %90,84 oranında ($p=0.0002$), MCF10A hücrelerinde; %89,44 oranında ($p=0.0001$),

10 mM PBA + 100 nM DOC doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %94,26 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %89,56 oranında ($p<0.0001$),

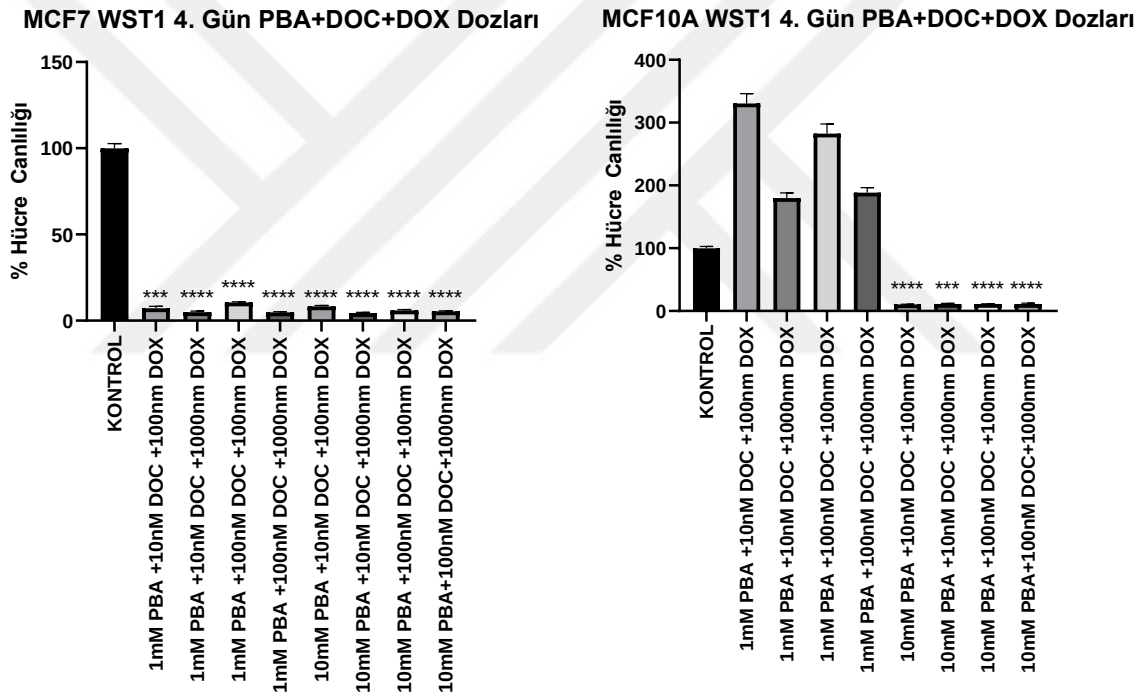
1 mM PBA + 100 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %87,58 oranında ($p<0.0001$),

1 mM PBA + 1000 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %95,16 oranında ($p<0.0001$),

10 mM PBA + 100 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %96,31 oranında ($p<0.0001$),

10 mM PBA + 1000 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %95,67 oranında ($p<0.0001$), hücre canlılıklarını kayb ettikleri gözlemlenmiştir (Şekil 3 ve tablo 1).

Grup 3'te PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarının doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkileri (%) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 15, Tablo 2).



Şekil 15: 4. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri

Grup 3;

1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %92,79 oranında ($p=0.0002$),

1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %95,04 oranında ($p<0.0001$),

1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %89,48 oranında ($p<0.0001$),

1 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %95,19 oranında ($p<0.0001$).

10 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %91,65 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %89,50 oranında ($p<0.0001$),

10 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %95,56 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %88,78 oranında ($p=0.0006$),

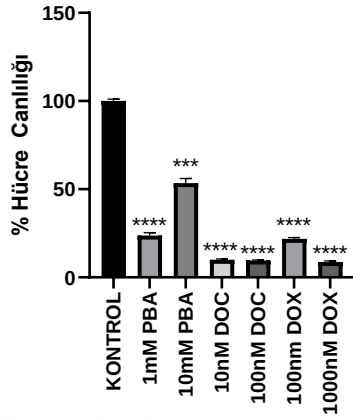
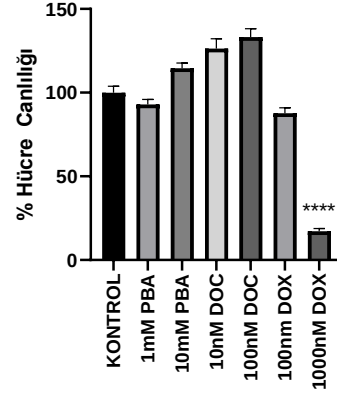
10 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %94,00 oranında ($p<0.0001$),

10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %94,52 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %88,78 oranında hücre canlılıkları üzerinde negatif etkili olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir ($p=0.0006$).

4.1.4. 7. gün (168. saat) WST-1 Test sonuçları

MCF7 ve MCF10A hücrelerinde kullanılan PBA, DOC ve DOX dozlarından, PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından ve PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının 7. gündeki doza bağlı hücre canlılığı üzerindeki etkileri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Grup 1'de PBA, DOC, DOX dozlarının doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkileri (%) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 16, Tablo 2).

MCF7 WST1 7. Gün PBA, DOC, DOX Dozları**MCF10A WST1 7. Gün PBA, DOC, DOX Dozları**

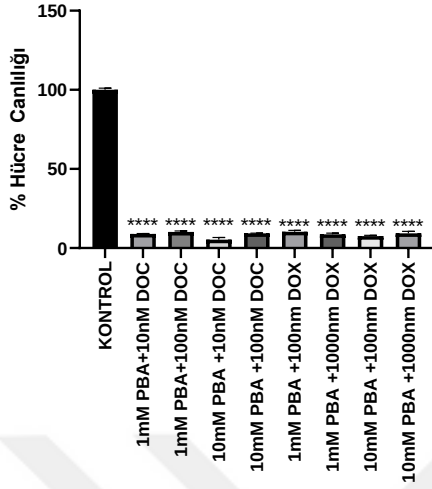
Şekil 16: 7. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri

Grup 1;

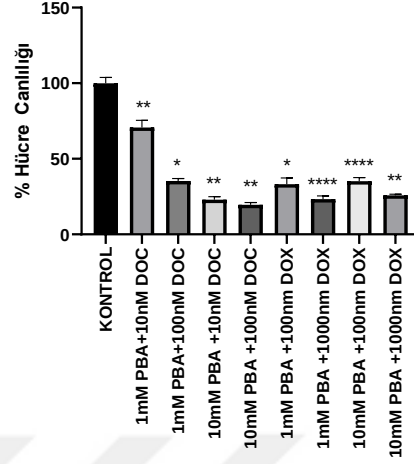
1 mM PBA dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %76,28 oranında ($p < 0.0001$),
 10 mM PBA dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %46,50 oranında ($p = 0.0002$),
 10 nM DOC dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %90,06 oranında ($p < 0.0001$),
 100 nM DOC dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %90,38 oranında ($p < 0.0001$),
 100 nM DOX dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %78,19 oranında ($p < 0.0001$),
 1000 nM DOX dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %91,26 oranında ($p < 0.0001$),
 MCF10A hücrelerinde; %82,80 oranında canlılıklarını yitirdikleri gözlemlenmiştir ($p < 0.0001$).

Grup 2'de PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarının doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkileri (%) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 17, Tablo 2).

MCF7 WST1 7. Gün PBA+DOC, PBA+DOX Dozları



MCF10A WST1 7. Gün PBA+DOC, PBA+DOX Dozları



Şekil 17: 7. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri

Grup 2;

1 mM PBA + 10 nM DOC doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %91,11 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %29,26 oranında ($p=0.0082$),

1 mM PBA + 100 nM DOC doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %89,77 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %64,70 oranında ($p=0.0114$),

10 mM PBA + 10 nM DOC doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %94,67 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %77.00 oranında ($p=0.0093$),

10 mM PBA + 100 nM DOC doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %90,64 oranında canlılıklarını yitirdikleri gözlemlenmiştir ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %80,49 oranında ($p=0.0070$),

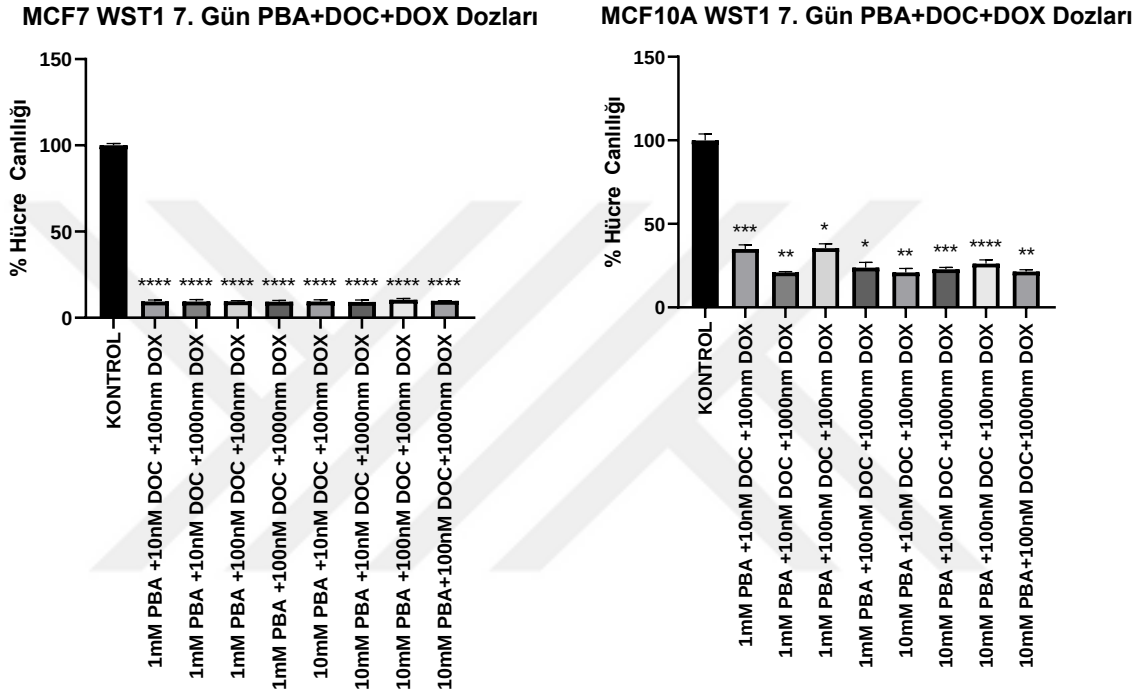
1 mM PBA + 100 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %89,69 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %66,84 ($p=0.0191$),

1 mM PBA + 1000 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %91,35 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %76,65 oranında ($p<0.0001$),

10 mM PBA + 100 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %92,46 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %64,85 oranında ($p<0.0001$),

10 mM PBA + 1000 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %90,64 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %74,14 oranında ($p=0.0018$) hücre canlılıklarını kaybettikleri gözlemlenmiştir.

Grup 3'te PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarının doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkileri (%) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 18, Tablo 2).



Şekil 18: 7. gün sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 grafikleri

Grup 3;

1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %90,55 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %65,08 oranında ($p=0.0001$).

1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %90,54 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %79,02 oranında canlılıklarını yitirdikleri gözlemlenmiştir ($p=0.0042$),

1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %90,38 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %64,60 oranında ($p=0.0142$).

1 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %90,75 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %76,22 oranında ($p=0.0120$).

10 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %90,51 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %79,03 oranında ($p=0.0092$).

10 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %90,77 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %77,13 oranında ($p=0.0005$).

10 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %89,59 oranında ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %73,81 oranında ($p<0.0001$),

10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinde; %90,17 ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde; %78,54 oranında ($p=0.0074$), hücre canlılıkları üzerinde negatif etiki olduğu istatistiksel olarak tespit edilmiştir.

Tablo 2: 1. gün (24 saat), 2. gün (48 saat), 4. gün (96 saat), 7. gün (168 saat) sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarının, PBA+DOC, PBA+DOX ve PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen % hücre canlılıklarının WST-1 analizi ile değerlendirilmesi.

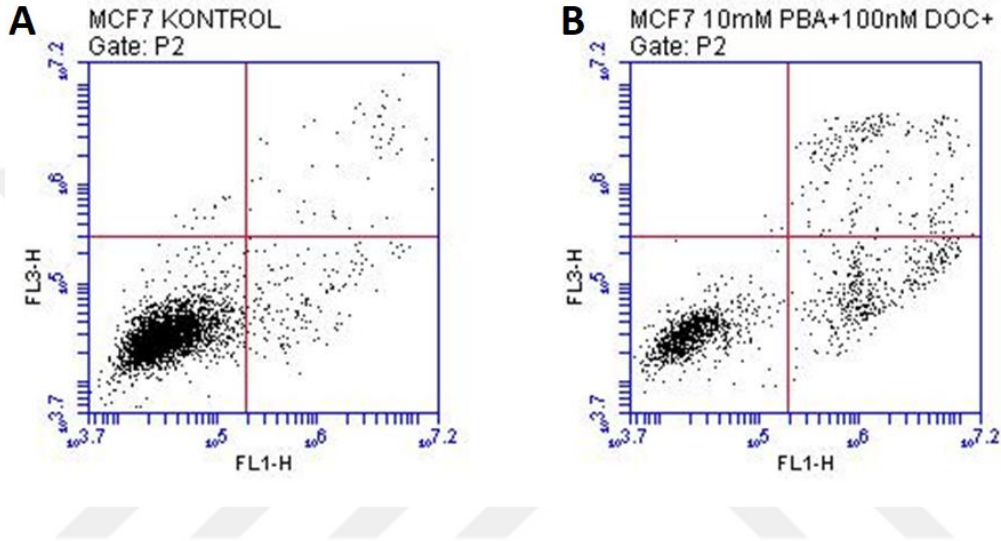
	MCF-7				MCF-10A			
	1. Gün	2. Gün	4. Gün	7. Gün	1. Gün	2. Gün	4. Gün	7. Gün
1 mM PBA	-25.39%	22.87% *	82.65% ***	76.28% ****	36.91%	9.43%	24.78% *	7.06%
10 mM PBA	-10.43%	22.78%	-18.35%	46.50% ***	76.19% *	-14.32%	90.24% ****	-14.50%
10 nM DOC	-7.90%	73.31% **	93.89% ****	90.06% ****	46.17%	-2.66%	-45.03%	-26.30%
100 nM DOC	3.90%	79.05% **	94.19% ****	90.38% ****	50.36%	-11.99%	-24.61%	-33.24%
100 nM DOX	-14.65%	35.81% *	71.79% ***	78.19% ****	29.40%	3.15%	-46.97%	12.37%
1000 nM DOX	-12.32%	59.68% **	92.23% ****	91.26% ****	77.65% *	35.77% **	-64.09%	82.80% ****
1 mM PBA + 10 nM DOC	-37.64%	37.84% ***	92.44% ****	91.11% ****	60.62%	26.26%	-266.10%	29.26% **
1 mM PBA + 100 nM DOC	-95.97%	44.10% *	76.53% ****	89.77% ****	63.84%	44.73% *	-78.03%	64.70% *
10 mM PBA + 10 nM DOC	-32.51%	73.00% **	90.84% ****	94.67% ****	76.22%	20.42%	89.44% ****	77.00% **
10 mM PBA + 100 nM DOC	-19.84%	64.48% **	94.26% ****	90.64% ****	78.41%	11.89%	89.56% ****	80.49% **
1 mM PBA + 100 nM DOX	-79.97%	44.40% ****	87.58% ****	89.69% ****	61.84%	23.24% **	-198.00%	66.84% *
1 mM PBA + 1000 nM DOX	-21.65%	71.06% ****	95.16% ****	91.35% ****	78.27% *	55.41% *	-61.59%	76.65% ****
10 mM PBA + 100 nM DOX	-55.05%	67.31% **	96.31% ****	92.46% ****	77.85%	3.30%	-132.00%	64.85% ****
10 mM PBA + 1000 nM DOX	9.19%	86.05% **	95.67% ****	90.64% ****	78.34%	58.62% *	-28.16%	74.14% **
1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX	-59.21%	32.88% *	92.79% ***	90.55% ****	60.08% *	29.71%	-230.50%	65.08% ***
1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX	-14.32%	63.95% **	95.04% ****	90.54% ****	77.79%	77.59% **	-79.79%	79.02% **
1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX	-76.76%	43.44% ****	89.48% ****	90.38% ****	68.31% *	59.21% *	-182.60%	64.60% *
1 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX	-26.67%	65.16% *	95.19% ****	90.75% ****	78.50%	69.65% *	-88.54%	76.22% *
10 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX	-4.20%	67.06% **	91.65% ****	90.51% ****	77.52%	14.27%	89.50% ****	79.03% **
10 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX	18.48%	84.62% ***	95.56% ****	90.77% ****	77.76%	60.58% **	88.78% ****	77.13% ***
10 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX	-9.98%	71.22% ***	94.00% ****	89.59% ****	78.81%	18.88%	88.81% ****	73.81% ****
10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX	31.16%	88.39% **	94.52% ****	90.17% ****	79.28%	62.90% *	88.85% ****	78.54% **

Tablo 2’de eksi (-) değerleri içeren dozların kontrole göre hücre canlılıkları daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

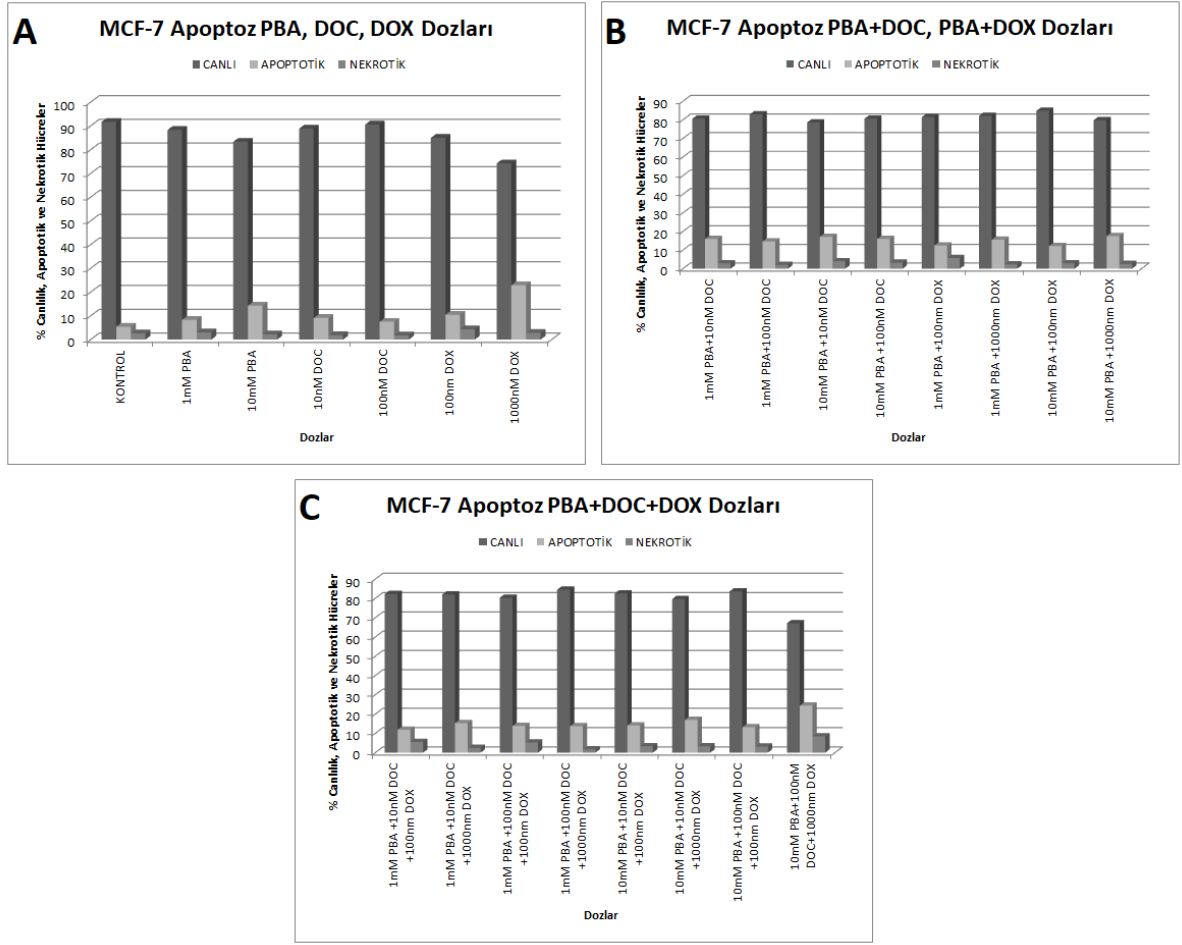
4.2. APOPTOZ SONUÇLARI

AnneksinV/PI boyası ile de apoptoz veya nekroz sebepli hücre ölümleri saptanabilmektedir.

MCF7 apoptoz çalışmalarında en düşük canlılığa sahip grup 10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX içeren kombinasyon grubudur. Aynı zamanda en yüksek apoptotik ve nekrotik hücrelere sahiptir. (Şekil 19-B, Şekil 20, Tablo 3).

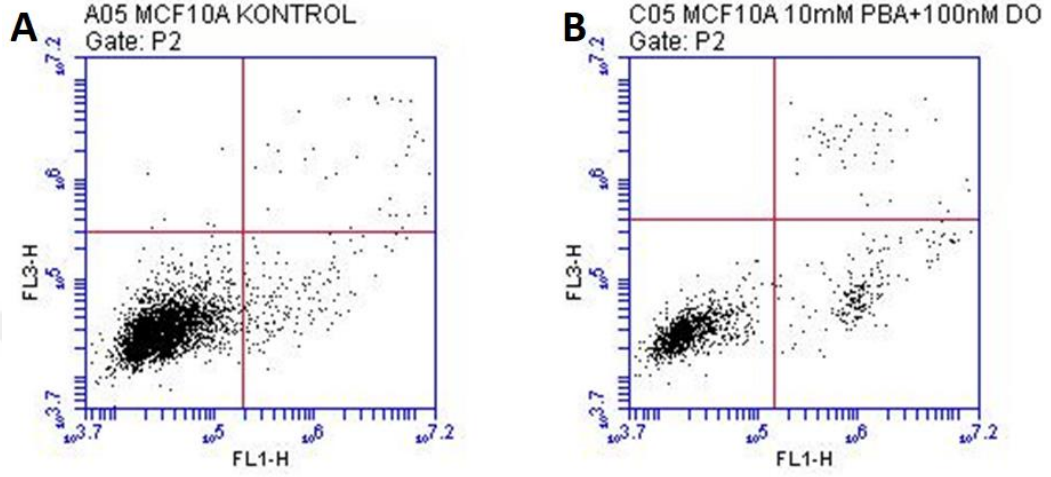


Şekil 19: MCF7 hücrelerinde kontrol grubu ile en yüksek apoptoz oranına sahip olan 10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX kombinasyonunun sonuçları

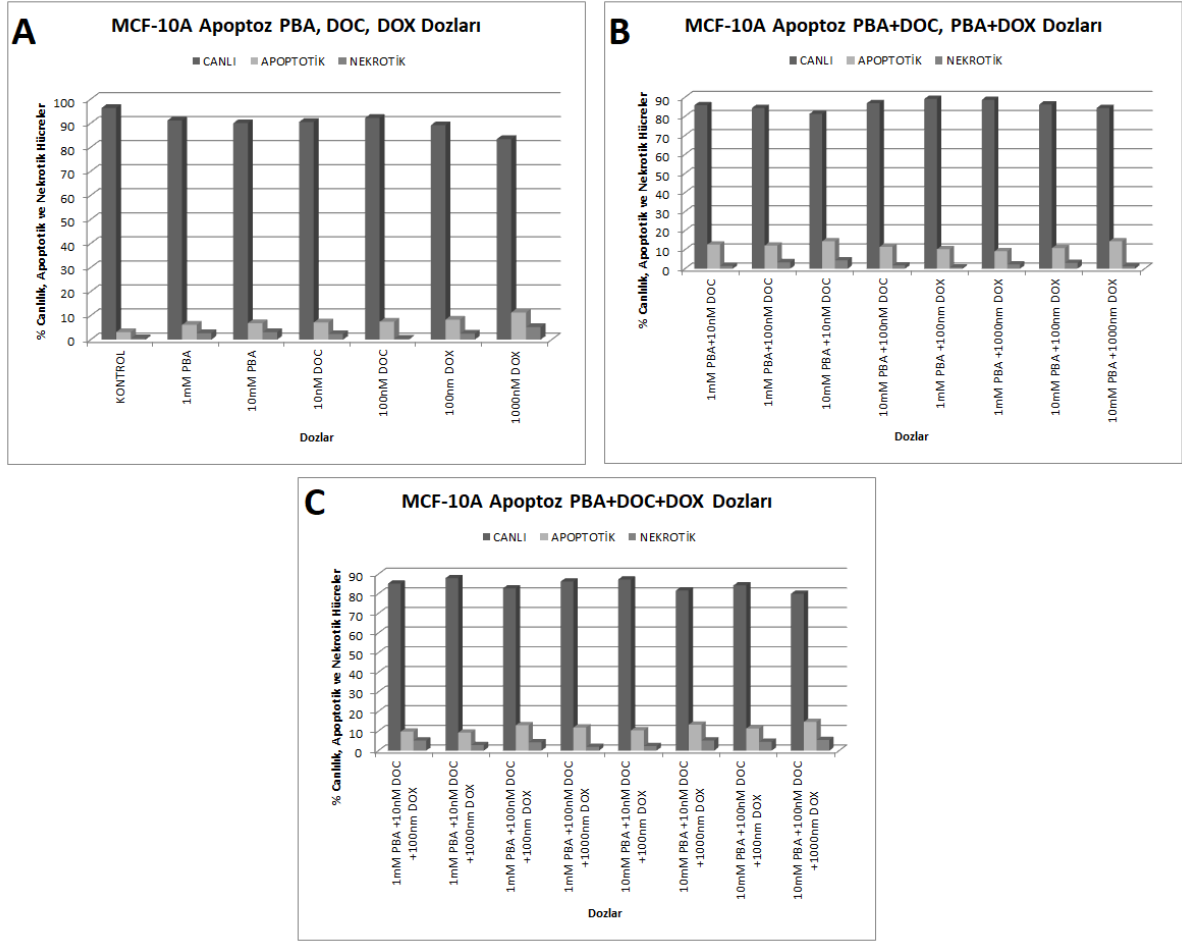


Şekil 20: MCF7 Hücrelerinde Dozlara Göre Apoptoz Yüzde % Oran Değişimleri

MCF10A apoptoz çalışmalarında en düşük canlılığa sahip grup 10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX içeren kombinasyon grubudur. Aynı zamanda en yüksek apoptotik ve nekrotik hücrelere sahiptir (Şekil 21-B, Şekil 22, Tablo 3).



Şekil 21: MCF10A hücrelerinde kontrol grubu ile en yüksek apoptoz oranına sahip olan 10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX kombinasyonunun sonuçları



Şekil 22: MCF10A Hücrelerinde Dozlara Göre Apoptoz Yüzde % Oran Değişimleri

1 mM PBA dozu ile yapılan çalışmadaki MCF7 hücrelerinde MCF-10A hücrelerine göre 1.4 kat (* p=0.0383),

10 mM PBA dozu ile yapılan çalışmadaki MCF7 hücrelerinde MCF-10A hücrelerine göre 2.1 kat (* p=0.0140),

1000 nM DOX dozu ile yapılan çalışmadaki MCF7 hücrelerinde MCF-10A hücrelerine göre 2 kat (* p=0.0313),

1 mM PBA + 1000 nM DOX doz kombinasyonları ile yapılan çalışmadaki MCF7 hücrelerinde MCF-10A hücrelerine göre 1.7 kat (* p=0.0441),

1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları ile yapılan çalışmadaki MCF7 hücrelerinde MCF-10A hücrelerine göre 1.7 kat (* p=0.0160),

10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları ile yapılan çalışmadaki MCF7 hücrelerinde MCF-10A hücrelerine göre 1.7 kat (** p=0.0054) daha fazla apoptotik hücre tespit edilmiştir.

Tablo 3: MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarının, PBA+DOC, PBA+DOX ve PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen canlılık, apoptotik ve nekrotik hücre yüzdelерinin apoptoz testi ile değerlendirilmesi.

	MCF-7			MCF-10A		
	% CANLILIK	% APOPTOTİK	% NEKROTİK	% CANLILIK	% APOPTOTİK	% NEKROTİK
KONTROL	91.66	5.45	2.58	96.32	3.15	0.53
1 mM PBA	88.3	8.34	3.07	91.14	6.15	2.69
10 mM PBA	83.35	14.3	2.22	90.02	6.87	3.11
10 nM DOC	88.86	9.12	1.83	90.53	7.15	2.32
100 nM DOC	90.56	7.5	1.8	92.16	7.42	0.4
100 nM DOX	84.98	10.5	4.35	89.17	8.34	2.48
1000 nM DOX	74.23	22.91	2.81	83.39	11.32	5.2
1 mM PBA + 10 nM DOC	80.66	16.05	2.93	85.84	12.64	1.5
1 mM PBA + 100 nM DOC	82.94	14.68	2.11	84.38	12.12	3.4
10 mM PBA + 10 nM DOC	78.58	17.18	3.97	81.22	14.39	4.39
10 mM PBA + 100 nM DOC	80.57	16.02	3.29	86.83	11.46	1.71
1 mM PBA + 100 nM DOX	81.44	12.52	5.73	89.12	10.26	0.62
1 mM PBA + 1000 nM DOX	82.13	15.59	2.29	88.64	9.15	2.2
10 mM PBA + 100 nM DOX	84.81	12.2	2.94	86.17	10.82	3
10 mM PBA + 1000 nM DOX	79.85	17.55	2.6	84.38	14.39	1.23
1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX	82.31	11.92	5.6	85.1	9.67	5.22
1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX	82.09	15.36	2.47	87.92	9.23	2.84
1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX	80.34	13.81	5.31	82.74	12.95	4.31
1 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX	84.55	13.76	1.65	86.16	11.83	2
10 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX	82.53	14.15	3.25	87.29	10.35	2.36
10 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX	79.66	17	3.28	81.61	13.22	5.17
10 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX	83.67	13.18	3.15	84.19	11.27	4.53
10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX	67.14	24.39	8.47	79.93	14.63	5.44

4.3. HÜCRELERDEKİ OKSİDATİF STRES (ROS) DÜZEYİNİN SAPTANMASI

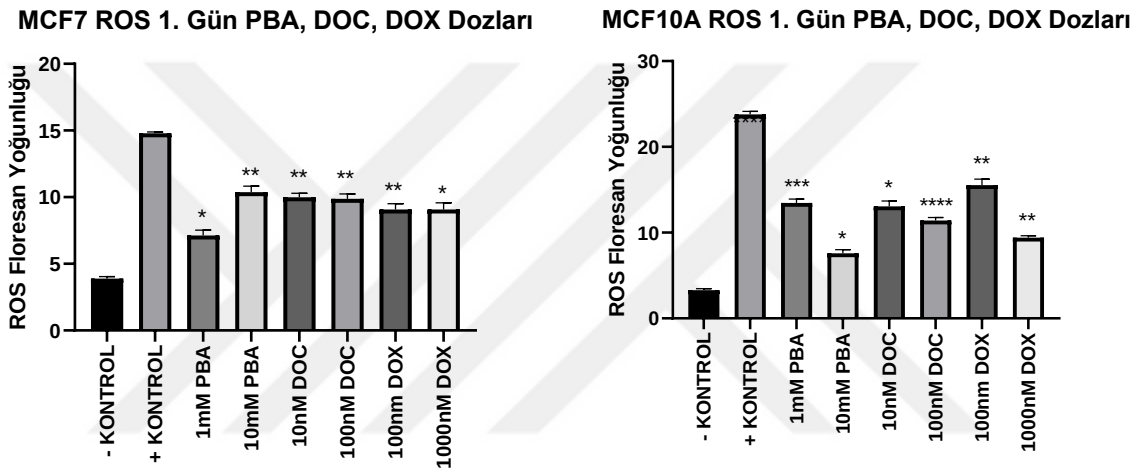
Reaktif oksijen türleri (ROS), spesifik bir bileşik prob olan DCF-DA [DCF-DA (D6883) 50mg; Sigma-Aldrich] ile tespit edilmiştir. Bu bileşik hücreye girdikten sonra hücre içi esteraز tarafından parçalandığı ve hidroforik kısmının kaybı nedeniyle hücrede kaldığı bildirilmiştir. ROS tarafından oksitlendikten sonra, floresan kısmın örtülmediği ve floresan ışımaya yaptığı bilinmektedir. Yayılan floresan miktarı, hücredeki ROS miktarı ile ilişkilidir. Bu yöntem, canlı yani metabolik aktivitesi süren hücrelerde ROS'u ölçmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [70].

Nekrotik hücre ölümünde ROS üretiminin arttığı, ATP üretiminin azaldığı ve Ca^{2+} kanalları açıldığı bilinmektedir. Aşırı ROS ve Ca^{2+} üretiminde mitokondriyal kanallar açılmaktadır. Porların uzun süre açık kalması durumunda hücreler oksidatif fosforilasyon ile ATP üretememeye başlar ve nekroza girerler [71, 72].

MCF7 ve MCF10A hücrelerinde; 1., 2., 4. ve 7. gün sonunda, PBA, DOC, DOX ve planlanan kombinasyonlarla inkübe edildikten sonra oksidatif stres (ROS) testi için DCFDA testi yapılmıştır.

4.3.1. 1. gün (24. saat) ROS Test sonuçları

1. günün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinde grup 1'de PBA, DOC, DOX dozları oksidatif stres (ROS) testi ile DCFDA floresan yoğunluklarının artışı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 23, Tablo 4).



Şekil 23: 1. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri

Grup 1;

ROS floresan yoğunluklarının her bir hücre tipinin kontrolüne göre 1 mM PBA dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 1.8 kat ($p=0.0336$), MCF10A hücrelerinde 4.1 kat ($p=0.0007$),

10 mM PBA dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.7 kat ($p=0.0034$), MCF10A hücrelerinde 2.3 kat ($p=0.0284$),

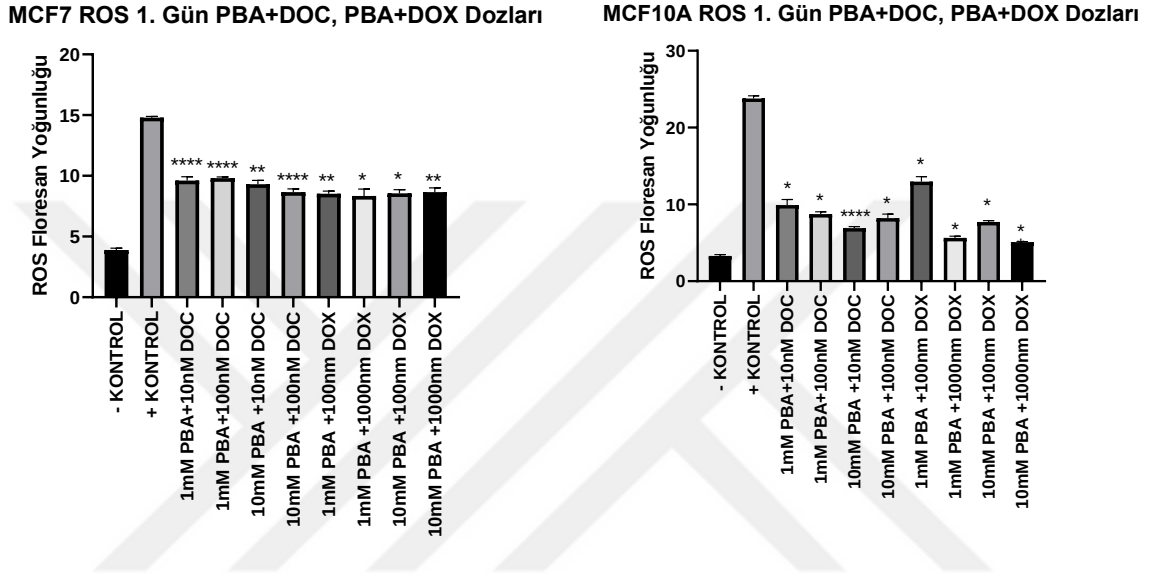
10 nM DOC dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.6 kat ($p=0.0095$), MCF10A hücrelerinde 4 kat ($p=0.0110$),

100 nM DOC dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.5 kat ($p=0.0014$), MCF10A hücrelerinde 3.5 kat ($p<0.0001$),

100 nM DOX dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.3 kat ($p=0.0091$), MCF10A hücrelerinde 4.7 kat ($p=0.0090$),

1000 nM DOX dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.3 kat ($p=0.0121$), MCF10A hücrelerinde 2.9 kat ($p=0.0038$) istatistiksel olarak arttığı gözlemlenmiştir.

1. günün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinde grup 2'de PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarının oksidatif stres (ROS) testi ile DCFDA floresan yoğunluklarının artışı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 24, Tablo 4).



Şekil 24: 1. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri

Grup 2;

1 mM PBA + 10 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.5 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 3 kat ($p=0.0324$),

1 mM PBA + 100 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.5 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 2.7 kat ($p=0.0126$),

10 mM PBA + 10 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.4 kat ($p=0.0098$), MCF10A hücrelerinde 2.1 kat ($p<0.0001$),

10 mM PBA + 100 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.2 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 2.5 kat ($p=0.0349$),

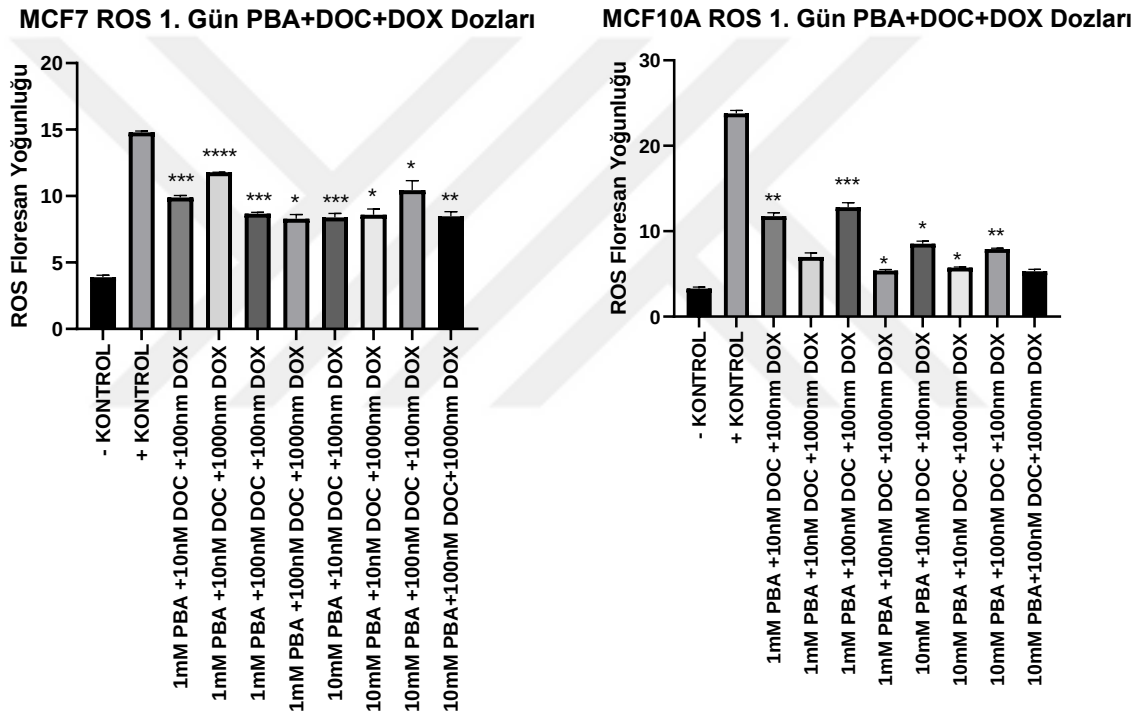
1 mM PBA + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.2 kat ($p<0.0012$), MCF10A hücrelerinde 3.9 kat ($p=0.0128$),

1 mM PBA + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.1 kat ($p=0.0194$), MCF10A hücrelerinde 1.7 kat ($p=0.0435$),

10 mM PBA + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.2 kat ($p=0.0140$), MCF10A hücrelerinde 2.3 kat ($p=0.0121$),

10 mM PBA + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.2 kat ($p=0.0035$), MCF10A hücrelerinde 1.5 kat ($p=0.0250$) ROS floresan yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir.

1. günün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinde grup 3’de ise PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarının oksidatif stres (ROS) testi ile DCFDA floresan yoğunluklarının artışı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 25, Tablo 4).



Şekil 25: 1. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri

Grup 3;

1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.5 kat ($p=0.0002$), MCF10A hücrelerinde 3.6 kat ($p=0.0033$),

1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 3 kat ($p<0.0001$),

1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.2 kat ($p=0.0003$), MCF10A hücrelerinde 3.9 kat ($p=0.0002$),

1 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.1 kat ($p=0.0181$), MCF10A hücrelerinde 1.6 kat ($p=0.0302$),

10 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.2 kat ($p=0.0002$), MCF10A hücrelerinde 2.6 kat ($p=0.0142$),

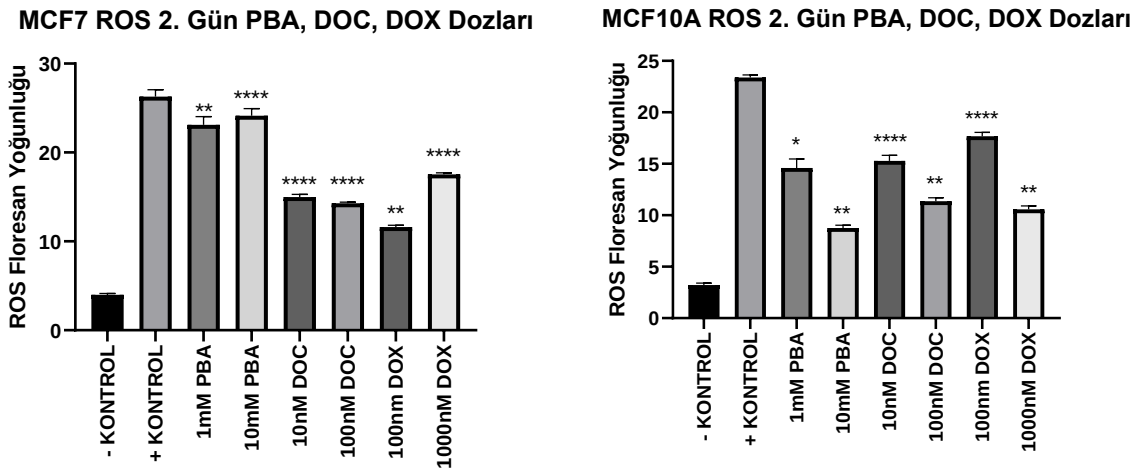
10 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.2 kat ($p=0.0227$), MCF10A hücrelerinde 1.7 kat ($p=0.0169$),

10 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.7 kat ($p=0.0147$), MCF10A hücrelerinde 2.4 kat ($p=0.0070$),

10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.2 kat ($p=0.0018$) kontrol grubuna göre ROS floresan yoğunluklarının arttığı istatistiksel olarak gözlemlenmiştir.

4.3.2. 2. gün (48. saat) ROS Test sonuçları

2. günün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinde grup 1'de PBA, DOC, DOX dozlarının oksidatif stres (ROS) testi ile DCFDA floresan yoğunluklarının artışı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 26, Tablo 4).



Şekil 26: 2. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri

Grup 1;

1 mM PBA dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 5.8 kat ($p=0.0039$), MCF10A hücrelerinde 4.5 kat ($p=0.0102$),

10 mM PBA dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 6 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 2.7 kat ($p=0.0077$),

10 nM DOC dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 3.8 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 4.7 kat ($p<0.0001$),

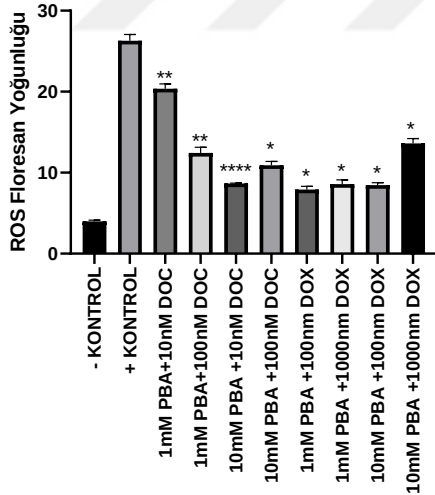
100 nM DOC dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 3.6 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 3.5 kat ($p=0.0012$),

100 nM DOX dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.9 kat ($p=0.0011$), MCF10A hücrelerinde 5.5 kat ($p<0.0001$),

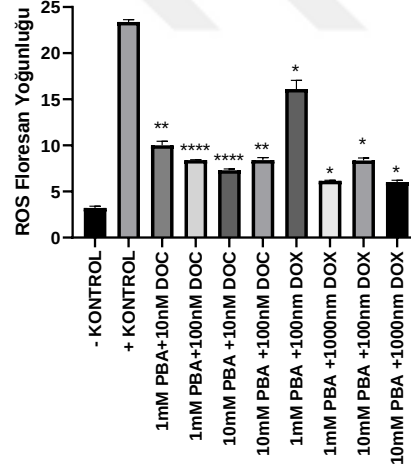
1000 nM DOX dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 4.4 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 3.3 kat ($p=0.0064$) ROS floresan yoğunluklarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttığı gözlemlenmiştir.

2. günün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinde grup 2’de PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarının oksidatif stres (ROS) testi ile DCFDA floresan yoğunluklarının artışı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 27, Tablo 4).

MCF7 ROS 2. Gün PBA+DOC, PBA+DOX Dozları



MCF10A ROS 2. Gün PBA+DOC, PBA+DOX Dozları



Şekil 27: 2. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri

Grup 2;

1 mM PBA + 10 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 5.1 kat ($p=0.0014$), MCF10A hücrelerinde 3.1 kat ($p=0.0093$),

1 mM PBA + 100 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 3.1 kat ($p=0.0098$), MCF10A hücrelerinde 2.6 kat ($p<0.0001$),

10 mM PBA + 10 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.2 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 2.3 kat ($p<0.0001$),

10 mM PBA + 100 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.7 kat ($p=0.0135$), MCF10A hücrelerinde 2.6 kat ($p=0.0042$),

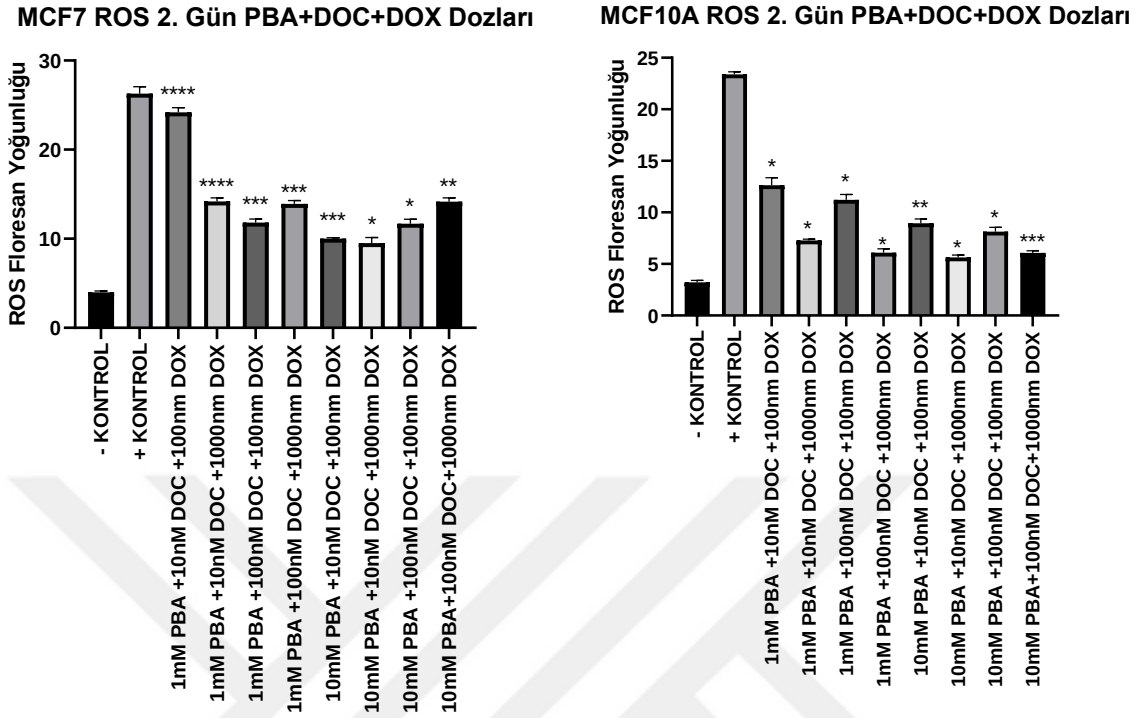
1 mM PBA + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2 kat ($p=0.0310$), MCF10A hücrelerinde 5 kat ($p=0.0108$),

1 mM PBA + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.2 kat ($p=0.0317$), MCF10A hücrelerinde 1.9 kat ($p=0.0125$),

10 mM PBA + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.1 kat ($p=0.0163$), MCF10A hücrelerinde 2.6 kat ($p=0.0133$),

10 mM PBA + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 3.4 kat ($p=0.0102$), MCF10A hücrelerinde 1.9 kat ($p=0.0176$) ROS floresan yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir.

2. günün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinde grup 3'de ise PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarının oksidatif stres (ROS) testi ile DCFDA floresan yoğunluklarının artışı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 28, Tablo 4).



Şekil 28: 2. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri

Grup 3;

1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonlarında MCF7 hücrelerinde 6.1 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 3.9 kat ($p=0.0123$),

1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 3.6 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 2.3 kat ($p=0.0103$),

1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 3 kat ($p=0.0007$), MCF10A hücrelerinde 3.5 kat ($p=0.0100$),

1 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 3.5 kat ($p=0.0003$), MCF10A hücrelerinde 1.9 kat ($p=0.0393$),

10 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.5 kat ($p=0.0003$), MCF10A hücrelerinde 2.8 kat ($p=0.0071$),

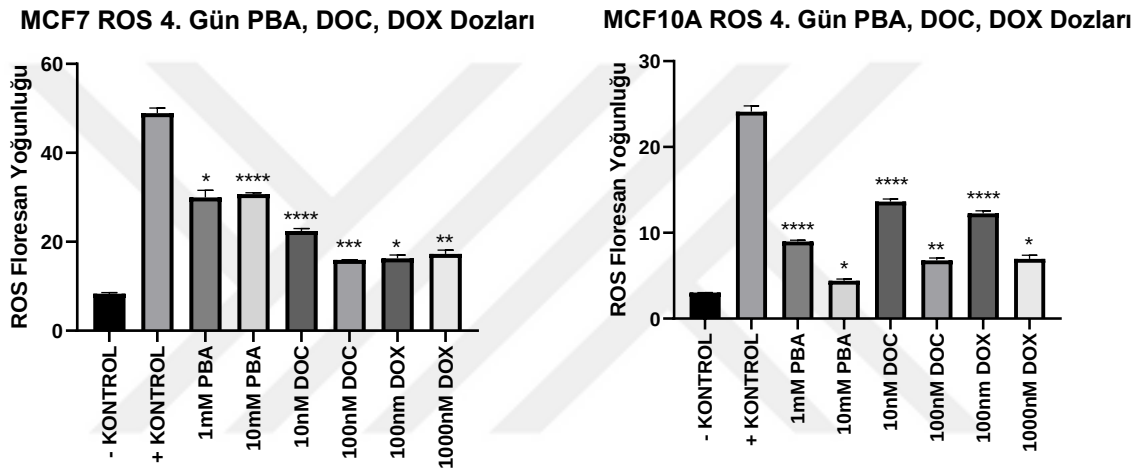
10 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.4 kat ($p=0.0310$), MCF10A hücrelerinde 1.8 kat ($p=0.0229$),

10 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.9 kat ($p=0.0128$), MCF10A hücrelerinde 2.5 kat ($p=0.0140$),

10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 3.6 kat ($p=0.0012$), MCF10A hücrelerinde 1.9 kat ($p=0.001$), kontrol grubuna göre ROS floresan yoğunluklarının arttığı istatistiksel olarak gözlemlenmiştir.

4.3.3. 4. gün (96. saat) ROS Test sonuçları

4. günün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinde grup 1'de PBA, DOC, DOX dozlarının oksidatif stres (ROS) testi ile DCFDA floresan yoğunluklarının artışı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 29, Tablo 4).



Şekil 29: 4. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri

Grup 1;

1 mM PBA dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 3.6 kat ($p=0.0116$), MCF10A hücrelerinde 3 kat ($p<0.0001$),

10 mM PBA dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 3.7 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 1.5 kat ($p=0.0262$),

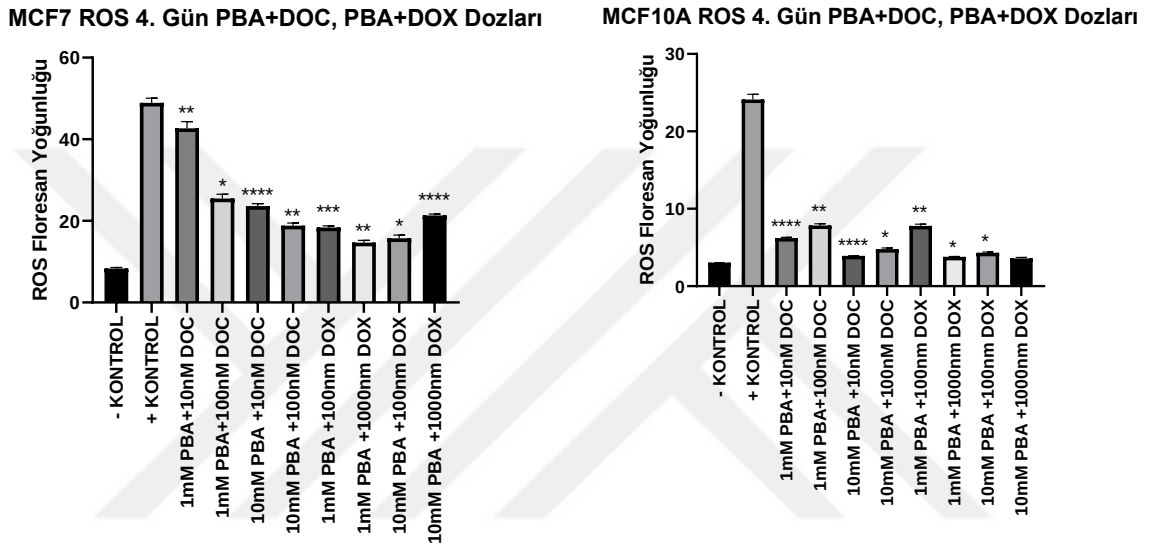
10 nM DOC dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.7 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 4.5 kat ($p<0.0001$),

100 nM DOC dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 1.9 kat ($p=0.0002$), MCF10A hücrelerinde 2.2 kat ($p=0.0092$),

100 nM DOX dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 2 kat ($p=0.0215$), MCF10A hücrelerinde 4 kat ($p<0.0001$),

1000 nM DOX dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.1 kat ($p=0.0085$), MCF10A hücrelerinde 2.3 kat ($p=0.0148$) ROS floresan yoğunluklarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttığı gözlemlenmiştir.

4. günün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinde grup 2’de PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarının oksidatif stres (ROS) testi ile DCFDA floresan yoğunluklarının artışı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 30, Tablo 4).



Şekil 30: 4. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri

Grup 2;

1 mM PBA + 10 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 5.1 kat ($p=0.0036$), MCF10A hücrelerinde 2 kat ($p<0.0001$),

1 mM PBA + 100nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 3.1 kat ($p=0.0115$), MCF10A hücrelerinde 2.6 kat ($p=0.0012$),

10 mM PBA + 10nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.8 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 1.3 kat ($p<0.0001$),

10 mM PBA + 100 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.3 kat ($p=0.0015$), MCF10A hücrelerinde 1.6 kat ($p=0.0119$),

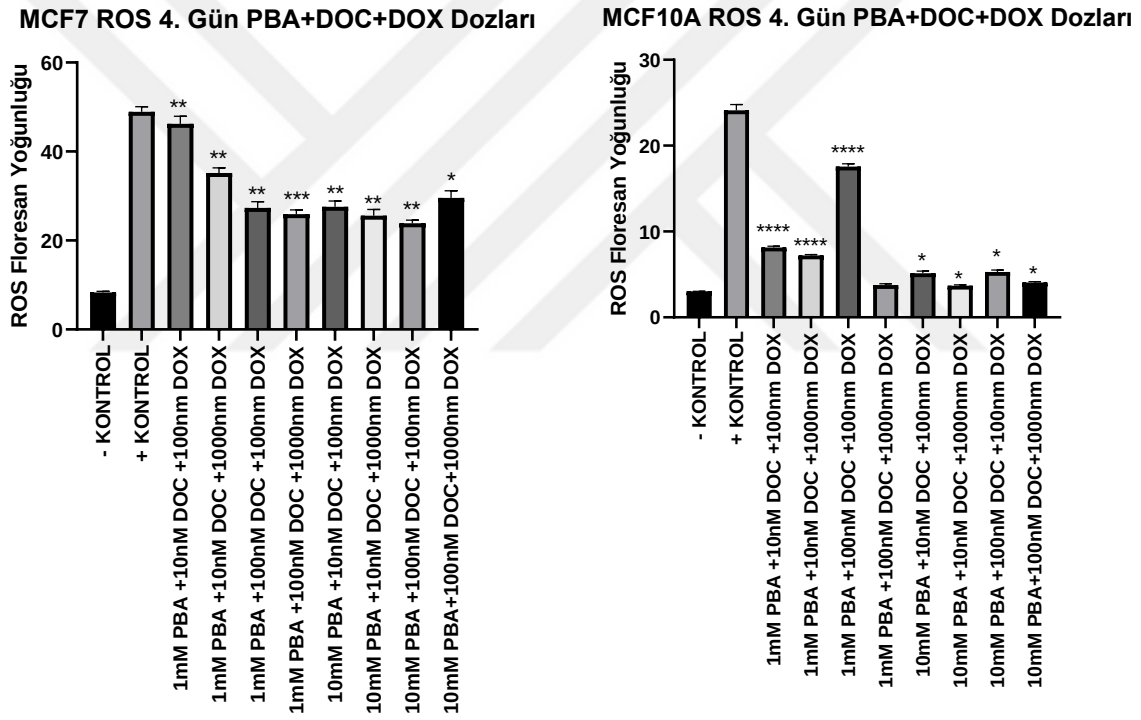
1 mM PBA + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.2 kat ($p=0.0002$), MCF10A hücrelerinde 2.6 kat ($p=0.0021$),

1 mM PBA + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 1.8 kat ($p=0.0046$), MCF10A hücrelerinde 1.2 kat ($p=0.0110$),

10 mM PBA + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 1.9 kat ($p=0.0115$), MCF10A hücrelerinde 1.4 kat ($p=0.0124$),

10 mM PBA + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.6 kat ($p<0.0001$) ROS floresan yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir.

4. günün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinde grup 3’de ise PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarının oksidatif stres (ROS) testi ile DCFDA floresan yoğunluklarının artışı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 31, Tablo 4).



Şekil 31: 4. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri

Grup 3;

1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 5.6 kat ($p=0.0023$), MCF10A hücrelerinde 2.7 kat ($p<0.0001$),

1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 4.2 kat ($p=0.0013$), MCF10A hücrelerinde 2.4 kat ($p<0.0001$),

1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 3.3 kat ($p=0.0074$), MCF10A hücrelerinde 5.8 kat ($p<0.0001$),

1 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 3.1 kat ($p=0.0008$),

10 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 3.3 kat ($p=0.0062$), MCF10A hücrelerinde 1.7 kat ($p=0.0230$),

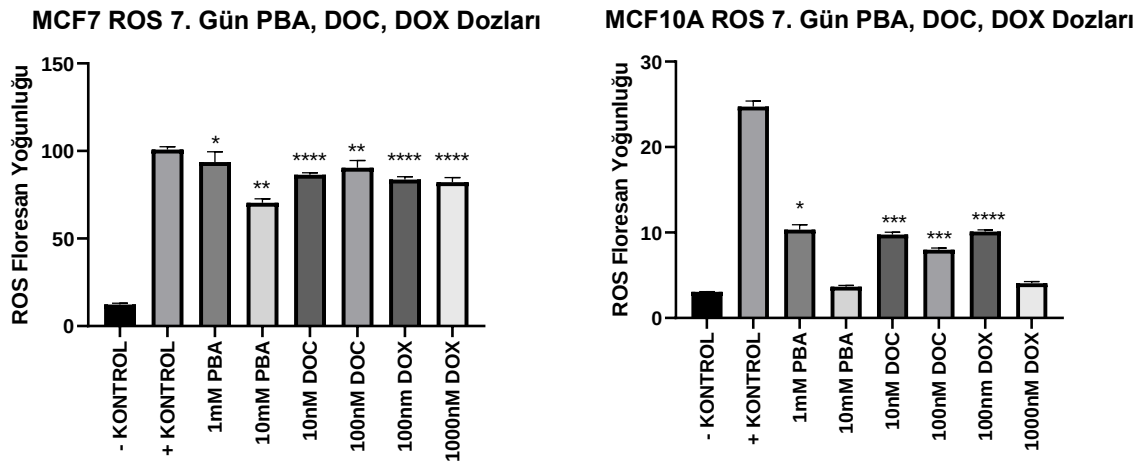
10 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 3.1 kat ($p=0.0091$), MCF10A hücrelerinde 1.2 kat ($p=0.0288$),

10 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 2.9 kat ($p=0.0045$), MCF10A hücrelerinde 1.7 kat ($p=0.0167$),

10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 3.5 kat ($p=0.0130$), MCF10A hücrelerinde 1.3 kat ($p=0.0130$), kontrol grubuna göre ROS floresan yoğunluklarının arttığı istatistiksel olarak gözlemlenmiştir.

4.3.4. 7. gün (168. saat) ROS Test sonuçları

7. günün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinde grup 1'de PBA, DOC, DOX dozlarının oksidatif stres (ROS) testi ile DCFDA floresan yoğunluklarının artışı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 32, Tablo 4).



Şekil 32: 7. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri

Grup 1;

1 mM PBA dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 7.6 kat ($p=0.0109$), MCF10A hücrelerinde 3.4 kat ($p=0.0109$),

10 mM PBA dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 5.7 kat ($p=0.0022$),

10 nM DOC dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 7 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 3.2 kat ($p=0.0010$),

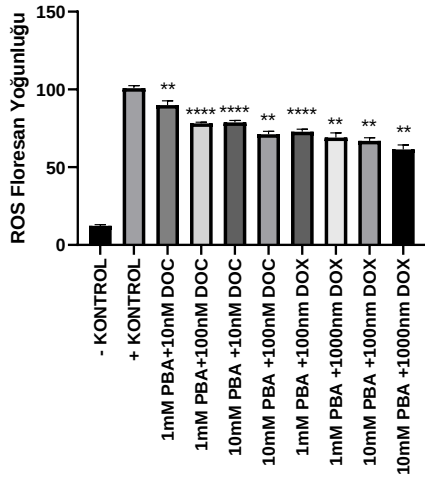
100 nM DOC dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 7.4 kat ($p=0.0064$), MCF10A hücrelerinde 2.6 kat ($p=0.0002$),

100 nM DOX dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 6.8 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 3.3 kat ($p<0.0001$),

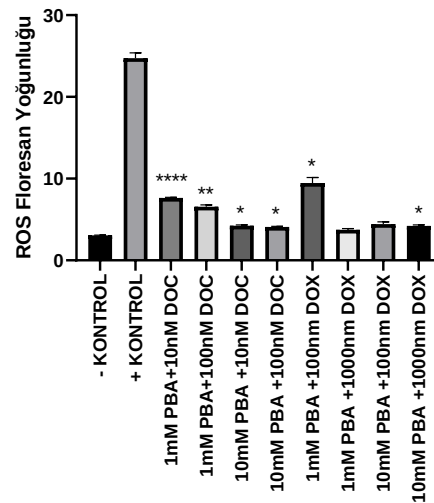
1000 nM DOX dozu uygulanan MCF7 hücrelerinde 6.7 kat ($p<0.0001$) ROS floresan yoğunluklarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttığı gözlemlenmiştir.

7. günün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinde grup 2'de PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarının oksidatif stres (ROS) testi ile DCFDA floresan yoğunluklarının artışı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 33, Tablo 4).

MCF7 ROS 7. Gün PBA+DOC, PBA+DOX Dozları



MCF10A ROS 7. Gün PBA+DOC, PBA+DOX Dozları



Şekil 33: 7. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC, PBA+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri

Grup 2;

1 mM PBA + 10 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 7.3 kat ($p=0.0016$), MCF10A hücrelerinde 2.5 kat ($p<0.0001$),

1 mM PBA + 100 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 6.4 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 2.2 kat ($p=0.0092$),

10 mM PBA + 10 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 6.4 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 1.4 kat ($p=0.0233$),

10 mM PBA + 100 nM DOC doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 5.8 kat ($p=0.0013$), MCF10A hücrelerinde 1.3 kat ($p=0.0182$),

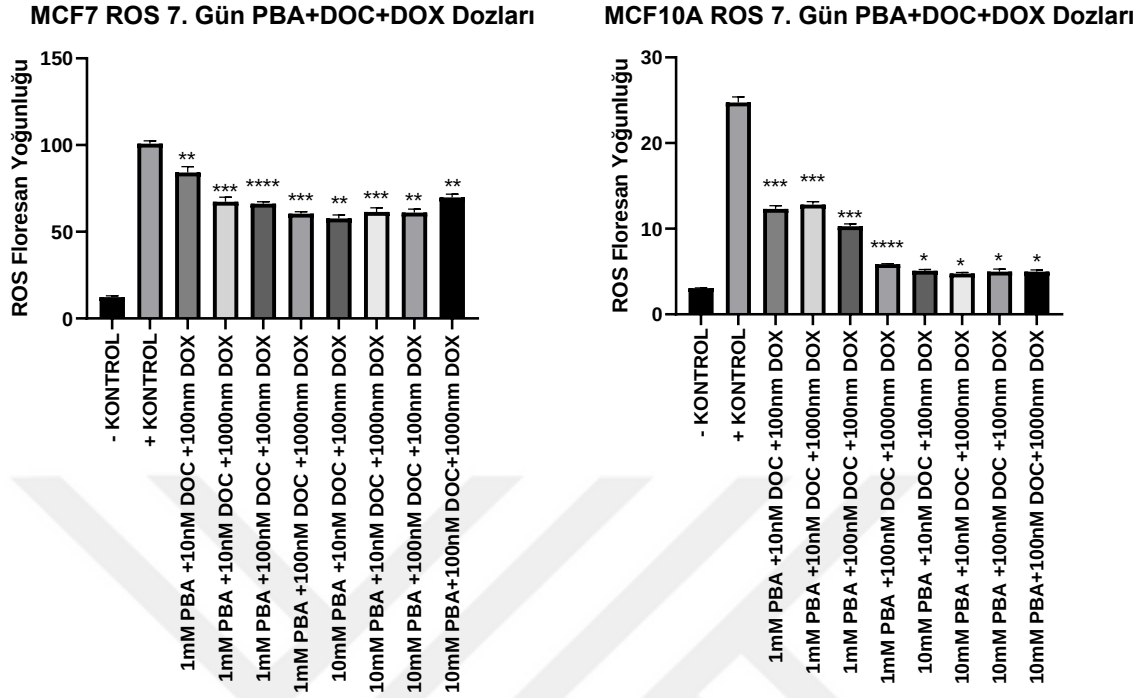
1 mM PBA + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 5.9 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 3.1 kat ($p=0.0192$),

1 mM PBA + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 5.6 kat ($p=0.0094$),

10 mM PBA + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 5.4 kat ($p=0.0014$),

10 mM PBA + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 5 kat ($p=0.0126$), MCF10A hücrelerinde 1.4 kat ($p=0.0250$) ROS floresan yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir.

7. günün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinde grup 3'de ise PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarının oksidatif stres (ROS) testi ile DCFDA floresan yoğunluklarının artışı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 34, Tablo 4).



Şekil 34: 7. gün sonunda MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testi grafikleri

Grup 3;

1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 6.8 kat ($p=0.0062$), MCF10A hücrelerinde 4.1 kat ($p=0.0007$),

1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 5.5 kat ($p=0.0004$), MCF10A hücrelerinde 4.2 kat ($p=0.0003$),

1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 5.4 kat ($p<0.0001$), MCF10A hücrelerinde 3.4 kat ($p=0.0006$),

1 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 5 kat ($p=0.0005$), MCF10A hücrelerinde 2 kat ($p<0.0001$),

10 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 4.7 kat ($p=0.0072$), MCF10A hücrelerinde 1.7 kat ($p=0.0139$),

10 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 5 kat ($p=0.0003$), MCF10A hücrelerinde 1.6 kat ($p=0.0117$),

10 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 5 kat ($p=0.0045$), MCF10A hücrelerinde 1.6 kat ($p=0.0372$),

10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX doz kombinasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinde 5.7 kat ($p=0.0013$), MCF10A hücrelerinde 1.6 kat ($p=0.0117$) kontrol grubuna göre ROS floresan yoğunluklarının arttığı istatistiksel olarak gözlemlenmiştir.

Tablo 4: 1. gün (24 saat), 2. gün (48 saat), 4. gün (96 saat), 7. gün (168 saat) sonunda, MCF7 ve MCF10A hücrelerinin PBA, DOC, DOX dozlarının, PBA+DOC, PBA+DOX ve PBA+DOC+DOX doz kombinasyonlarından elde edilen kontrole göre DCFDA floresan yoğunluklarını içeren ROS testinin katlı sonuçları

	1. Gün		2. Gün		4. Gün		7. Gün	
	MCF-7	MCF-10A	MCF-7	MCF-10A	MCF-7	MCF-10A	MCF-7	MCF-10A
1 mM PBA	1.8 *	4.1 ***	5.8 **	4.5 *	3.6 *	3.0 ****	7.6 *	3.4 *
10 mM PBA	2.7 **	2.3 *	6.0 ****	2.7 **	3.7 ****	1.5 *	5.7 **	1.2
10 nM DOC	2.6 **	4.0 *	3.8 ****	4.7 ****	2.7 ****	4.5 ****	7.0 ****	3.2 ***
100 nM DOC	2.5 **	3.5 ****	3.6 ****	3.5 **	1.9 ***	2.2 **	7.4 **	2.6 ***
100 nM DOX	2.3 **	4.7 **	2.9 **	5.5 ****	2.0 *	4.0 ****	6.8 ****	3.3 ****
1000 nM DOX	2.3 *	2.9 **	4.4 ****	3.3 **	2.1 **	2.3 *	6.7 ****	1.3
1 mM PBA + 10 nM DOC	2.5 ****	3.0 *	5.1 **	3.1 **	5.1 **	2.0 ****	7.3 **	2.5 ****
1 mM PBA + 100 nM DOC	2.5 ****	2.7 *	3.1 **	2.6 ****	3.1 *	2.6 **	6.4 ****	2.2 **
10 mM PBA + 10 nM DOC	2.4 **	2.1 ****	2.2 ****	2.3 ****	2.8 ****	1.3 ****	6.4 ****	1.4 *
10 mM PBA + 100 nM DOC	2.2 ****	2.5 *	2.7 *	2.6 **	2.3 **	1.6 *	5.8 **	1.3 *
1 mM PBA + 100 nM DOX	2.2 **	3.9 *	2.0 *	5.0 *	2.2 ***	2.6 **	5.9 ****	3.1 *
1 mM PBA + 1000 nM DOX	2.1 *	1.7 *	2.2 *	1.9 *	1.8 **	1.2 *	5.6 **	1.2
10 mM PBA + 100 nM DOX	2.2 *	2.3 *	2.1 *	2.6 *	1.9 *	1.4 *	5.4 **	1.4
10 mM PBA + 1000 nM DOX	2.2 **	1.5 *	3.4 *	1.9 *	2.6 ****	1.2	5.0 **	1.4 *
1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX	2.5 ***	3.6 **	6.1 ****	3.9 *	5.6 **	2.7 ****	6.8 **	4.1 ***
1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX	3.0 ****	2.1	3.6 ****	2.3 *	4.2 **	2.4 ****	5.5 ***	4.2 ***
1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX	2.2 ***	3.9 ***	3.0 ***	3.5 *	3.3 **	5.8 ****	5.4 ****	3.4 ***
1 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX	2.1 *	1.6 *	3.5 ***	1.9 *	3.1 ***	1.2	5.0 ***	2.0 ****
10 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX	2.2 ***	2.6 *	2.5 ***	2.8 **	3.3 **	1.7 *	4.7 **	1.7 *
10 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX	2.2 *	1.7 *	2.4 *	1.8 *	3.1 **	1.2 *	5.0 ***	1.6 *
10 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX	2.7 *	2.4 **	2.9 *	2.5 *	2.9 **	1.7 *	5.0 **	1.6 *
10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX	2.2 **	1.6	3.6 **	1.9 ***	3.5 *	1.3 *	5.7 **	1.6 *

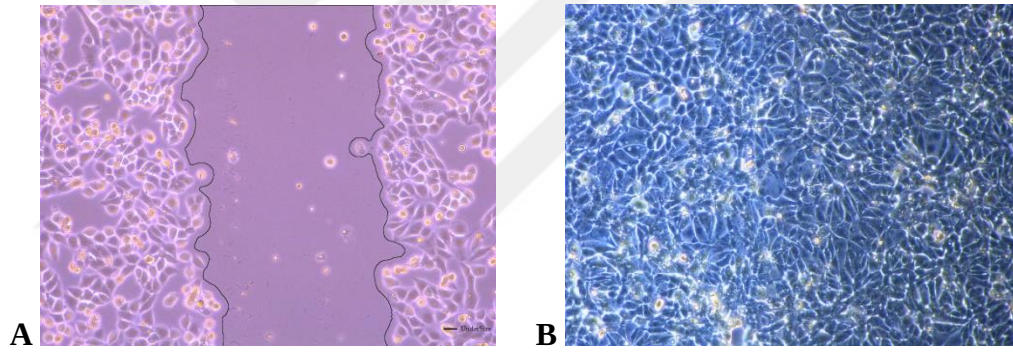
4.4. HÜCRE MİGRASYONU SONUÇLARI

MCF7 çalışmalarında; kontrol hücreleri ve 1 mM PBA içeren hücreler 4. günde %100 olarak tamamen tüm yarığı kapatmıştır (Şekil 35, Şekil 36). 10 mM PBA içeren hücreler ise 7. gün sonunda %61.83 oranında yarığı kapatmıştır ($p<0.0001$), (Şekil 37). 100 nM DOX içeren hücre grubu 4. gün sonunda %25.19 kapanma sağladıktan sonra ($p<0.0001$) hücreler ölerek dağılmaya başlamıştır. Diğer çalışma gruplarda 10 nM DOC (Şekil 38-A), 1 mM PBA + 100 nM DOX (Şekil 40-A), 1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX (Şekil 40-A) dozlarında 4. günden itibaren yara kapanmanın tersine açılma görülmüş ve 7. gün sonunda tamamen ölüme geçmiştirler (Şekil 43, Şekil 44, Şekil 45) ($p<0.0001$).

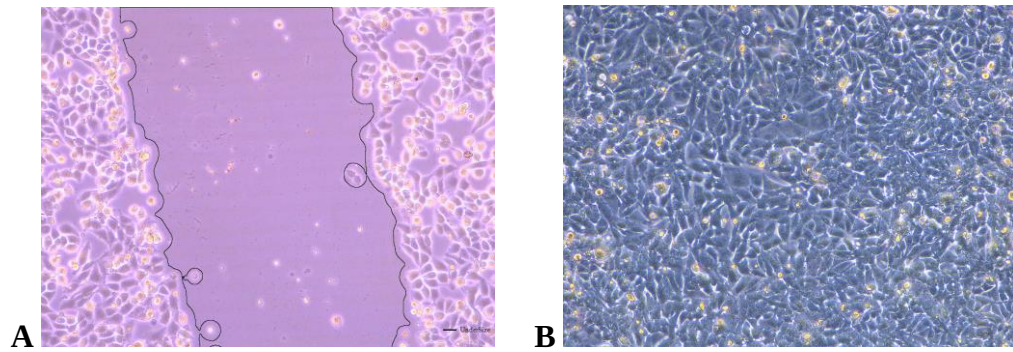
100 nM DOC (Şekil 38-B), 1000 nM DOX (Şekil 38-D), 1 mM PBA + 10 nM DOC (Şekil 39-A), 10 mM PBA + 10 nM DOC (Şekil 39-C), 10 mM PBA + 100 nM DOC (Şekil

39-D) dozlarında 2. günden itibaren yara kapanmanın tersine açılma görülmüş ve 7. gün sonunda tamamen ölüme geçmişlerdir (Şekil 43, Şekil 44) ($p<0.0001$).

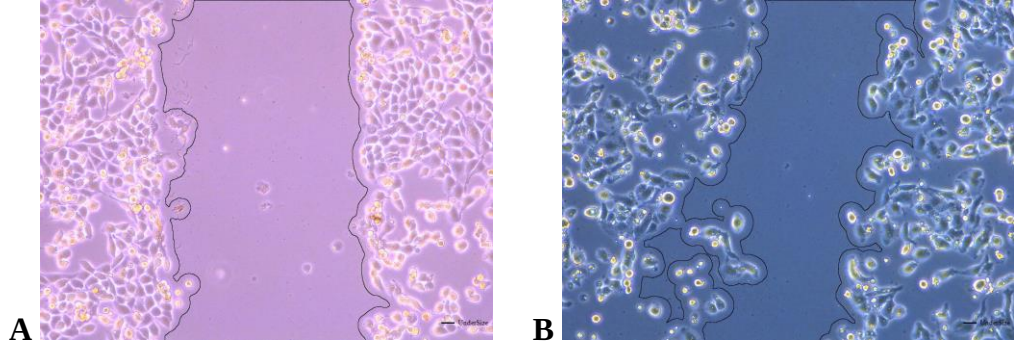
1 mM PBA + 100 nM DOC (Şekil 39-B), 1 mM PBA + 1000 nM DOX (Şekil 40-B), 10 mM PBA + 100 nM DOX (Şekil 40-C), 10 mM PBA + 1000 nM DOX (Şekil 40-D), 1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX (Şekil 41-B), 1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX (Şekil 41-C), 1 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX (Şekil 41-D), 10 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX (Şekil 42-A), 10 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX (Şekil 42-B), 10 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX (Şekil 42-C), 10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX (Şekil 42-D) dozlarında 1. günden itibaren yara kapanmanın tersine açılma görülmüş ve 7. gün sonunda tamamen ölüme geçmişlerdir (Şekil 44, Şekil 45) ($p<0.0001$).



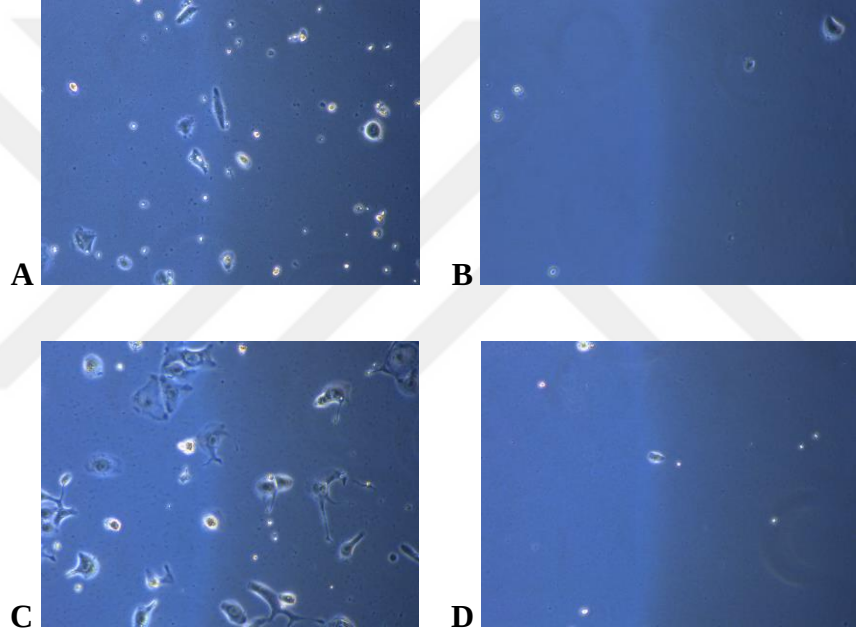
Şekil 35: MCF7 kontrol hücrelerinin 0. gün (A) ve 4. gün (B) yara kapanma sonuçları (Büyütme: 10X)



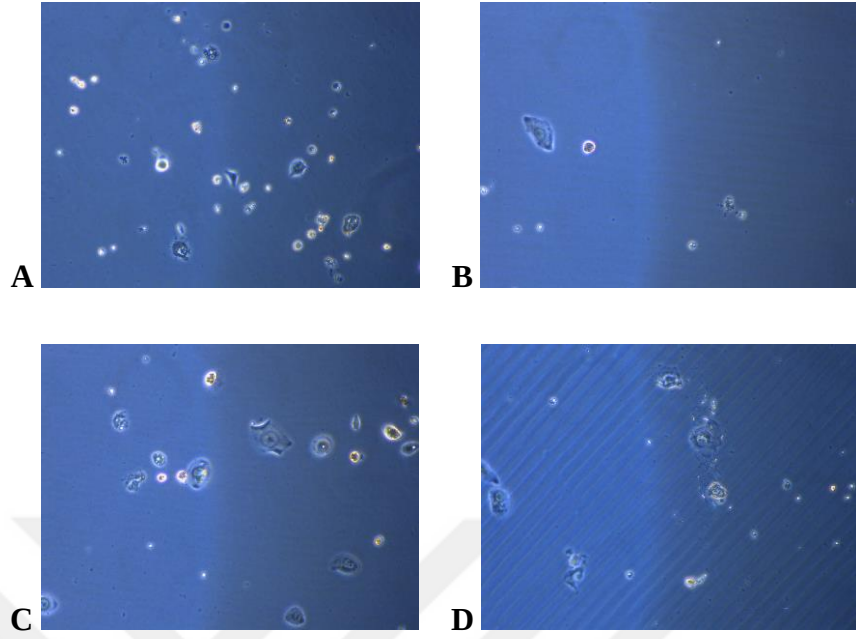
Şekil 36: 1 mM PBA dozu kullanılan MCF7 hücrelerinin 0. gün (A) ve 4. gün (B) yara kapanma sonuçları (Büyütme: 10X)



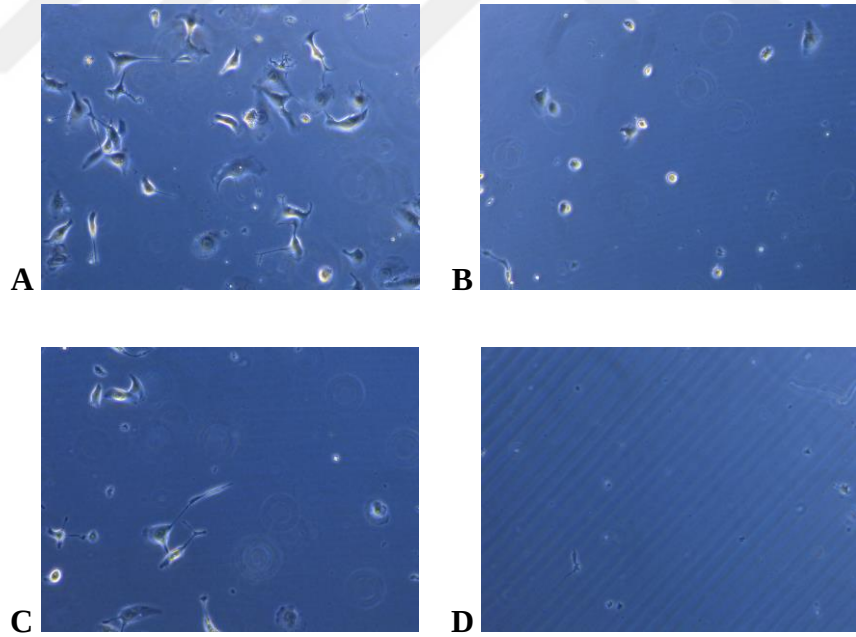
Şekil 37: 10 mM PBA dozu kullanılan MCF7 hücrelerinin 0. gün (A) ve 7. gün (B) yara kapanma sonuçları (Büyütme: 10X)



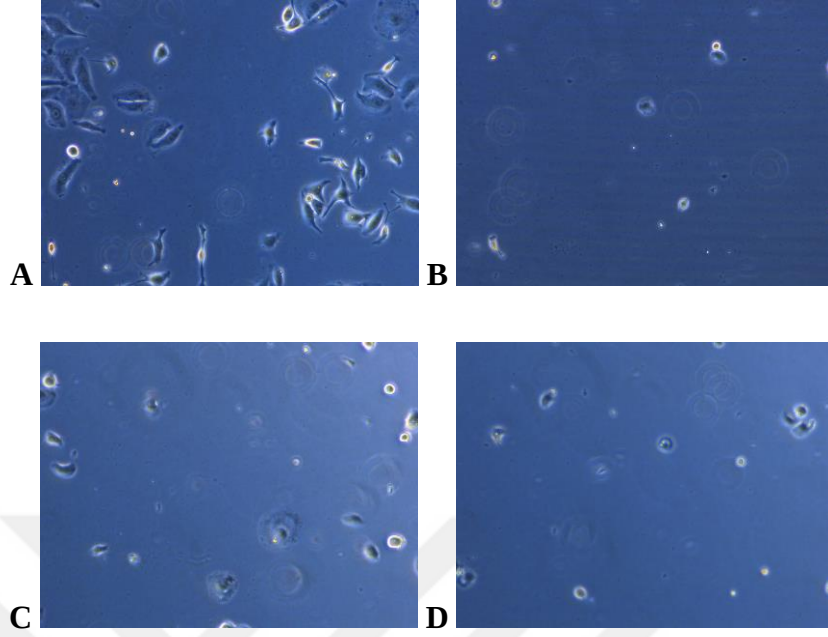
Şekil 38: 7. gün sonunda 10 nM DOC (A), 100 nM DOC (B), 100 nM DOX (C), 1000 nM DOX (D) doza sahip MCF7 hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X)



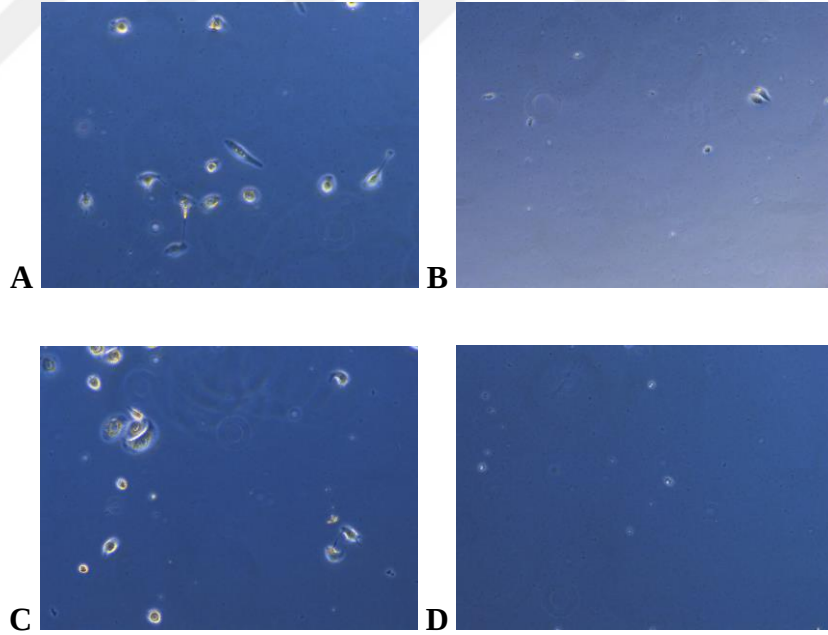
Şekil 39: 7. gün sonunda 1 mM PBA + 10 nM DOC (A), 1 mM PBA + 100 nM DOC (B), 10 mM PBA + 10 nM DOC (C), 10 mM PBA + 100 nM DOC (D) doza sahip MCF7 hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X)



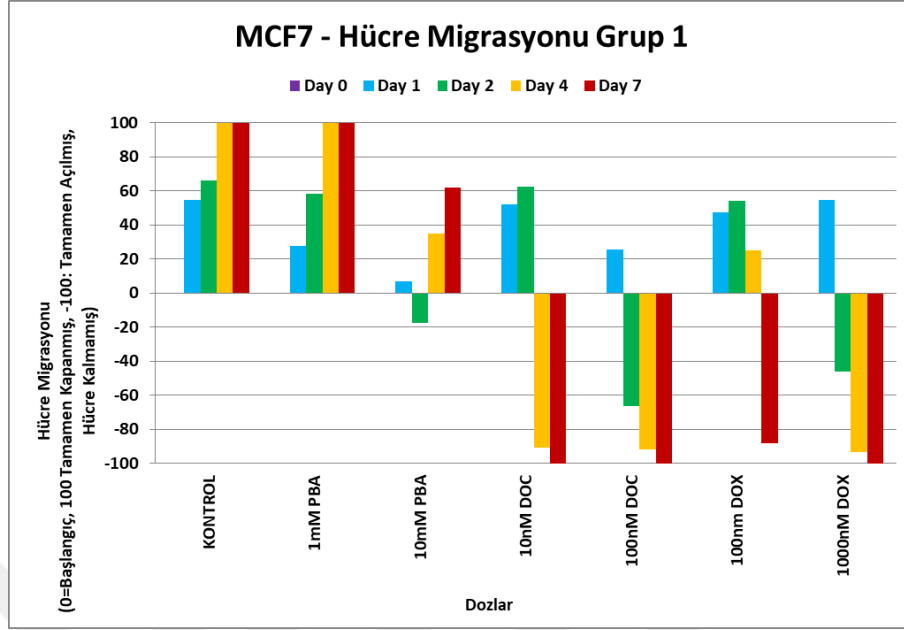
Şekil 40: 7. gün sonunda 1 mM PBA + 100 nM DOX (A), 1 mM PBA + 1000 nM DOX (B), 10 mM PBA + 100 nM DOX (C), 10 mM PBA + 1000 nM DOX (D) doza sahip MCF7 hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X)



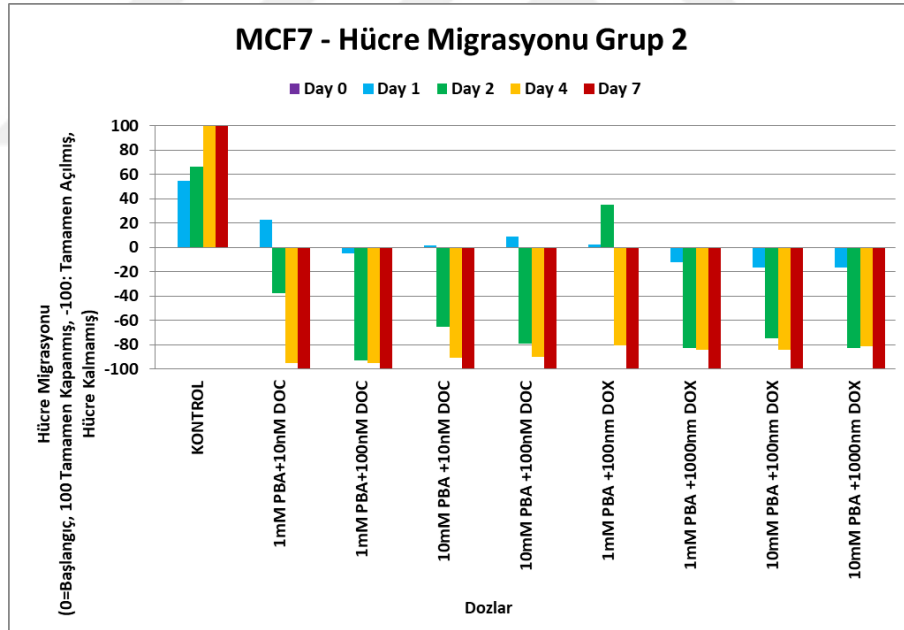
Şekil 41: 7. gün sonunda 1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX (A), 1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX (B), 1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX (C), 1 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX (D) doza sahip MCF7 hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X)



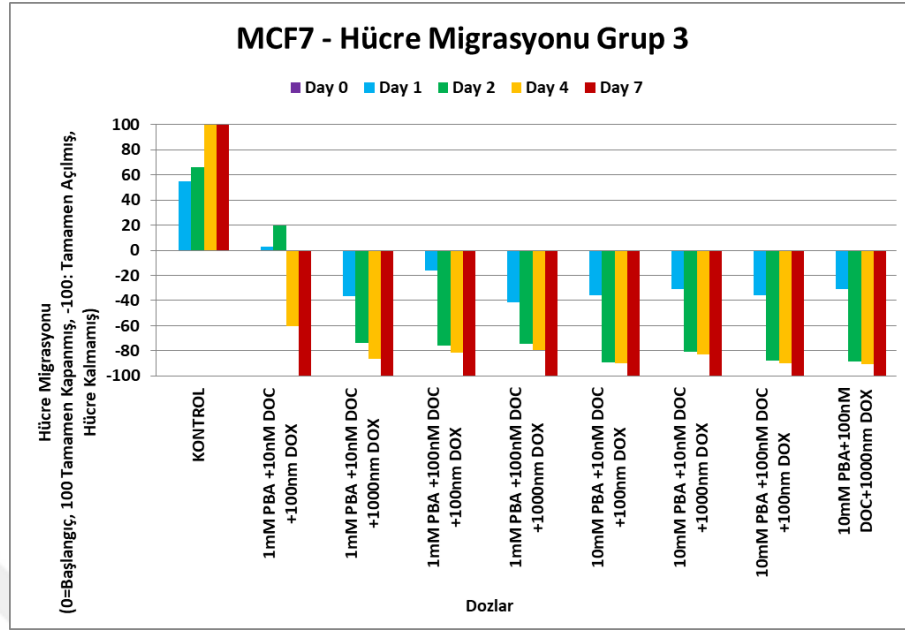
Şekil 42: 7. gün sonunda 10 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX (A), 10 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX (B), 10 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX (C), 10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX (D) doza sahip MCF7 hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X)



Şekil 43: MCF7 Grup 1 Hücrelerinin Hücre Migrasyonu



Şekil 44: MCF7 Grup 2 Hücrelerinin Hücre Migrasyonu

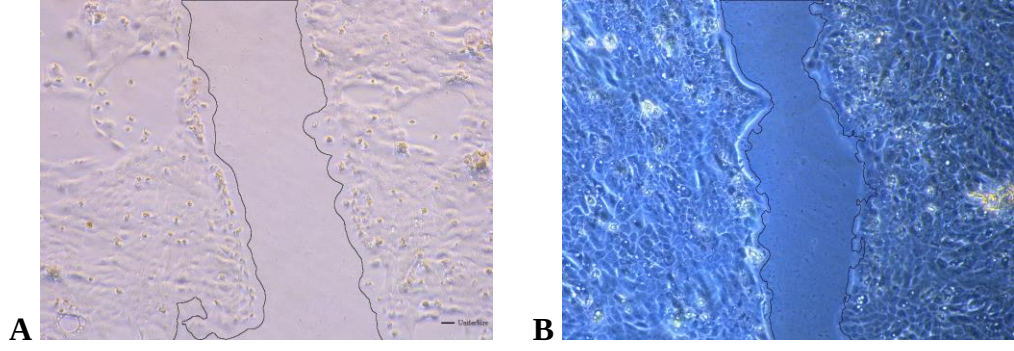


Şekil 45: MCF7 Grup 3 Hücrelerinin Hücre Migrasyonu

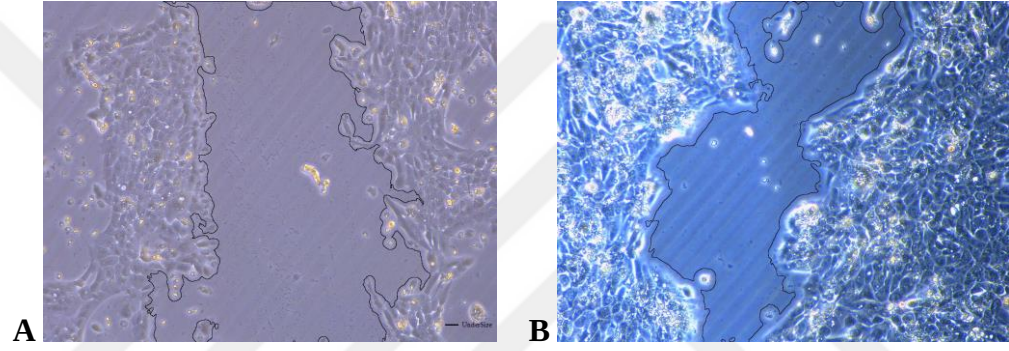
MCF10A çalışmalarında; kontrol hücrelerde %41.72 oranında, 10 nM DOC içeren hücrelerde %32.98 oranında, 100 nM DOX içeren hücrelerde %100 kapanma görülmüştür ($p<0.0001$). 4. günün sonunda 1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX içeren hücrelerde %10.46 oranında kapanma olmasına rağmen 7. sonunda tamamen ölüme gitmiş ve yara açılmıştır ($p<0.0001$). Diğer grupların ise 2. gün sonrasında parçalanma yaşayarak ölüme gittiği gözlemlenmiştir ($p<0.0001$).

Bu gruplardan 1 mM PBA (Şekil 49-A), 10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX (Şekil 53-D) dozlarında 4. günden itibaren yara kapanmanın tersine açılma görülmüş ve 7. gün sonunda tamamen ölüme geçmişlerdir (Şekil 54, Şekil 56) ($p<0.0001$).

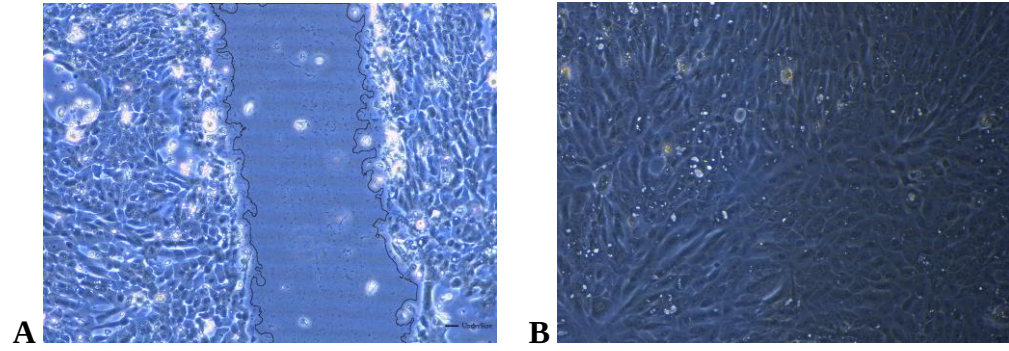
10 mM PBA (Şekil 49-B), 1 mM PBA + 10 nM DOC (Şekil 50-A), 1 mM PBA + 100 nM DOC (Şekil 50-B), 10 mM PBA + 10 nM DOC (Şekil 50-C), 10 mM PBA + 100 nM DOC (Şekil 50-D), 1 mM PBA + 100 nM DOX (Şekil 51-A), 10 mM PBA + 1000 nM DOX (Şekil 51-D), 1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX (Şekil 52-A), 1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX (Şekil 52-B), 10 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX (Şekil 53-B), 10 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX (Şekil 53-C), dozlarında 1. günden itibaren yara kapanmanın tersine açılma görülmüş ve 7. gün sonunda tamamen ölüme geçmişlerdir (Şekil 54, Şekil 55, Şekil 56) ($p<0.0001$).



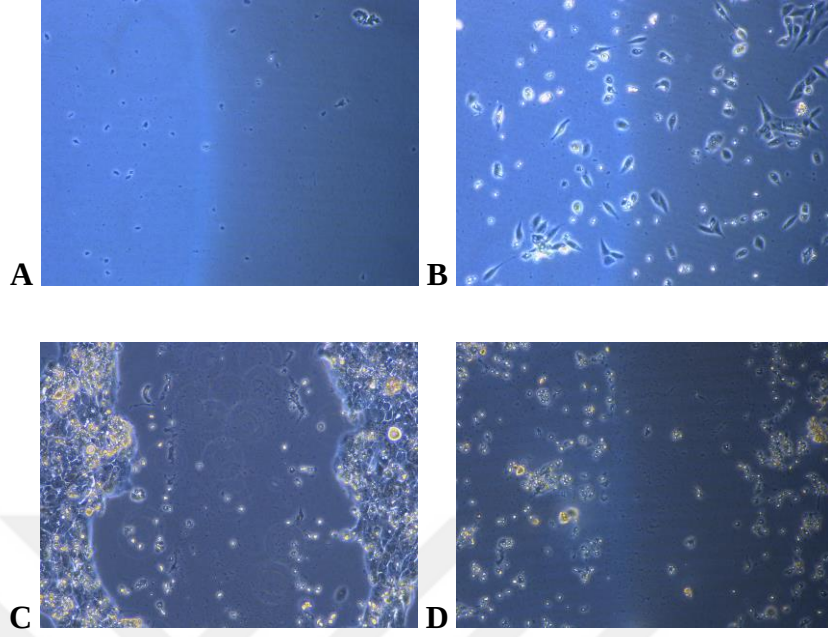
Şekil 46: MCF10A kontrol hücrelerinin 0. gün (A) ve 7. gün (B) yara kapanma sonuçları (Büyütme: 10X)



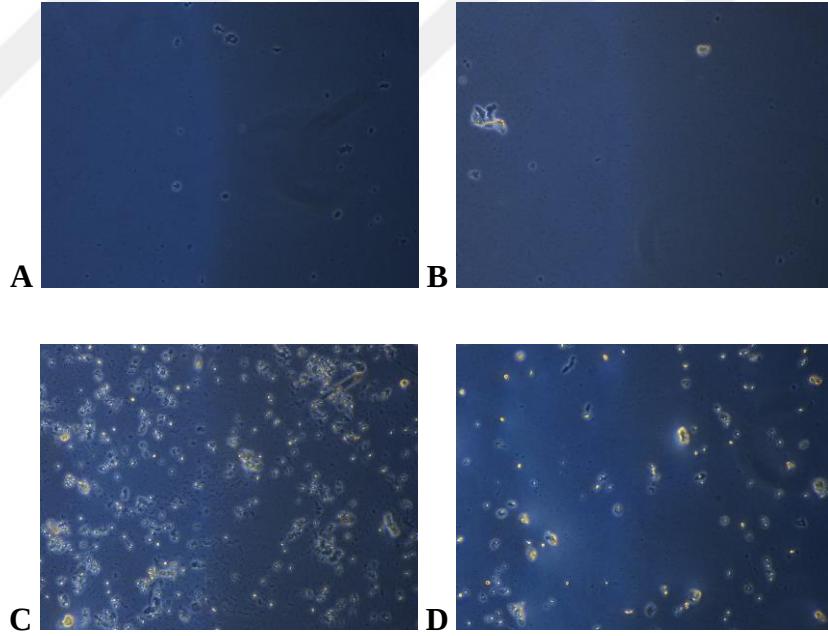
Şekil 47: 10 nM DOX dozu içeren MCF10A hücrelerinin 0. gün (A) ve 7. gün (B) yara kapanma sonuçları (Büyütme: 10X)



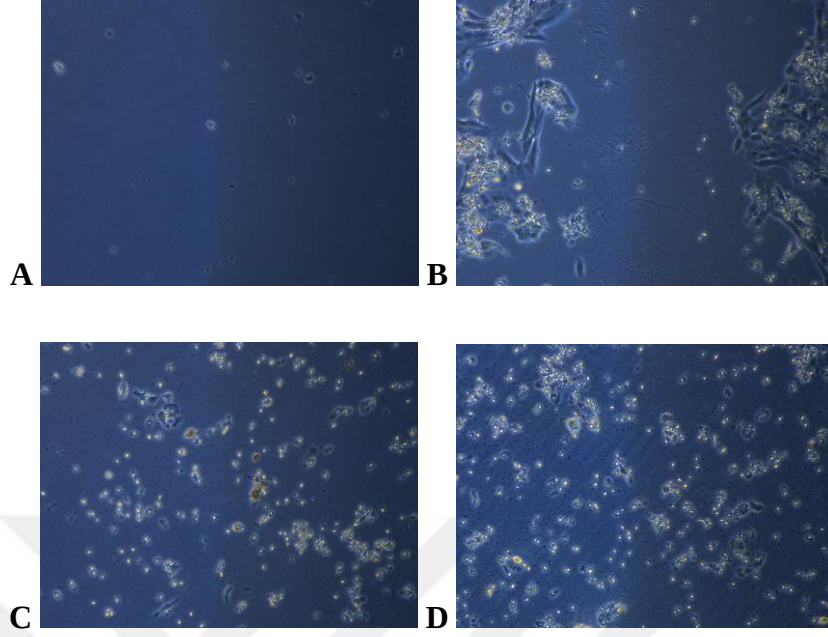
Şekil 48: 100 nM DOX dozu içeren MCF10A hücrelerinin 0. gün (A) ve 7. gün (B) yara kapanma sonuçları (Büyütme: 10X)



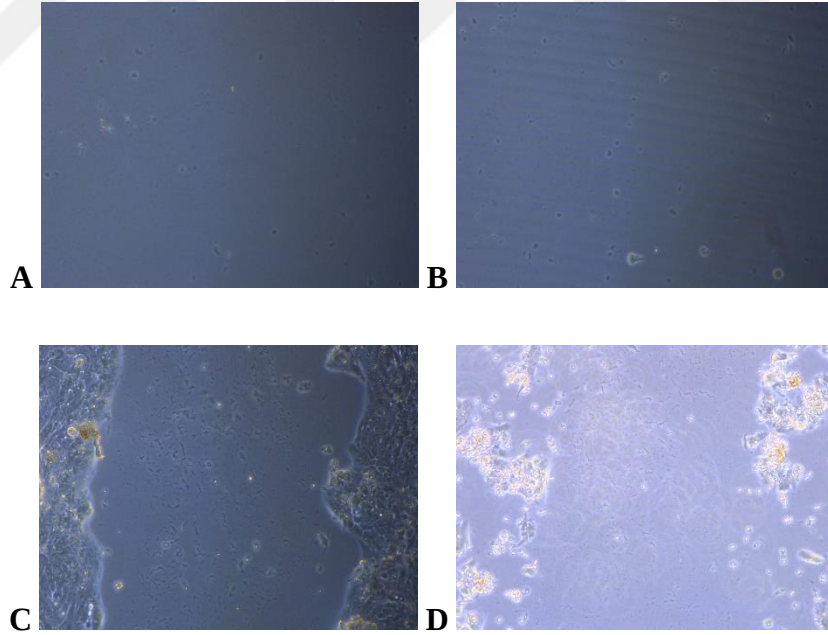
Şekil 49: 7. gün sonunda 1 mM PBA (A), 10 mM PBA (B), 100 nM DOX (C), 1000 nM DOX (D) doza sahip MCF10A hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X)



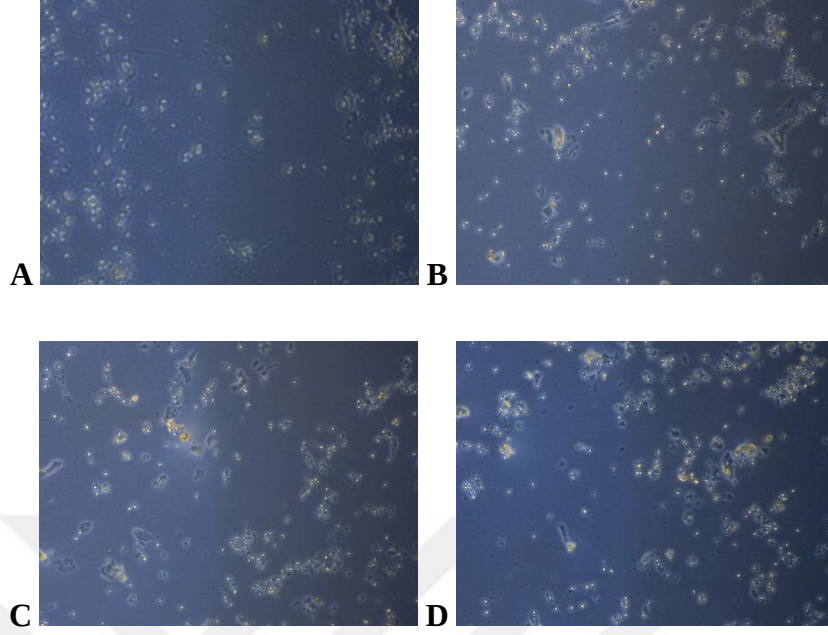
Şekil 50: 7. gün sonunda 1 mM PBA + 10 nM DOX (A), 1 mM PBA + 100 nM DOX (B), 10 mM PBA + 10 nM DOX (C), 10 mM PBA + 100 nM DOX (D) doza sahip MCF10A hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X)



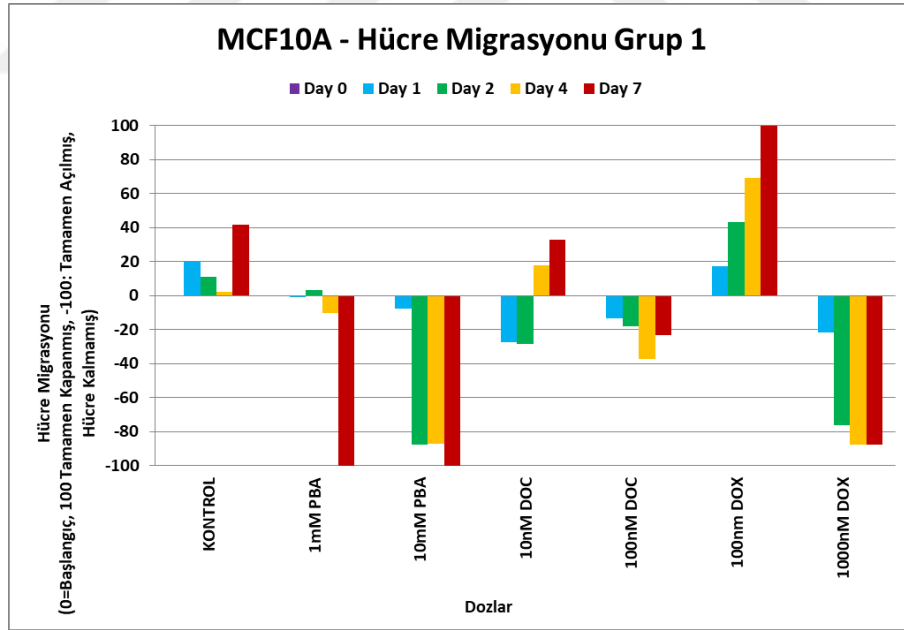
Şekil 51: 7. gün sonunda 1 mM PBA + 100 nM DOX (A), 1 mM PBA + 1000 nM DOX (B), 10 mM PBA + 100 nM DOX (C), 10 mM PBA + 1000 nM DOX (D) doza sahip MCF10A hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X)



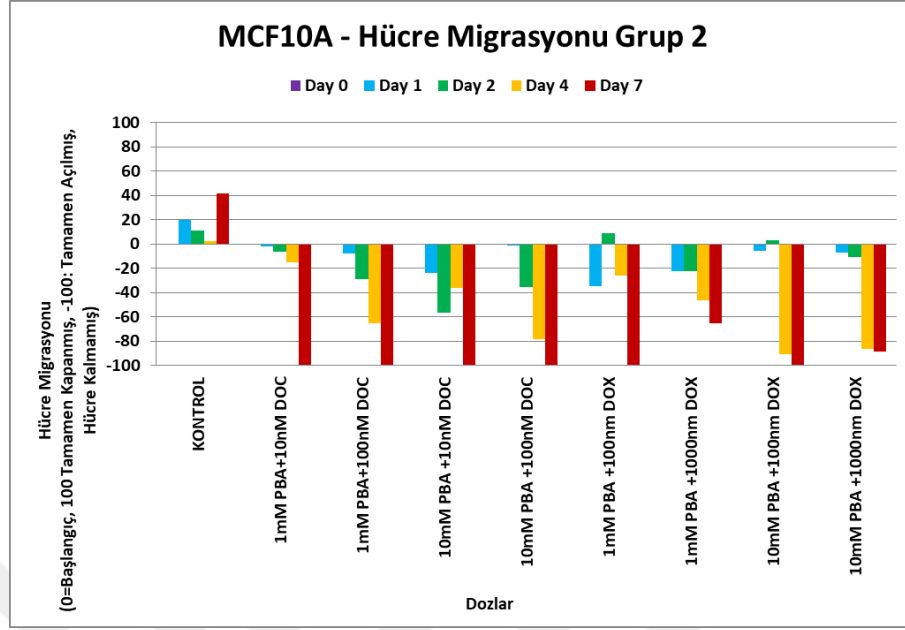
Şekil 52: 7. gün sonunda 1 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX (A), 1 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX (B), 1 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX (C), 1 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX (D) doza sahip MCF10A hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X)



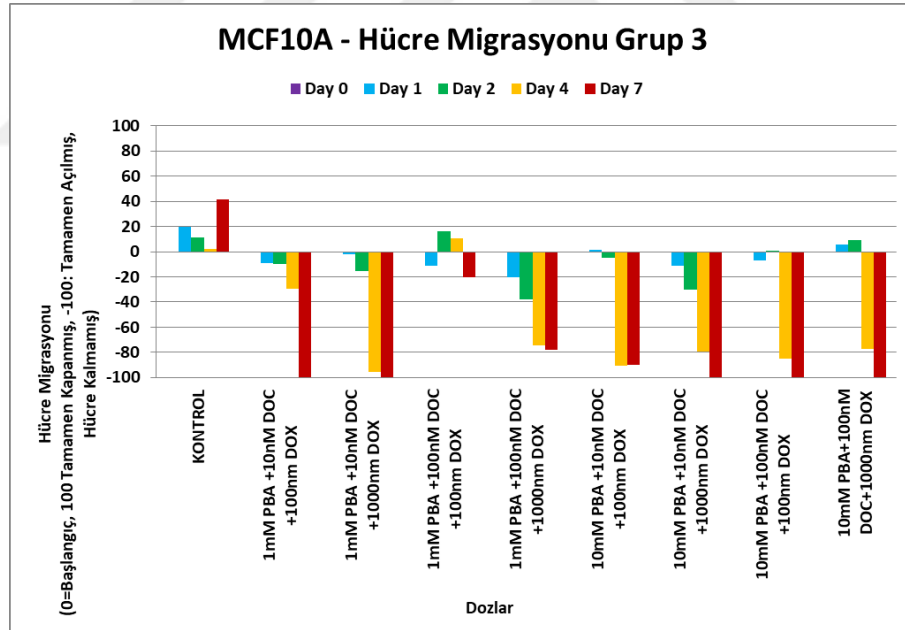
Şekil 53: 7. gün sonunda 10 mM PBA + 10 nM DOC + 100 nM DOX (A), 10 mM PBA + 10 nM DOC + 1000 nM DOX (B), 10 mM PBA + 100 nM DOC + 100 nM DOX (C), 10 mM PBA + 100 nM DOC + 1000 nM DOX (D) doza sahip MCF10A hücrelerinin görüntüsü (Büyütme: 10X)



Şekil 54: MCF10A Grup 1 Hücrelerinin Hücre Migrasyonu



Şekil 55: MCF10A Grup 2 Hücrelerinin Hücre Migrasyonu



Şekil 56: MCF10A Grup 3 Hücrelerinin Hücre Migrasyonu

5. TARTIŞMA

Genel olarak, mevcut kanser tedavilerinin çoğu, birincil tümör hücrelerinin hızlı çoğalmasını kontrol etmektedir. Bununla birlikte, geleneksel terapötikler tümörjenik hücreler için yeterince seçici değildir. Potansiyel bir terapötik bileşik, normal, sağlıklı hücrelerden kaçınırken tümör hücrelerini seçici olarak etkilerse, normal dokulara verilen hasar önemli ölçüde azaltılabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, oldukça seçici ve toksik olmayan bileşikler tanımlanmasının çok önemli olduğu vurgulanmıştır [73].

Borik asit, karbona benzer yapısal özelliklere sahip hafif bir organik Lewis asididir ve birçok karbon içeren substrat için rekabetçi bir inhibitör görevi görmesine izin verir. Birkaç çalışma [6, 56], Fenilboronik asitin (PBA) kanser hücrelerinin metastatik ve proliferatif özelliklerini hedeflemede borik asitten daha güçlü olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmalar, PBA'nın insan prostat ve meme kanseri hücre göçünü seçici olarak inhibe edebildiğini ve kanser hücresi canlılığını azaltabildiğini belirtmişlerdir. PBA'nın kanser hücresi canlılığını uzun vadede azaltırken kısa vadede seçici bir göç karşıtı yanıt ortaya çıkarma yeteneği, onu yeni bir kanser karşıtı tedavi için umut verici bir aday haline getirir. İn vivo antitümör sonuçları, PBA ile zenginleştirilmiş nanopartiküllerin, tümör büyümesini kısıtlamada ve tümör taşıyan farelerin hayatta kalma süresini uzatmada serbest ilaçlardan daha üstün etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir [61].

5.1. CANLILIK

PBA'nın kanser hücrelerini güçlü bir şekilde proliferasyonu inhibe ettiği çalışmalarda gösterilmiştir [54]. Elegdebe ve ark. [59] 1 mM PBA dozu proliferasyon deneylerinde MCF-7 hücrelerini 5. günde %70 oranında canlılığı düşürdüğünü, başka bir çalışmada ise Bradke ve ark. [6] ZR-75-1 meme kanseri hücre hattında yapılan çalışmalarda 8 gün sonunda 1 mM PBA dozu %30 oranında, 1 mM BA %5 oranında canlılıkları düşürdüğünü göstermişlerdir, fakat MCF-10A hücrelerinde ise istatistiksel olarak canlılıklarını düşürmediği görülmüştür. Çalışmamızda Elegdebe ve ark. [59] yaptığı çalışmaya paralel bir şekilde 1mM PBA dozunun MCF-7 hücrelerinde istatistiksel olarak canlılık oranlarının düştüğü görülmüştür. Elegdebe ve

ark. [59] 1mM PBA'nın MCF-7 hücrelerinde ZR-75-1 hücrelerine göre daha yüksek etki gösterdiğini göstermişlerdir. Bradke ve ark. [6] elde etmiş olduğu sonuçlara göre çalışmamızda MCF-7 hücrelerinde daha yüksek etki görmemiz bu etkiyi açıklamaktadır. MCF-10A hücrelerinde ise her iki dozun da sadece 4. günde istatistiksel olarak canlılığı düşürdüğü tespit edilmiştir.

Taksan ilaçlarından olan paklitaksel (Taxol®) ve yarı sentetik türevi olan docetaxel (DOC) (Taxotere®) meme kanserinin tedavisinde kritik öneme sahiptirler [42, 62]. Mikrotübüller, mitoz, hücre şeklinin korunması, hücre içi taşıma, hareketlilik ve hücre sinyali dahil olmak üzere çok sayıda temel hücresel işlevde yer alan hücre iskeletinin bileşenleridir. Hücrelerde kolayca polimerize olan ve depolimerize olan α -tübülün ve β -tübülün heterodimerlerinden oluşurlar. Tübülün inhibitörleri genellikle, tübülün polimerizasyonunu veya depolimerizasyonunu teşvik edip etmediklerine bağlı olarak mikrotübül stabilize edici veya dengesizleştirici ajanlar (paclitaxel, docetaxel, and epothilones gibi) olarak sınıflandırılır [74]. Wang ve ark. [75] MCF-7 hücrelerinde 1 gün sonunda 10 nM DOC dozunda %20, 100 nM DOC dozunda ise %50 oranında, Morse ve ark. ise [91] aynı şekilde MCF7 hücrelerinde 3 günün sonunda 10 nM DOC dozu %28, 100 nM DOC dozunda ise %99 oranında hücre canlılıklarının düştüğü gözlemlenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız 10 nM ve 100 nM DOC dozları yüksek oranda canlılıkları düşürdüğü ve yüksek DOC dozunun daha etkili olduğu görülmüştür, bu sonuçlar yukarıdaki literatürler ile uyumlu sonuçlar göstermiştir. Morse ve ark. [91] MCF-10A hücrelerinde 3 günün sonunda 10 nM DOC dozu %30, 100 nM DOC dozunda ise %90 oranında hücre canlılığını düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Morse ve ark. aksine çalışmamızda her iki dozun MCF10A hücrelerinde herhangi bir istatistiksel etki oluşturmamış olması kullandığımız dozların seçici etki gösterdiğini açıklayabilir.

Doksorubisin (DOX) de DOC gibi meme kanserinin tedavisinde kullanılan ve en aktif ajan olarak kabul edilen bir ilaçtır [37, 42]. Wang ve ark. [75] yaptığı hücre canlılığı çalışmasında 1 gün sonunda MCF-7 hücrelerinde kullanılan 100 nM DOX dozunun %20, 1000 nM DOX dozunun %60 oranında; Fanayi ve ark. [76] çalışmalarında MCF-7 hücrelerinde 2. günde 100 nM DOX dozunun %50, 1000 nM DOX dozunun ise %70 oranında; Arif ve ark [77] MCF-7 hücrelerinde 1. gün sonunda 100 nM DOX dozunun %50 oranında, 1000 nM DOX dozunun ise %70 oranında canlılığı düşürdüğü gözlemlenmiştir. Farklı meme kanseri hücre hatlarında uygulanan birbirinden farklı DOX dozlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisi aşağıdaki literatürlerde açıklanmıştır. Yukarıda açıklanan

literatürler içerisinde DOX dozu arttıkça proliferasyon etkisinin arttığı gözlemlenmiş olup, çalışmamız ile uyumlu olarak 1000 nM DOX dozu 100 nM DOX dozuna göre hücre canlılığını istatistiksel olarak daha fazla düşürdüğü gösterilmiştir.

Diğer taraftan aşağıda açıklanan çalışmalarda birbirinden farklı yüksek ve düşük DOX dozlarında aynı %50 proliferasyon etkisinin bulunması çalışmalar arasında çelişkiler göstermektedir. Pilco-Ferreto ve ark. [78] 1. günde MDA-MB-231 hücre canlılıklarının 1000 nM DOX dozunda, MCF-7 hücre canlılıklarının ise 4000 nM DOX dozunda; Sato ve ark. [79] 2. günde MCF-7 hücre canlılıklarının 1700 nM DOX dozunda, MDA-MB-453 hücre canlılıklarının ise 2000 nM DOX dozunda; Oncul ve ark. [80] 2. günde MCF-7 hücre canlılıklarının yaklaşık 8300 nM DOX dozunda, MDA-MB-231 hücre canlılıklarının ise yaklaşık 6600 nM DOX dozunda; AbuHammad ve ark. [81] 3. Günde MCF-7 hücrelerinin canlılıklarının 286 nM DOX dozunda; Abdullah ve ark. [82] 3. günde MCF-7 hücre canlılıklarının yaklaşık 575 nM DOX dozunda, MDA-MB-231 hücre canlılıklarının ise yaklaşık 288 nM DOX dozunda %50 oranında canlılıklarını kaybettiklerini göstermişlerdir.

Arif ve ark [77] fibroblast hücre hattında yaklaşık 2200 nM DOX dozunda; Pilco-Ferreto ve ark. [78] 1. günde MCF-10F hücre canlılıklarını 1000 nM DOX dozunda, Abdullah ve ark. [82] ise 3. günde MCF-10A hücre canlılıklarının yaklaşık 288 nM DOX dozunda %50 oranında canlılıklarını kaybettiklerini göstermişlerdir. Çalışmamızda en yüksek DOX dozunun sağlıklı hücre hattı olan MCF10A hücrelerinin canlılıkları üzerinde yukarıdaki literatür çalışmalarına benzer sonuçlar bulunmuştur.

Lee ve ark. [83] polimerize edilmiş PBA ile doksorubisin (DOX) nanokompleks bileşiklerini kullandıkları çalışmada MCF7 hücreleri üzerine 48 saat sonunda DOX'un 3.1 μ M dozda ve 1:1, 2:1 ve 4:1 nanokompleks bileşiklerinde, PBA'nın DOX ile sinerjik etki oluşturarak hücre canlılığını %50 üzerinde etkilediği belirtilmiştir. Çalışmamızda 1. Günde PBA+DOX doz kombinasyonlarında herhangi istatistiksel etki görülmezken, 2. günün sonunda Lee ve ark. sonuçlarına paralel olarak, uygulanan DOX dozunun etkisi PBA ile bileşik oluşturulduğunda sinerjik etki göstererek artırdığı gözlemlenmiştir.

Trebunova ve ark. [35] DOC ve DOX kombinasyonlarından oluşan çalışmalarında 1. gün sonunda MCF7 hücrelerine uygulanan 40 nM DOC + 200 nM DOX ile 40 nM DOC + 500 nM DOX doz kombinasyonlarının canlılığı yaklaşık %35 oranında, 60 nM DOC + 200 nM DOX ile 60 nM DOC + 500 nM DOX dozlarını içeren ikili kombinasyonlarının ise kontrole göre yaklaşık %50 oranında etkiledikleri görülmüştür. Bu çalışmada sinerjik etkinin

artmasını sağlayan DOC dozunun etkisi olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda ise DOC ve DOX doz kombinasyonları PBA ile birleştirilerek ikili ve üçlü kombinasyonlar oluşturulmuştur. Yalnızca DOC'in uygulandığı dozlarda hücre canlılığı üzerine etkisi istatistiksel olarak yüksektir, PBA'nın her iki dozu ile oluşturulmuş olan ikili kombinasyonlarda bu etkinin azalması sonucunda PBA ile sinerjik bir etki oluşturmadığı söylenebilir. Uygulanan DOX dozlarında ise DOX'un tek başına oluşturduğu etki PBA ile oluşturulan ikili dozlarına göre istatistiksel olarak yaklaşık yarısıdır. Bu sonuçtan PBA ile DOX arasında sinerjik bir etki oluşturduğu ve PBA'nın DOX'un etkisini artırdığı açıklanabilir. Çalışmamızın amacına yönelik belirlediğimiz üçlü kombinasyonlarda ise kullanılan DOC dozları yüksek doz PBA ile oluşturulmuş kombinasyonlarda hücre canlılığı üzerinde sitotoksik etkiyi artırdığını düşünmekteyiz. Uygulanan üçlü kombinasyonlarda DOX dozunun varlığı hedeflenen etkiyi oluşturduğunu söyleyebiliriz.

5.2. APOPTOZ

Hücrelerin genellikle nekroz veya apoptoz nedeniyle öldüğü bilinmektedir. Apoptoz, birçok farklı ajan ve fizyolojik durum tarafından indüklenen, birkaç farklı hücre tipinde tekrarlanabilir bir şekilde meydana gelen düzenli bir olaydır. Apoptotik ölümün özellikleri, nekrotik ölüm özellikleriyle karşılaştırıldığında daha nettir. Hücrede en erken geri dönüşü olmayan değişiklikler mitokondride gerçekleşmektedir. Mitokondride şişme ve granüler kalsiyum birikintileri oluşan değişiklikler arasındadır. Bu tür değişikliklerden sonra, tek tek hücrelerin dış hatlarının bulanıklaştığı bildirilmiştir [84]. Hücrede büyük ölçüde hacimsel genişleme ve membran parçalanması ise nekrotik hücrelerin apoptotik hücrelerden en önemli farklarıdır [85]. Polverini'nin [86] belirttiği gibi nekroz kontrolsüz bir süreçtir ve enerji (ATP) gereksinimi yoktur, hücreler şişer, zar bütünlüğü kaybolur ve nükleer çözünme görülür. Bu tez çalışmasında da kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemotöropotiklerle oluşturulan bor kombinasyonlarının meme kanseri ve sağlıklı meme hücre hattı hücreleri üzerinde in vitro nekroza neden olmadığı gösterilmiştir.

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, çok hücreli organizmaların gelişimi ve homeostazında kritik bir anahtar düzenleyici olarak rol oynadığı bilinmektedir. Olası apoptoz eksikliği veya yüksek apoptotik hücre oranı doku için kritik olabilir. Bu durum dokuda lezyonlar veya hastalıklı durumlar yaratabilir. Bir hücrenin nekroz yerine apoptoz nedeniyle ölüp ölmediğini belirlemek veya apoptoz yolağına girdiğini belirlemek hücre ölüm sebebini

tespit etmek için önemlidir. Böylece ilgili etkenin dokuda veya hücrede sebep olduğu fizyolojik etkinin sonucu belirlenmiş olur. Bir apoptotik hücrenin fenotipi, çoğu apoptoz tetiklenmesinde benzerdir ve hücre zarındaki değişiklikleri, sitoplazmik ve nükleer proteinlerin proteolizini ve sonunda nükleer DNA'nın yok edilmesini içermektedir. DNA onarımının p53 ile indüklenen apoptozda erken aktive olduğuna ve bunun tersine çevrilebilirliğinde rol oynayabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır. p53 aktivasyonunun apoptozun erken dönemlerinde fosfatidilserin (PS) eksternalizasyonunu indüklediğini ve apoptotik uyaran kaldırılırsa bu erken apoptotik hücrelerin kurtarılabilirliğini ve çoğalabileceği gösterilmiştir [87, 88].

Apoptotik hücre ölümünün kantitatif bir değerlendirmesi, Anneksin-V proteininin yeşil floresan işareti ile fosfatidilserin (PS) tespitini içermektedir. Hücrelerin membran bütünlüğü, yalnızca hasarlı membranlara sahip hücrelerin içerisinde girebilen boya olan PI kullanılarak kontrol edilmiştir. Anneksin/PI boyaması çalışmada kullanılan etken madde ve bor kombinasyonlarının hücrelerdeki ölüm sebeplerinin apoptoz olduğunu doğrulamaktadır.

Apoptoz, kansere karşı en güçlü savunmalardan biridir. Bu işlem potansiyel olarak zararlı mutasyona uğramış hücreleri ortadan kaldırır ve normal, sağlıklı hücrelerin yenilenmesini sağlar [61].

Elegdebe ve ark [59] yaptığı çalışmada MCF7 hücrelerinde floresan mikroskobu kullanarak 1 mM PBA dozunda %3.1, 10 mM PBA dozunda ise %10.3 oranında apoptoz tespit etmişlerdir. Çalışmamızda ise literatürde olduğu gibi PBA dozu arttıkça apoptoz oranının arttığını gözlemledik. MCF10A hücrelerinde MCF7 hücrelerine göre apoptozun daha düşük oranda belirlenmesi çalışmamızın amacında belirtilmiş olan seçici ve toksik olmayan bileşik olmasını desteklemektedir.

Wang ve ark. [75, 89] yaptığı apoptoz çalışmalarında MCF-7 hücrelerinde 10 nM DOC dozu %10, 500 nM DOC dozu ise %60 oranında apoptoz ölçülmüştür. Morse ve ark. [91] 8. saat sonunda 10 nM DOC dozunun MCF-10A hücrelerinde %4.68, 16 saat sonunda MCF-7 hücrelerinde ise %1.05 oranında apoptoz tespit etmişlerdir. Samadi ve ark. [90] 2. günde MDA-MB-231 hücrelerinde yaptıkları çalışmada 10 nM DOC dozunda %65, 50 nM DOC dozunda %49 ve 500 nM DOC dozunda ise %32 oranlarında apoptotik hücre bulduklarını göstermişlerdir. Çalışmamızda ise MCF7 ve MCF10A hücrelerinde yukarıda açıklanan literatürler ile paralel sonuçların elde edilmiştir.

Oncul ve ark. [80] yaptığı çalışmada 50, 200 ve 800 nM DOX dozlarında MCF-7 hücrelerinin sırası ile %5.8, %10 ve %13.75 oranlarında apoptoza girdiklerini göstermişlerdir. MDA-MB-231 hücrelerinde ise 50, 200 ve 800 nM DOX dozlarının sırası ile %6.75, %15 ve %8.25 oranlarında apoptoza girdikleri belirlemişlerdir. Çalışmamızda MCF7 hücrelerinde tespit edilen apoptoz oranları Oncul ve ark. [80] yaptığı çalışmada elde edilen veriler ile uyumlu sonuçlar göstermekte olup, DOX dozu arttıkça apoptoz oranının da arttığı tespit edilmiştir. Tekli dozlarda elde edilen sonuçlara göre ikili ve üçlü dozların apoptoza sürüklenme etkisinin arttığı görülmüş olup, ayrıca tüm doz gruplarında MCF7 hücrelerinde MCF10A hücrelerine göre daha yüksek oranda apoptoz etkisi elde edilmiştir, bu da çalışmamızın amacına göre beklediğimiz sonuç olduğunu söyleyebiliriz.

5.3. ROS DÜZEYİ

Terapötik seçicilik, kanser kemoterapisinde en önemli hususlardan birisidir. Normal hücrelere zararlı etkileri en aza indirirken malign hücreleri tercihtli olarak öldürmek için terapötik stratejilerin tasarımı, kanser ile normal hücreler arasındaki biyolojik farklılıkları anlamamıza bağlıdır [92]. Birçok araştırma, antikanser ilaçlarla yapılan tedaviden sonra, ROS'un çeşitli kanser hücrelerinin apoptozunu indükleyebileceğini göstermiştir [93]. Bu nedenle, etken madde ve bor kombinasyonlarından kaynaklanan apoptozun MCF7 ve MDA10A hücrelerinde artan ROS seviyeleri ile ilişkili olup olmadığını araştırdık. ROS üretimi, birçok antikanser ilacının önemli bir aracısıdır [94] Önceki çalışmalar, kemoterapi tarafından üretilen ROS'un belirli kanserlerde apoptozu tetiklemek için gerekli olduğunu göstermiştir [95].

Yapılan literatür taramalarında PBA'in MCF7 ve MCF10A hücrelerinde ROS değerlerinin ölçümlerine rastlanmamıştır.

Swetha ve ark. [96] 10 nM DOC dozunun oksitativ stres düzeyi 1. günde MCF-7 hücreleri üzerinde kontrole göre 1.8 kat arttığı, 4T1 hücrelerinde ise 1.4 kat arttığı görülmüştür. Mehdizadeh ve ark. [97] 100 nM DOC dozunun MCF-7 hücreleri üzerindeki oksitativ stres düzeyinin kontrole göre 1. günde yaklaşık 1.2 kat arttığı görülmüştür. Çalışmamızda elde edilen sonuçlarda her iki dozda elde edilen ROS seviyeleri benzer olup 2 katın üzerindedir, literatür çalışmaları ile uyumlu sonuçlar gözlemlenmiştir.

Wigner ve ark. [98] 2.2 μ M DOX dozunun oksitativ stres düzeyi MCF-7 hücreleri üzerinde kontrole göre 3. güne kadar farklı saatlerde 2 kat arttığı, MDA-MB-231 hücrelerinde

ise 1.5 kat arttığı görülmüştür. Çalışmamızda kullanılan DOX dozlarının ROS seviyeleri 2.3 kat olarak tespit edilmiş olup Wigner ve ark. [98] yaptıkları çalışmayla uyumlu sonuç elde edilmiştir.

Çalışmamızda FBA'nın tekli dozlarında yüksek oranda ROS düzeyi tespit edilirken, tüm üçlü ve ikili kombinasyon dozlarımızda ROS değerleri beklenenin aksine istatistiksel olarak düştüğü gözlemlenmiştir. Bu değerlerin hücre ölüm mekanizmaları içerisinde farklı bir yöntemlerle de değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

5.4. HÜCRE MİGRASYONU

Bradke ve ark. [6] ZR-75-1 meme kanseri hücre hattı üzerinde yaptıkları göç çalışmasında 1. gün sonunda kontrole göre 100, 500 ve 1000 μ M PBA dozlarının istatistiksel olarak daha düşük yara kapanmasına sebep olduğu ve 1000 μ M PBA dozunun negatif kontrol ile benzer sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir. MCF10A hücrelerinde de tüm dozlar pozitif kontrole göre daha düşük yara kapanması oluşturmuşlardır. Aladağ ve ark. [99] MCF7 hücrelerinde 10 ile 100 μ M arasındaki farklı borik asit dozlarının kullanıldığı çalışmada 2. gün sonunda yara iyileşmesinin oluşmadığı ve migrasyonun görülmediğini açıklamışlardır. Çalışmamızda 1 mM PBA dozu MCF7 hücre migrasyonunda etki görülmemiştir. Ancak 10 mM PBA dozunun hücre migrasyonu üzerinde etki oluşturduğu belirlenmiştir. MCF10A hücrelerinde ise hem 1 mM hem de 10 mM PBA dozunda migrasyonun yavaşladığı gözlemlenmiştir.

Liu ve ark. [100] MCF7 hücrelerinde 3 saat sonrasında 200 nM DOX dozu yara kapanmayı 1,56 kat artırdığı, 1 saatlik 30 nM PAX (Taxan grubu kemoterapik) dozunda ise kontrole göre %64 seviyelerine düşürdüğü tespit edilmiştir. 800 nM DOX ile yapılan birkaç saatlik çalışmada BT-474 hücrelerinin göçünü önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca MCF7 hücrelerinde kullanılan PAX ve DOX etki dozları ES-2 yumurtalık kanseri hücrelerinde de benzer etki gösterdiği ve 1 saatte 30 nM PAX dozu ile yapılan kısa çalışmada yara kapanmayı etkilemediği fakat DOX dozunun yara kapanmayı artırdığı gözlenmiştir. Çalışmamızda MCF7 hücrelerinde uygulanan DOX ve DOX dozları ile tüm ikili ve üçlü doz kombinasyonlarında 1. günde etki gösterip migrasyonu durdurarak 7. gün sonunda ölüme sürüklemişlerdir. Diğer taraftan hücre canlılığı analizlerimizde de %90 oranında canlılıkların etkilendiği görülmüş olup yara kapanma sonuçları ile uyumludur. MCF10A hücrelerinde ise aynı etki 2. günde başlamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

PBA'in DOC ve DOX ile yapılan kombinasyonlarında kanser hücrelerine karşı canlılıkları ciddi oranda etkiledikleri gösterilmiştir. Ayrıca hücrelerdeki oksitativ stres oranlarının incelenmesi ile kanser hücrelerinin sağlıklı hücelere göre daha yüksek oranda apoptoza sürüklendikleri görülmüştür. Yara kapanma analizinde ikili ve üçlü doz kombinasyonlarının kanser hücrelerinde yara iyileşmesi gerçekleşmeyerek hücrelerin ölüme sürüklendiği gösterilmiştir. Oluşturmuş olduğumuz ikili ve üçlü doz kombinasyonlarının hücrelerdeki apoptoz oranlarını artırdığı açıkça görülebilmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında PBA'in DOC ve DOX ile yapılan kombinasyonları, kanser hücrelerine karşı kullanılan ilaçların etkilerini de artırdığı gösterilmiştir. Çalışmamızda sadece iki farklı doz kullanılmasından dolayı alt, üst ve ara dozların etkileri bilinmemekle birlikte yeni çalışmalarda uygulanabilecek doz kombinasyonlarının çeşitlendirilmesi, protein düzeylerinin ölçülmesi ve genetik yollar üzerindeki etkileri ile in-vivo deneylerine ön çalışma olabilecek niteliktedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. and Bray, F., 2015, Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *International journal of cancer*, 136(5), E359–E386.
- [2]. Köhrmann, A., Kammerer, U., Kapp, M., Dietl, J. and Anacker, J., 2009, Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature, *BMC cancer*, 9, 188.
- [3]. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F., 2021, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.
- [4]. Weigelt, B., Peterse, J. L. and van 't Veer, L. J., 2005, Breast cancer metastasis: markers and models, *Nature reviews. Cancer*, 5(8), 591–602.
- [5] Li S, Hou X, Ma Y and Wang Z., 2022, Phenylboronic-acid-based Functional Chemical Materials for Fluorescence Imaging and Tumor Therapy, *ACS Omega*, 12;7(3):2520-2532.
- [6]. Bradke, T. M., Hall, C., Carper, S. W. and Plopper, G. E., 2008, Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability, *Cell adhesion & migration*, 2(3), 153–160.
- [7] Johnson-Arbor, K. and Dubey, R., 2022, *Doxorubicin*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459232/>, [Ziyaret tarihi: 21 Ocak 2023].
- [8] Farha, NG. and Kasi, A., 2022, *Docetaxel*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537242/>, [Ziyaret tarihi: 21 Ocak 2023].
- [9]. Sudhakar A., 2009, History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods, *Journal of cancer science & therapy*, 1(2), 1–4.
- [10]. Ciocca, D. R. and Fanelli, M. A., 1997, Estrogen receptors and cell proliferation in breast cancer, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 8(8), 313–321.
- [11]. Fanelli, M. A., Vargas-Roig, L. M., Gago, F. E., Tello, O., Lucero De Angelis, R. and Ciocca, D. R., 1996, Estrogen receptors, progesterone receptors, and cell proliferation in human breast cancer, *Breast cancer research and treatment*, 37(3), 217–228.
- [12]. Tyczynski, J.E., Bray, F., Parkin, D.M., 2022, Breast Cancer in Europe, *ENCR Cancer Fact Sheets European Network of Cancer Registries*, Vol:2.

- [13]. Emery, J., Lucassen, A. and Murphy, M., 2001, Common hereditary cancers and implications for primary care, *Lancet (London, England)*, 358(9275), 56–63.
- [14]. American cancer society, 2021, Types of breast cancer, <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer.html>, [Ziyaret Tarihi: 28 Ekim 2022].
- [15]. Benson, J. R., Jatoi, I., Keisch, M., Esteva, F. J., Makris, A. and Jordan, V. C., 2009, Early breast cancer, *Lancet*, 373(9673), 1463–1479.
- [16]. Loring, L. and Dershaw, D. D., 1997, Ductal carcinoma in situ, *Critical reviews in diagnostic imaging*, 38(6), 501–533.
- [17]. Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H. and Band, V., 2010, Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers, *Cancer biology & therapy*, 10(10), 955–960.
- [18]. Zhang, B. N., Cao, X. C., Chen, J. Y., Chen, J., Fu, L., Hu, X. C., Jiang, Z. F., Li, H. Y., Liao, N., Liu, D. G., Tao, O., Shao, Z. M., Sun, Q., Wang, S., Wang, Y. S., Xu, B. H. and Zhang, J., 2012, Guidelines on the diagnosis and treatment of breast cancer (2011 edition), *Gland surgery*, 1(1), 39–61.
- [19]. Andolina, V. F. and Lille, S., 2010, *Mammographic imaging: a practical guide*, 3rd edition, Lippincott Williams & Wilkins, USA, ISBN: 160-5470-317.
- [20]. Zardavas, D., Irrthum, A., Swanton, C. and Piccart, M., 2015, Clinical management of breast cancer heterogeneity, *Nature reviews. Clinical oncology*, 12(7), 381–394.
- [21]. Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S. et al., 2001, Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10869–10874.
- [22]. Curigliano G., 2012, New drugs for breast cancer subtypes: targeting driver pathways to overcome resistance, *Cancer treatment reviews*, 38(4), 303–310.
- [23]. Bick, U., Trimboli, R. M., Athanasiou, A. et al., 2020, Image-guided breast biopsy and localisation: recommendations for information to women and referring physicians by the European Society of Breast Imaging, *Insights into imaging*, 11(1), 12.
- [22]. Schnitt, S. J., Silen, W., Sadowsky, N. L., Connolly, J. L. and Harris, J. R., 1988, Ductal carcinoma in situ (intraductal carcinoma) of the breast, *N Engl J Med*, 318(14), 898–903.
- [23]. Burstein, H. J., Polyak, K., Wong, J. S., Lester, S. C. and Kaelin, C. M., 2004, Ductal carcinoma in situ of the breast, *The New England journal of medicine*, 350(14), 1430–1441.
- [24]. Allred, D. C., Mohsin, S. K. and Fuqua, S. A., 2001, Histological and biological evolution of human premalignant breast disease, *Endocrine-related cancer*, 8(1), 47–61.

- [25]. Siziopikou K. P., 2013, Ductal carcinoma in situ of the breast: current concepts and future directions, *Archives of pathology & laboratory medicine*, 137(4), 462–466.
- [26]. Hanby, A. M. and Hughes, T. A., 2008, In situ and invasive lobular neoplasia of the breast, *Histopathology*, 52(1), 58–66.
- [27]. Elston, C. W. and Ellis, I. O., 1991, Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up, *Histopathology*, 19(5), 403–410.
- [28]. Singletary, S. E. and Connolly, J. L., 2006, Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual, *CA: a cancer journal for clinicians*, 56(1), 37–51.
- [29]. Nava, M. B., Rocco, N. and Catanuto, G., 2015, Conservative mastectomies: an overview, *Gland surgery*, 4(6), 463–466.
- [30]. Furue, H., 2003, Chemotherapy cancer treatment during the past sixty years, *Gan To Kagaku Ryoho*, 30(10), 1404–11.
- [31]. Abshire, D. and Lang, MK., 2018, The Evolution of Radiation Therapy in Treating Cancer, *Semin Oncol Nurs*, 34(2), 151–157.
- [32]. Conner P., 2007, Breast response to menopausal hormone therapy--aspects on proliferation, apoptosis and mammographic density, *Annals of medicine*, 39(1), 28–41.
- [33]. Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C. and Spalla, C., 1969, Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peucetius* var. *caesius*., *Biotechnol. Bioeng.*, 11, 1101–1110.
- [34]. Karayannopoulou, M. and Lafiontatis, S., 2016, Recent advances on canine mammary cancer chemotherapy : A review of studies from 2000 to date, *Revue Méd. Vét.*, 167, 7–8.
- [35]. Trebunova, M., Laputkova, G., Slaba, E., Lacjakova, K. and Verebova, A., 2012, Effects of docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide on human breast cancer cell line MCF-7, *Anticancer research*, 32(7), 2849–2854.
- [36]. Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S., and Moreira, P. I., 2009, Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect, *Current medicinal chemistry*, 16(25), 3267–3285.
- [37]. İşeri, Ö.D., 2009, *Investigation of Docetaxel and Doxorubicin Resistance in Mcf-7 Breast Carcinoma Cell Line*, Thesis (PhD), Middle East Technical University.
- [38]. Temel, M.K., 2015, Sitotoksik kemoterapötiklerin yirminci yüzyıldaki gelişimi, *Türk Onkoloji Dergisi*, 30(2), 96–108.

- [39]. Kumar, N., 1981, Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action, *The Journal of biological chemistry*, 256(20), 10435–10441.
- [40]. Clarke, S. J. and Rivory, L. P., 1999, Clinical pharmacokinetics of docetaxel, *Clinical pharmacokinetics*, 36(2), 99–114.
- [41]. Crown, J., O'Leary, M. and Ooi, W. S., 2004, Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience, *The oncologist*, 9(2), 24–32.
- [42]. Nabholz, J. M., 2003, Docetaxel-anthracycline combinations in metastatic breast cancer, *Breast cancer research and treatment*, 79(1), 3–9.
- [43]. Lyseng-Williamson, KA. and Fenton, C., 2005, Docetaxel: a review of its use in metastatic breast cancer, *Drugs*, 65(17):2513-31.
- [44]. Zhang, L., and Zhang, N., 2013, How nanotechnology can enhance docetaxel therapy, *International journal of nanomedicine*, 8, 2927–2941.
- [45]. Uluisik, I., Karakaya, H. C. and Koc, A., 2018, The importance of boron in biological systems, *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 45, 156–162.
- [46]. Kabu M. And Akosman M.S., 2013, Biological Effects Of Boron, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 225, 57-75.
- [47]. Nielsen, F.H., and Meacham, S. L., 2011, Growing Evidence for Human Health Benefits of Boron, *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 16(3), 169-180.
- [48]. Pizzorno, L., 2015, Nothing Boring About Boron, *Integrative Medicine*, 14 (4), 35-48.
- [49]. Scorei, I. R., 2011, Boron Compounds in the Breast Cancer Cells Chemoprevention and Chemotherapy, Breast Cancer - Current and Alternative Therapeutic Modalities, In: Gunduz, E. and Gunduz, M. (ed.), Chapter 5, *IntechOpen*, 91-114.
- [50]. Pasa, S., Aydın, S., Kalaycı, S., Boğa, M., Atlan, M., Bingul, M., Şahin, F. and Temel, H., 2016, The synthesis of boronic-imine structured compounds and identification of their anticancer, antimicrobial and antioxidant activities, *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(1), 39–48.
- [51]. Naghii, M. R., Mofid, M., Asgari, A. R., Hedayati, M. and Daneshpour, M. S., 2011, Comparative effects of daily and weekly boron supplementation on plasma steroid hormones and proinflammatory cytokines, *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 25(1), 54–58.
- [52]. Nielsen, F.H., 2017, Historical and Recent Aspects of Boron in Human and Animal Health, *Journal of Boron*, 2(3), 153-160.

- [53]. Hazman, Ö., Bozkurt, M. F., Fidan, A. F., Uysal, F. E. and Çelik, S., 2018, The Effect of Boric Acid and Borax on Oxidative Stress, Inflammation, ER Stress and Apoptosis in Cisplatin Toxication and Nephrotoxicity Developing as a Result of Toxication, *Inflammation*, 41(3), 1032–1048.
- [54]. Barranco, W. T. and Eckhert, C. D., 2004, Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation, *Cancer letters*, 216(1), 21–29.
- [55]. Barranco, W. T. and Eckhert, C. D., 2006, Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells, *British journal of cancer*, 94(6), 884–890.
- [56]. McAuley, E. M., Bradke, T. A. and Plopper, G. E., 2011, Phenylboronic acid is a more potent inhibitor than boric acid of key signaling networks involved in cancer cell migration, *Cell adhesion & migration*, 5(5), 382–386.
- [57]. Ali, R.A. and Gonzalez-Sarmiento, R., 2017, High Concentrations of Boric Acid Induce Autophagy in Cancer Cell Lines, *BioRxiv*
- [58]. Romulus, I.S. and Radu, P., 2010, Boron-Containing Compounds as Preventive and Chemotherapeutic Agents for Cancer, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 10(4), 346–351.
- [59]. Elegdebe, A.F., 2007, *Boric acid inhibits cell growth and induces apoptosis in breast cancer cells*, Thesis (M.S.), University of Nevada Las Vegas United States.
- [60]. Aykin-Burns, N., Ahmad, I. M., Zhu, Y., Oberley, L. W. and Spitz, D. R., 2009, Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation, *The Biochemical journal*, 418(1), 29–37.
- [61]. Marasovic, M., Ivankovic, S., Stojkovic, R., Djermic, D., Galic, B. and Milos, M., 2017, In vitro and in vivo antitumour effects of phenylboronic acid against mouse mammary adenocarcinoma 4T1 and squamous carcinoma SCCVII cells, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32(1), 1299–1304.
- [62]. Tait, L., Soule, H. D. and Russo, J., 1990, Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10, *Cancer research*, 50(18), 6087–6094.
- [63]. Qu, Y., Han, B., Yu, Y., Yao, W., Bose, S., Karlan, B. Y., Giuliano, A. E., and Cui, X., 2015, Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells, *PloS one*, 10(7), e0131285.
- [64]. Imbalzano, K. M., Tatarkova, I., Imbalzano, A. N., and Nickerson, J. A., 2009, Increasingly transformed MCF-10A cells have a progressively tumor-like phenotype in three-dimensional basement membrane culture, *Cancer cell international*, 9, 7.
- [65]. Zientek-Targosz, H., Kunnev, D., Hawthorn, L., Venkov, M., Matsui, S., Cheney, R. T., and Ionov, Y., 2008, Transformation of MCF-10A cells by random mutagenesis with

frameshift mutagen ICR191: a model for identifying candidate breast-tumor suppressors, *Molecular cancer*, 7, 51.

[66]. Alarcon Martinez, T., Zeybek, N. D. and Müftüoğlu, S., 2018, Evaluation of the Cytotoxic and Autophagic Effects of Atorvastatin on MCF-7 Breast Cancer Cells, *Balkan medical journal*, 35(3), 256–262.

[67]. Ngamwongsatit, P., Banada, P. P., Panbangred, W. and Bhunia, A. K., 2008, WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line, *Journal of microbiological methods*, 73(3), 211–215.

[68] Rieger, AM., Nelson, KL., Konowalchuk, JD., and Barreda, DR., 2011, Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death, *J Vis Exp*, 24;(50):2597.

[69] Pajaniradje, S., Mohankumar, K., Pamidimukkala, R., Subramanian, S., and Rajagopalan, R., 2014, Antiproliferative and apoptotic effects of *Sesbania grandiflora* leaves in human cancer cells, *Biomed Res Int*, 2014:474953.

[70] Larsen, KE., Fon, EA., Hastings, TG., Edwards, RH., and Sulzer, D., 2002, Methamphetamine-induced degeneration of dopaminergic neurons involves autophagy and upregulation of dopamine synthesis, *J Neurosci*, 22(20):8951-60.

[71]. Golstein, P. and Kroemer, G., 2007, Cell death by necrosis: towards a molecular definition, *Trends in biochemical sciences*, 32(1), 37–43.

[72]. Zong, W. X. and Thompson, C. B., 2006, Necrotic death as a cell fate, *Genes & development*, 20(1), 1–15.

[73] Fallowfield, LJ., 2004, Evolution of breast cancer treatments: current options and quality-of-life considerations, *Eur J Oncol Nurs.*, 8 Suppl 2:S75-82.

[74] Arnst, KE., Wang, Y., Hwang, DJ., Xue, Y., Costello, T., Hamilton, D., Chen, Q., Yang, J., Park, F., Dalton, JT., Miller, DD., and Li, W., 2018, A Potent, Metabolically Stable Tubulin Inhibitor Targets the Colchicine Binding Site and Overcomes Taxane Resistance, *Cancer Res.*, 78(1):265-277.

[75].Wang, H., Vo, T., Hajar, A., Li, S., Chen, X., Parissenti, A. M., Brindley, D. N., and Wang, Z., 2014, Multiple mechanisms underlying acquired resistance to taxanes in selected docetaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells, *BMC cancer*, 14, 37.

[76]. Fanayi, A., Changizi, V., and Safa, M., 2016, Effect of crocin and doxorubicin / radiation on the breast cancer cell line, Michigan Cancer Foundation-7, *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 9. 428-434.

[77]. Arif, I. S., Hooper, C. L., Greco, F., Williams, A. C., and Boateng, S. Y., 2013, Increasing doxorubicin activity against breast cancer cells using PPAR γ -ligands and by exploiting circadian rhythms, *British journal of pharmacology*, 169(5), 1178–1188.

- [78]. Pilco-Ferreto, N., and Calaf, G. M., 2016, Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines, *International journal of oncology*, 49(2), 753–762.
- [79]. Sato, Y., Sasaki, N., Saito, M., Endo, N., Kugawa, F., and Ueno, A., 2015, Luteolin attenuates doxorubicin-induced cytotoxicity to MCF-7 human breast cancer cells, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 38(5), 703–709.
- [80]. Oncul, S and Ercan, A., 2017, Discrimination of the Effects of Doxorubicin on Two Different Breast Cancer Cell Lines on Account of Multidrug Resistance and Apoptosis, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79.
- [81]. AbuHammad, S., and Zihlif, M., 2013, Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line, *Genomics*, 101(4), 213–220.
- [82]. Abdullah, A. S., Mohammed, A. S., Abdullah, R., Mirghani, M. E., and Al-Qubaisi, M., 2014, Cytotoxic effects of *Mangifera indica* L. kernel extract on human breast cancer (MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines) and bioactive constituents in the crude extract, *BMC complementary and alternative medicine*, 14, 199.
- [83]. Lee, J., Kim, J., Lee, Y. M., Park, D., Im, S., Song, E. H., Park, H., and Kim, W. J., 2017, Self-assembled nanocomplex between polymerized phenylboronic acid and doxorubicin for efficient tumor-targeted chemotherapy, *Acta pharmacologica Sinica*, 38(6), 848–858.
- [84] Stedman, TL., 2005, Stedman's medical dictionary for the health professions and nursing, *Choice Reviews Online*, 42(10), 42-5613-42–5613.
- [85] Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., Currie, A. R., 1980, Cell Death: The Significance of Apoptosis, *International Review of Cytology*, 68(C), 251–306
- [86] Polverini, P. J., Nör, J. E., 1999, Apoptosis and predisposition to oral cancer, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 10(2), 139–152.
- [87] Geske, F. J., Lieberman, R., Strange, R., Gerschenson, L. E., 2001, Early stages of p53-induced apoptosis are reversible, *Cell Death and Differentiation*, 8(2), 182–191.
- [88] Mootha, V. K., Wei, M. C., Buttle, K. F., Scorrano, L., Panoutsakopoulou, V., Mannella, C. A., Korsmeyer, S. J., 2001, A reversible component of mitochondrial respiratory dysfunction in apoptosis can be rescued by exogenous cytochrome c, *EMBO Journal*, 20(4), 661–671.
- [89]. Wang, R. C., Chen, X., Parissenti, A. M., Joy, A. A., Tuszyński, J., Brindley, D. N., and Wang, Z., 2017, Sensitivity of docetaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells to microtubule-destabilizing agents including vinca alkaloids and colchicine-site binding agents, *PloS one*, 12(8), e0182400.
- [90]. Samadi, N., Ghanbari, P., Mohseni, M., Tabasinezhad, M., Sharifi, S., Nazemieh, H., and Rashidi, M. R., 2014, Combination therapy increases the efficacy of docetaxel, vinblastine and tamoxifen in cancer cells, *Journal of cancer research and therapeutics*, 10(3), 715–721.

- [91]. Morse, D. L., Gray, H., Payne, C. M., and Gillies, R. J., 2005, Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells, *Molecular cancer therapeutics*, 4(10), 1495–1504.
- [92] Hileman, E. O., Liu, J., Albitar, M., Keating, M. J., & Huang, P., 2004, Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 53, 209-219.
- [93] Pelicano, H., Carney, D., and Huang, P., 2004, ROS stress in cancer cells and therapeutic implications, *In Drug Resistance Updates*, 7(2): 97- 110.
- [94] Trachootham, D., Alexandre, J., and Huang, P., 2009, Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach, *Nature Reviews Drug Discovery*, 8 (7): 579-591.
- [95] Simon, HU., Haj-Yehia, A., and Levi-Schaffer, F., 2000, Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction, *Apoptosis*, 5 (5): 415- 418.
- [96]. Swetha, K. L., Sharma, S., Chowdhury, R., and Roy, A., 2020, Disulfiram potentiates docetaxel cytotoxicity in breast cancer cells through enhanced ROS and autophagy, *Pharmacological reports : PR*, 72(6), 1749–1765.
- [97]. Mehdizadeh, K., Ataei, F., and Hosseinkhani, S., 2021, Treating MCF7 breast cancer cell with proteasome inhibitor Bortezomib restores apoptotic factors and sensitizes cell to Docetaxel, *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 38(6), 64.
- [98]. Wigner, P., Zielinski, K., Labieniec-Watala, M., Marczak, A., and Szwed, M., 2021, Doxorubicin-transferrin conjugate alters mitochondrial homeostasis and energy metabolism in human breast cancer cells, *Scientific reports*, 11(1), 4544.
- [99]. Aladağ, T., and Fırat, F., 2022, Comparative Effects Of Boric Acid and Resveratrol on MCF-7 Breast Cancer Cells Metastatic Behaviour, *International Journal of Research - GRANTHAALAYAH*, 10(1), 34–46.
- [100] Liu CL, Chen MJ, Lin JC, Lin CH, Huang WC, Cheng SP, Chen SN, and Chang YC., 2019, Doxorubicin Promotes Migration and Invasion of Breast Cancer Cells through the Upregulation of the RhoA/MLC Pathway, *J Breast Cancer.*, 22;22(2):185-195.

EKLER

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

BOR VE KEMOTERAPATİKLERLE OLUŞTURULAN
KOMBİNASYONUN MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDE IN
VITRO ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 9	% 8	% 2	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	openaccess.biruni.edu.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 2
3	acikerisim.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	KÖSEOĞLU ÖRNEK, Özlem. "Çalışan Çocukların Psikolojik Sağlık Sorunları: Sistematiik Derleme", Türk Tabibleri Birliği, 2017. Yayın	<% 1
6	avesis.istanbulc.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	tampub.uta.fi İnternet Kaynağı	<% 1





