



T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI



**SİSPLATİN DİRENÇLİ ve DUYARLI
MDA-MB-231 HÜCRE HATLARINDA
ETOPOSİD ve VİNKRİSTİN'İN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

MEHMETHAN YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR

2023



T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK
ANABİLİM DALI



**SİSPLATİN DİRENÇLİ ve DUYARLI
MDA-MB-231 HÜCRE HATLARINDA
ETOPOSİD ve VİNKRİSTİN'İN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

MEHMETHAN YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Serap YALÇIN AZARKAN

KIRŞEHİR

2023

KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiđi Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduđum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiđimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 03/07/2023

Öđrenci
Mehmethan YILDIRIM

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa No

İÇİNDEKİLER DİZİNİ	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TABLolar DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı	2
1.2.Kanser Biyolojisi.....	3
1.3.Meme Kanseri.....	7
1.4.Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri.....	12
1.4.1. Cerrahi Yöntemler.....	12
1.4.2. Radyoterapi.....	12
1.4.3. Kemoterapi.....	12
1.4.4. Meme Kanseri Tedavilerinin Dezavantajları.....	13
1.4.4.1. Kemoterapinin Dezavantajları.....	13
1.4.4.2. Radyoterapinin Dezavantajları.....	14
1.5.Metastaz ve İnvazivite.....	15
1.5.1.Meme Kanserinde Metastaz.....	17
1.6.Etoposid İlacı ve Etki Mekanizması.....	18
1.7.Vinkristin İlacı ve Etki Mekanizması.....	19
1.8. <i>VEGF-A</i> Geni ve Etki Mekanizması.....	20
1.9. <i>MMP-2</i> Geni ve Etki Mekanizması.....	22
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	25
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1.Tezde Kullanılan Hücre Hatları.....	27
3.1.2.Laboratuvarda Kullanılan Kimyasallar ve Kitler.....	27
3.1.3.Laboratuvarda Kullanılan Cihazlar.....	28
3.2. Metot.....	29
3.2.1.Hücre Kültürü.....	29

3.2.1.1. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarının İki Boyutlu Geliştirilmesi.....	29
3.2.1.2.MDA-MB-231 Hücre Hattına Sisplatin Direncinin Kazandırılması.....	29
3.2.1.3.Hücrelerin Pasajlanması.....	30
3.2.1.4.Etoposid ve Vinkristin İlaçlarının Ana ve Ara Stok Dozlarının Hesaplanması.....	31
3.2.2.Tyrpan Mavisi ile Hücre Sayımı.....	32
3.2.3. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarında Sitotoksosite Analizi.....	33
3.2.4.Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hattı Motilite Analizi.....	34
3.2.5.Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarında İnvazyon Tahlili.....	35
3.2.6.Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarının Üç Boyutlu Geliştirilmesi.....	36
3.2.7.Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	37
3.2.8.Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarında RNA İzolasyonu.....	37
3.2.9.NanoDrop ile İzole Edilen RNA'ların Ölçülmesi.....	37
3.2.10. cDNA Sentezi ve Ekspresyon Analizi.....	38
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	41
4.1. Bulgular.....	41
4.1.1.Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarında Sitotoksosite Bulguları.....	41
4.1.1.1. Duyarlı MDA-MB-231 Hücre Hattının Sitotoksosite Bulguları.....	41
4.1.1.2. Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hattının Sitotoksosite Bulguları.....	45
4.1.2. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarında Motilite Bulguları.....	50
4.1.2.1. Duyarlı MDA-MB-231 Hücre Hattının Motilite Analizi Bulguları.....	50
4.1.2.2. Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hattının Motilite Analizi Bulguları.....	55
4.1.3. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarında İnvazyon Tahlili Bulguları.....	60
4.1.3.1. Duyarlı MDA-MB-231 Hücre Hattının İnvazyon Tahlili Bulguları.....	60
4.1.3.2. Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hattının İnvazyon Tahlili Bulguları.....	65
4.1.4. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarının Üç Boyutlu Geliştirilmesinin Bulguları.....	69
4.1.4.1. Duyarlı MDA-MB-231 Hücre Hattının Üç Boyutlu Geliştirilmesinin Bulguları.....	69
4.1.4.2. Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hattının Üç Boyutlu Geliştirilmesinin Bulguları.....	74
4.1.5. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatları RT-PCR Bulguları.....	79
4.1.5.1. Duyarlı MDA-MB-231 Hücre Hattı RT-PCR Bulguları.....	79
4.1.5.2. Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hattı RT-PCR Bulguları.....	80
4.1.5.3. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarında β -Actin, MMP-2, VEGF-A Genlerinin RT-PCR Bulguları.....	81
4.2. Tartışma.....	82
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	89

6. KAYNAKLAR.....	93
ÖZGEÇMİŞ.....	99



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisansa başladığım ilk günden son güne kadar büyük bir ilgiliyi benden esirgemeyen hem lisans hem de yüksek lisans hayatımda bilgisiyle ve deneyimleriyle bana yol gösteren, sadece bir meselektaş ve hoca olarak değil bir ebeveyn olarak gördüğüm saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Serap YALÇIN AZARKAN'a; desteğini hissettiğim ve çalışmalarımı bana fikirlerini beyan edip yardım eden laboratuvar ekip arkadaşlarıma öncelikli olarak teşekkürlerimi borç bilirim.

Yüksek lisans dönemi boyunca beni asla yarı yolda bırakmayan, sevgi ve ilgisini asla esirgemeyen aileme; bu zorlu süreçte motivasyon verdikleri için aynı odayı paylaştığım yurt oda arkadaşlarıma; beni asla dinlemekten vazgeçemeyen en yakın arkadaşlarıma da teşekkür ve minnettarlığımı sunarım.

Tezimi, annem ve babam başta olmak üzere kardeşim Ayşe Hanım YILDIRIM'a ithaf ederim.

Haziran, 2023

Mehmethan YILDIRIM

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİSPLATİN DİRENÇLİ ve DUYARLI MDA-MB-231 HÜCRE HATLARINDA ETOPOSİD ve VİNKRİSTİN'İN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmethan YILDIRIM

KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. Serap YALÇIN
AZARKAN

Yıl: 2023 Sayfa: 99

Jüri: Prof. Dr. Serap YALÇIN
AZARKAN
Doç. Dr. Nevin ÇANKAYA
Dr. Öğr. Üyesi Selin ÖZKAN
KOTİLOĞLU

Günümüzde kanser üzerinde birçok araştırma yapılan ve yeni tedavi yöntemleri üzerinde çalışılan bir hastalıktır. Çeşitli yöntemlerle tedavi edilmeye çalışan kanser birçok türü bulunan ve çoğu zaman kötü prognozla sonuçlanmaktadır. Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Süt kanalları ve dış lobüllerde büyüyebilir, metastaz yaparak diğer dokulara ve organlara sıçrayabilmektedir. Her ne kadar meme kanseri denince tek bir morfolojisi varmış gibi algılsa da meme kanseri morfolojileri, hasta bireylere göre değişiklik gösterebilmekte; çevre ve biyolojik faktörlere göre gidişatı şekillenmektedir. Vinkristin, vinka alkaloidleri grubuna ait olarak bilinen bir ilaçtır. Bu ilaç, mikrotübül polimerizasyonuna etki etmekte ve mitoz bölünmeyi durdurarak hücre büyümesini bloke etmektedir. Etoposid, bir topoizomeraz II inhibitörüdür. Etoposid, geç S fazında ve erken G2 fazında hücre döngüsünün durmasını indükleyebilmekte ve podofillotoksinin yarı sentetik bir türevidir olarak literatürde bilinmektedir. Bu tezde, sisplatin duyarlı üçlü negatif meme kanser hücreleri (MDA-MB-231/Duyarlı) ve sisplatin dirençli üçlü negatif meme kanser hücreleri (MDA-MB-231/Sisplatin dirençli) üzerinde Etoposid ve Vinkristin'in sitotoksik ve metastatik, morfolojik ve moleküler etkileri incelenmiştir. Yapılan deneylerle, vinkristin ve etoposidin hem ayrı hem birlikte sinerjistik olarak sitotoksikite ve metastatik etkisinin araştırılması, daha sonraki çalışmalar için ön bir çalışma niteliği kazanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, Sisplatin, Vinkristin, Etoposid, Sisplatin Dirençli Meme Kanseri.

ABSTRACT

MSc THESIS

INVESTIGATION of THE EFFECT of ETOPOSIDE and VINCRISTINE on CISPLATIN-RESISTANT and SENSITIVE MDA-MB-231 CELL LINES

Mehmethan YILDIRIM

KIRŞEHİR AHI EVRAN UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

Supervisor: Prof. Dr. Serap YALÇIN
AZARKAN

Year: 2023 Pages: 99

Juries: Prof. Dr. Serap YALÇIN
AZARKAN
Assoc. Prof. Dr. Nevin ÇANKAYA
Assist. Prof. Dr. Selin ÖZKAN
KOTİLOĞLU

Today, cancer is a disease in which many kinds of research are done and new treatment methods are being studied. Cancer, which is tried to be treated with various methods, has many types and often results in a poor prognosis. Breast cancer is the most common type of cancer in women. It can grow in milk ducts and external lobules and spread to other tissues and organs by metastasizing. Although breast cancer is perceived as having a single morphology, breast cancer morphologies can vary according to patient individuals; Environmental and biological factors shape its course. Vincristine is a drug known as belonging to the group of vinca alkaloids. This drug affects microtubule polymerization and blocks cell growth by stopping mitosis. Etoposide is a topoisomerase II inhibitor. Etoposide can induce cell cycle arrest in the late S phase and early G2 phase and is known in the literature as a semi-synthetic derivative of podophyllotoxin. In this thesis, the cytotoxic and metastatic, morphological and molecular effects of Etoposide and Vincristine on cisplatin-sensitive triple-negative breast cancer cells (MDA-MB-231/sensitive) and resistant triple-negative breast cancer cells (MDA-MB-231/Sisplatin resistant) were investigated. Investigating the synergistic cytotoxicity and metastatic effects of vincristine and etoposide, both separately and together, has become a preliminary study for further studies.

Key Words: Breast cancer, Cisplatin, Vincristine, Etoposide, Cisplatin resistant breast cancer

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1.	Çalışmalarda kullanılmış olan kimyasallar ve kitlerin bir tablosu.....	27
Tablo 3.2.	Laboratuvarda kullanılan cihazların listesi.....	28
Tablo 3.3.	Çalışmada kullanılan ilaçlar, ana ve ara stok dozları ve kullanılma miktarlarının gösterimi.....	34
Tablo 3.4.	RT-PCR’da kullanılan primerlerin sekansları ve ısı dereceleri.....	39
Tablo 3.5.	cDNA sentezinde kullanılan bileşenler ve hacimleri.....	39
Tablo 3.6.	RT-PCR döngü işlemindeki optimum değerler.....	39



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1.	2020 yılındaki yaşa göre standardize edilen kanser insidans oranları.....	4
Şekil 1.2.	2020 yılındaki verilere göre her yaşta kadının Dünya genelindeki meme kanseri insidans oranı haritası.....	8
Şekil 1.3.	Göğüs yapısının anatomisini gösteren bir ilüstrasyon.....	9
Şekil 1.4.	Kanser hücrelerinin damar dolaşımındaki hali.....	16
Şekil 1.5.	VEGF ailesindeki reseptör ve ligand ilişkisi arasındaki bağların şematik gösterimi.....	21
Şekil 3.1.	Thoma lamından hücre sayımının şematik gösterimi.....	33
Şekil 4.1.	MDA-MB-231 hücre hattı kontrol grubu sitotoksosite bulgusu.....	41
Şekil 4.2.	MDA-MB-231 hücre hattı 5µM etoposid sitotoksosite bulgusu.....	42
Şekil 4.3.	MDA-MB-231 hücre hattı 10µM etoposid sitotoksosite bulgusu.....	42
Şekil 4.4.	MDA-MB-231 hücre hattı 50µM vinkristin sitotoksosite bulgusu.....	43
Şekil 4.5.	MDA-MB-231 hücre hattı 100µM vinkristin sitotoksosite bulgusu.....	43
Şekil 4.6.	MDA-MB-231 hücre hattı 5µM etoposid + 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu sitotoksosite bulgusu.....	44
Şekil 4.7.	MDA-MB-231 hücre hattı 10µM etoposid + 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu sitotoksosite bulgusu.....	44
Şekil 4.8.	MDA-MB-231 hücre hattı 5µM etoposid + 100µM vinkristin ilaç kombinasyonu sitotoksosite bulgusu.....	45
Şekil 4.9.	MDA-MB-231 hücre hattı 10µM etoposid + 100µM vinkristin ilaç kombinasyonu sitotoksosite bulgusu.....	45
Şekil 4.10.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı kontrol grubu sitotoksosite bulgusu.....	46
Şekil 4.11.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 5µM etoposid sitotoksosite bulgusu.....	46
Şekil 4.12.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 10µM etoposid sitotoksosite bulgusu.....	47
Şekil 4.13.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 50µM vinkristin sitotoksosite bulgusu.....	47
Şekil 4.14.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 100µM vinkristin sitotoksosite bulgusu.....	48
Şekil 4.15.	MDA-MB-231/Sisplatin hücre hattı 5µM etoposid + 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu sitotoksosite bulgusu.....	48
Şekil 4.16.	MDA-MB-231/Sisplatin hücre hattı 10µM etoposid + 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu sitotoksosite bulgusu.....	49
Şekil 4.17.	MDA-MB-231/Sisplatin hücre hattı 5µM etoposid + 100µM vinkristin ilaç kombinasyonu sitotoksosite bulgusu.....	49
Şekil 4.18.	MDA-MB-231/Sisplatin hücre hattı 10µM etoposid + 100µM vinkristin ilaç kombinasyonu sitotoksosite bulgusu.....	50
Şekil 4.19.	MDA-MB-231 hücre hattı kontrol grubu motilite bulgusu.....	50
Şekil 4.20.	MDA-MB-231 hücre hattı 5µM etoposid motilite bulgusu.....	51

Şekil 4.21.	MDA-MB-231 hücre hattı 10µM etoposid motilite bulgusu.....	51
Şekil 4.22.	MDA-MB-231 hücre hattı 50µM vinkristin motilite bulgusu.....	52
Şekil 4.23.	MDA-MB-231 hücre hattı 100µM vinkristin motilite bulgusu.....	52
Şekil 4.24.	MDA-MB-231 hücre hattı 5µM etoposid + 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu motilite bulgusu.....	53
Şekil 4.25.	MDA-MB-231 hücre hattı 10µM etoposid + 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu motilite bulgusu.....	53
Şekil 4.26.	MDA-MB-231 hücre hattı 5µM etoposid + 100µM vinkristin ilaç kombinasyonu motilite bulgusu.....	54
Şekil 4.27.	MDA-MB-231 hücre hattı 10µM etoposid + 100µM vinkristin ilaç kombinasyonu motilite bulgusu.....	55
Şekil 4.28.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı kontrol grubu motilite bulgusu...	55
Şekil 4.29.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 5µM etoposid motilite bulgusu...	56
Şekil 4.30.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 10µM etoposid motilite bulgusu.	56
Şekil 4.31.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 50µM vinkristin motilite bulgusu.....	57
Şekil 4.32.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 100µM vinkristin motilite bulgusu.....	57
Şekil 4.33.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 5µM etoposid + 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu motilite bulgusu.....	58
Şekil 4.34.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 10µM etoposid + 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu motilite bulgusu.....	58
Şekil 4.35.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 5µM etoposid + 100µM vinkristin ilaç kombinasyonu motilite bulgusu.....	59
Şekil 4.36.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 10µM etoposid + 100µM vinkristin ilaç kombinasyonu motilite bulgusu.....	59
Şekil 4.37.	MDA-MB-231 hücre hattı kontrol grubu invazyon tahlili bulgusu.....	60
Şekil 4.38.	MDA-MB-231 hücre hattı 5µM etoposid invazyon tahlili bulgusu.....	61
Şekil 4.39.	MDA-MB-231 hücre hattı 10µM etoposid invazyon tahlili bulgusu.....	61
Şekil 4.40.	MDA-MB-231 hücre hattı 50µM vinkristin invazyon tahlili bulgusu.....	62
Şekil 4.41.	MDA-MB-231 hücre hattı 100µM vinkristin invazyon tahlili bulgusu.....	62
Şekil 4.42.	MDA-MB-231 hücre hattı 5µM etoposid + 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu invazyon tahlili bulgusu.....	63
Şekil 4.43.	MDA-MB-231 hücre hattı 10µM etoposid + 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu invazyon tahlili bulgusu.....	63
Şekil 4.44.	MDA-MB-231 hücre hattı 5µM etoposid + 100µM vinkristin ilaç kombinasyonu invazyon tahlili bulgusu.....	64
Şekil 4.45.	MDA-MB-231 hücre hattı 5µM etoposid + 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu invazyon tahlili bulgusu.....	64
Şekil 4.46.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı kontrol grubu invazyon tahlili bulgusu.....	65
Şekil 4.47.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 5µM etoposid invazyon tahlili bulgusu.....	65

Şekil 4.48.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 10µM etoposid invazyon tahlili bulgusu.....	66
Şekil 4.49.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 50µM vinkristin invazyon tahlili bulgusu.....	66
Şekil 4.50.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 100µM vinkristin invazyon tahlili bulgusu.....	67
Şekil 4.51.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 5µM etoposid + 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu invazyon tahlili bulgusu.....	67
Şekil 4.52.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 10µM etoposid + 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu invazyon tahlili bulgusu.....	68
Şekil 4.53.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 5µM etoposid + 100µM vinkristin ilaç kombinasyonu invazyon tahlili bulgusu.....	68
Şekil 4.54.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 10µM etoposid + 100µM vinkristin ilaç kombinasyonu invazyon tahlili bulgusu.....	69
Şekil 4.55.	MDA-MB-231 hücre hattı kontrol grubu 3D bulgusu.....	70
Şekil 4.56.	MDA-MB-231 hücre hattı 5µM etoposid 3D bulgusu.....	70
Şekil 4.57.	MDA-MB-231 hücre hattı 10µM etoposid 3D bulgusu.....	71
Şekil 4.58.	MDA-MB-231 hücre hattı 50µM vinkristin 3D bulgusu.....	71
Şekil 4.59.	MDA-MB-231 hücre hattı 100µM vinkristin 3D bulgusu.....	72
Şekil 4.60.	MDA-MB-231 hücre hattı 5µM etoposid + 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu 3D bulgusu.....	72
Şekil 4.61.	MDA-MB-231 hücre hattı 10µM etoposid + 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu 3D bulgusu.....	73
Şekil 4.62.	MDA-MB-231 hücre hattı 5µM etoposid + 100µM vinkristin ilaç kombinasyonu 3D bulgusu.....	73
Şekil 4.63.	MDA-MB-231 hücre hattı 10µM etoposid + 100µM vinkristin ilaç kombinasyonu 3D bulgusu.....	74
Şekil 4.64.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı kontrol grubu 3D bulgusu.....	74
Şekil 4.65.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 5µM etoposid 3D bulgusu.....	75
Şekil 4.66.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 10µM etoposid 3D bulgusu.....	75
Şekil 4.67.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 50µM vinkristin 3D bulgusu.....	76
Şekil 4.68.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 100µM vinkristin 3D bulgusu.....	76
Şekil 4.69.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 5µM etoposid + 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu 3D bulgusu.....	77
Şekil 4.70.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 10µM etoposid + 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu 3D bulgusu.....	77
Şekil 4.71.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 5µM etoposid + 100µM vinkristin ilaç kombinasyonu 3D bulgusu.....	78
Şekil 4.72.	MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı 10µM etoposid + 100µM vinkristin ilaç kombinasyonu 3D bulgusu.....	79
Şekil 4.73	2 Boyutlu hücre hatlarından izole edilen cDNA'nın MDA-MB-231 hücre hattındaki RT-PCR <i>VEGF-A</i> geni ekspresyon değerleri.....	79
Şekil 4.74	3 Boyutlu hücre hatlarından izole edilen cDNA'nın MDA-MB-231 hücre hattındaki RT-PCR <i>VEGF-A</i> geni ekspresyon değerleri.....	80

Şekil 4.75	2 Boyutlu hücre hatlarından izole edilen cDNA'nın MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattındaki RT-PCR <i>VEGF-A</i> geni ekspresyon değerleri.....	80
Şekil 4.76.	3 Boyutlu hücre hatlarından izole edilen cDNA'nın MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattındaki RT-PCR <i>VEGF-A</i> geni ekspresyon değerleri.....	80
Şekil 4.77.	<i>β-Actin</i> geninin RT-PCR ifadesinin sonuçları.....	81
Şekil 4.78.	<i>MMP-2</i> geninin RT-PCR ifadesinin sonuçları.....	81
Şekil 4.79.	<i>VEGF-A</i> geninin RT-PCR ifadesinin sonuçları.....	81



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μL	:	Mikromolar
μL	:	Mikrolitre
M	:	Molar
β	:	Beta

Kısaltmalar

Kısaltmalar	Açıklama
ER	: Östrojen Reseptörü
HER-2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 2
S	: Sentez Fazı (Hücre Bölünmesi)
G2	: Büyüme Fazı (Hücre Bölünmesi)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
M	: Mitoz
BRCA1	: Meme Kanseri Geni 1
BRCA2	: Meme Kanseri Geni 2
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
TP53	: Tümör Protein 53
CTC	: Kanda Dolaşan Kanser Hücreleri
TopoI	: Topoizomeraz I
TopoII	: Topoizomeraz II
MDR	: Çoklu İlaç Dirençli
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
MZS	: Merkezi Sinir Sistemi
CHOP	: Kemoterapi
DMSO	: Dimetilsülfoksit
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
PBS	: Fosfat Buffer Salın
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute (Besiyer Markası)
RNaz	: Ribonükleaz
DNaz	: Deoksiribonükleaz
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
DEPC	: Dietil pürokarbonat
RT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi
ECM	: Ekstraselüller Matris

1. GİRİŞ

Kanser hastalığı, dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biri olarak bilinmektedir ve tüm gelir düzeylerindeki ülkeleri etkileyen bir hastalıktır. Kanser vakalarının ve ölümlerinin sayısı, popülasyonların artması, yaşlanma, yaşam tarzı alışkanlıkları ve risk faktörlerinin artması gibi faktörlerle birlikte hızla artmaktadır. Özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde, ekonomik geçiş sürecindeki değişiklikler kanser yükünü artıran faktörler arasında yer almaktadır. Bu ülkelerde ulaşımın artması, işgücünün daha fazla mekanizasyonu ve uluslararası pazarlara daha fazla maruz kalma gibi etkenler kanserin oluşma riskini artırabilmektedir. Bunun yanı sıra, yüksek gelirli ülkelerde yaygın olan yaşam tarzı risk faktörlerinin, örneğin tütün kullanımı, fiziksel hareketsizlik, aşırı vücut ağırlığı ve üreme alışkanlıkları gibi faktörlerin düşük ve orta gelirli ülkelerde de yaygınlaşması söz konusudur (Arun U., 2020).

Tütün kullanımı, kanser gelişimi için önemli bir risk faktörüdür ve dünya genelinde yaygındır. Fiziksel hareketsizlik, obezite, yetersiz beslenme ve alkol tüketimi gibi yaşam tarzı alışkanlıkları da kanser riskini artırabilir. Bu faktörlerin yaygınlaşması, kanser vakalarının artmasına katkıda bulunmaktadır. Kanserın önlenmesi ve kontrol altına alınması için önleyici sağlık politikalarının ve toplum bilincinin geliştirilmesi önemlidir. Tütün kontrolü, sağlıklı beslenme, düzenli fiziksel aktivite, aşılama programları ve erken teşhis taramaları gibi stratejiler kanser vakalarının azaltılmasına yardımcı olabilir. Ayrıca, kanser tedavisi için kaynakların artırılması da önemlidir (National Institute of Health, 2007).

Kanser araştırmaları ve küresel iş birlikleri, kanser yükünün azaltılması ve daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için önemlidir. Kanserın, erken teşhis ve uygun tedavi ile önlenmesi sağlabilmektedir. Böylece kanserle mücadelede ilerleme kaydedilebilir ve insanların yaşam süresi ve yaşam kalitesi iyileştirilebilir (Torre ve ark., 2016).

Kanser tedavisinin iyileştirilmesi ve yan etkilerin azaltılması için yeni ve etkili tedavilere ihtiyaç vardır. Geleneksel kanser tedavileri, özellikle kemoterapi ve radyoterapi, bazı durumlarda ciddi yan etkilere neden olabilir. Bu nedenle araştırmacılar, kanser tedavisinin yan etkilerini hafifletebilecek ve tedavi etkinliğini artırabilecek alternatif tedavi yöntemleri araştırmaktadır.

MDA-MB-231 hücre hattı, yaygın olarak geç evre meme kanserini modellemek için kullanılan bir hücre hattıdır. Bu hücre hattı, östrojen reseptörü (*ER*), progesteron reseptörü (*PR*) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (*HER2*) negatif olduğu için üçlü negatif meme kanserini temsil eder. Ayrıca, *p53* geninin mutasyona uğramış bir formunu da ifade etmektedir (J. Welsh, 2013).

Etoposid adlı ilaç, bir topoizomeraz II inhibitörüdür. Etki mekanizması, hücre döngüsünün geç S ve G2 fazlarına etki etmektir. Topoizomeraz II, DNA'nın çift sarmalını keserek çift sarmallı DNA kırıkları oluşturur ve yeniden mühürler. Etoposid, bu mekanizmayı etkileyerek DNA kırıklarının tamirini engeller ve kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını durdurur (Reyhanoğlu ve ark., 2022).

Vinkristin ise tübülün adı verilen proteinlere bağlanarak etki eder. Bu bağlanma, mikrotübül adı verilen hücre iskeletinin yapıtaşlarının oluşumunu engeller. Özellikle M ve S fazlarındaki mitotik bölünme aşamasında, mitozun metafazda durmasına neden olur. Vinkristin'in diğer bir etki mekanizması ise glutamik asit kullanımını bloke ederek nükleik asit ve protein sentezini etkilemektir (Bellow ve ark., 2022).

Bu ilaçlar MDA-MB-231 hücre hattında kullanılarak, kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engellemeyi amaçlayan tedavi stratejileri olarak araştırılmaktadır. Ancak, belirtmek gerekir ki ilaçlar ve tedavi stratejileri, kanserin farklı tipleri ve evreleri için farklılık gösterebilir ve her hasta için bireysel olarak değerlendirilmelidir.

1.1. Tezin Amacı

Çalışmanın dört ana amacı bulunmaktadır:

1.Etoposid ve vinkristin ilaçlarının ayrı ayrı meme kanseri hücreleri üzerindeki metastatik ve sitotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2.Etoposid ve vinkristin ilaçlarının birlikte meme kanseri hücreleri üzerindeki metastatik ve sitotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

3.Uygulamaların aynı zamanda hem duyarlı (MDA-MB-231) hem de ilaç dirençli (MDA-MB-231/sispaltin dirençli) hale getirilmiş hücre hatları üzerinde yapılması amaçlanmaktadır.

4. Etoposid ve vinkristin ilaçlarının hem ayrı ayrı hemde birlikte Sispaltin dirençli ve duyarlı meme kanseri hücreleri üzerindeki *VEGF-A* gen ifadesindeki değişikliklerin araştırılması hedeflenmektedir.

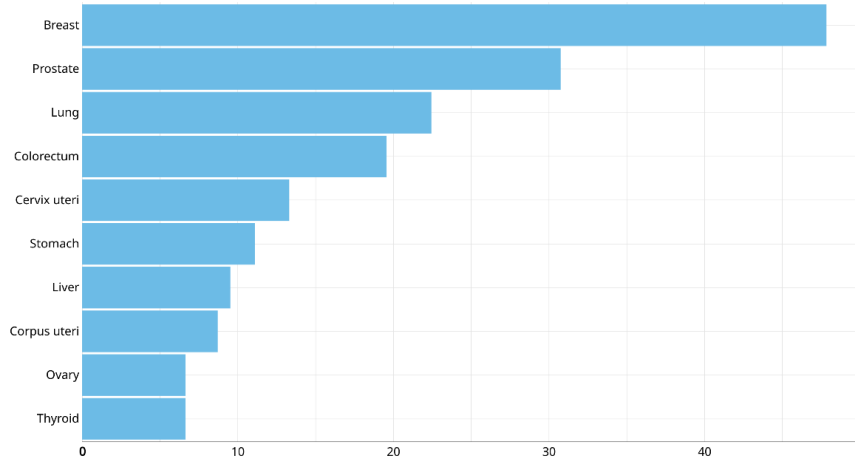
1.2. Kanser Biyolojisi

Kanser anormal hücre büyümesi ve kontrolsüz çoğalma sonucunda ortaya çıkan bir hastalıktır. Vücudun herhangi bir dokusunda başlayarak zamanla diğer bölgelere yayılma potansiyeline sahip olabilmektedir. Kanser, hem kötü huylu (malign) hem de iyi huylu (benign) tümörleri içermektedir (D. Hausman, 2019).

Kanser hastalığı, dünya genelinde ölümlerin önemli bir nedeni olarak sayılmaktadır. 2020 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nden yayınlanan verilere göre kanser, 9.6 milyon ölümün içinde ikinci sıraya yerleşmiştir. Kanser, farklı organlarda farklı sıklıklarda görülebilmektedir. Erkeklerde en sık görülen kanser tipleri; akciğer kanseri, prostat kanseri, kolorektal (bağırsak) kanseri, mide kanseri ve karaciğer kanseridir. Kadınlarda ise meme kanseri, kolorektal kanser, akciğer kanseri, servikal kanser ve tiroid kanseri günümüzde en yaygın olanlarıdır. 2020 yılındaki Birleşmiş Milletler Sağlık Örgütü verilerine göre 2,3 milyon kadından 685 bin kadarı meme kanserinden hayatını kaybetmiştir. Son 5 yıla ait 7,8 milyon meme kanseri teşhisi, kanser türleri arasında kadınlarda en sık görülen kanser türünün meme kanseri olduğunu istatistiksel olarak vurgulamaktadır (Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü, 2023).

Kanserin risk faktörleri arasında tütün kullanımı, alkol tüketimi, beslenme alışkanlıkları, obezite, hareketsiz yaşam tarzı, genetik yatkınlık, enfeksiyonlar ve çevresel faktörler bulunmaktadır. Erken teşhis, kanserin tedavi edilebilirliği açısından son derece önemlidir. Kanser taramaları ve düzenli kontroller, erken evrede kanseri tespit etmeye ve tedavi seçeneklerini artırmaya yardımcı olabilmektedir.

Kanserin tedavisi, kanserin tipine, evresine ve hastanın genel sağlık durumuna bağlı olarak farklı yöntemleri içerebilmektedir. Bunlar arasında; cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, hedefe yönelik tedaviler ve hormonal tedavileri bulunmaktadır. Tedavi yaklaşımı, multidisipliner bir ekibin değerlendirmesi ve hastanın bireysel durumu dikkate alınarak belirlenmektedir. Kanser araştırmaları ve tedavisi, sürekli olarak ilerlemekte olan bir alandır. Yeni tedavi seçeneklerinin keşfedilmesi, hastaların yaşam sürelerini ve yaşam kalitelerini artırmayı hedefler (Mercadante ve ark., 2022).



Şekil 1.1. 2020 yılındaki yaşa göre standardize edilen kanser insidans oranlarının grafik tablosu (Cancer Today, 2023).

Çevresel faktörler ve yaşam standardına bağlı faktörler, kanser tiplerinin çoğunun gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Kanserın etiyojisi, hem kalıtsal genetik anormalliklerle ilişkili olan (%5-%10) hem de eksojen ve endojen çevresel ajanların neden olduğu edinilmiş genetik anormalliklerle ilişkilidir (%90-%95). Bu faktörlerin karmaşık etkileşimi kanser riskini artırarak, belirli dokular ve organlar üzerinde etkili olabilir. Epidemiyolojik çalışmalar, çevresel kimyasallara, fiziksel ajanlara veya biyolojik ajanlara maruz kalmanın kanser riskini artırdığını göstermiştir. Örneğin, bazı endüstriyel kimyasallar, radyasyon, asbest, sigara dumanı gibi çevresel faktörler kanser riskini artırabilir. Maruziyetin dozu, süresi ve genetik veya edinilmiş konakçı faktörlerle olan karmaşık etkileşimleri, kanser gelişiminde kritik belirler olarak bilinmektedir (Mau ve ark., 2016).

Çevresel kanserojenlere maruz kalma kanser riskini artırabilir. Ancak bu risk faktörlerine maruz kalmak kanseri kesinlikle garanti etmez. Her bireyin genetik yatkınlığı ve yaşam tarzı faktörleri de kanser riskini etkiler. Sağlıklı yaşam tarzı seçimleri, kanser riskini azaltmaya yardımcı olabilir. Bunlar arasında sigara ve alkol tüketiminden kaçınma, sağlıklı beslenme, düzenli egzersiz yapma, güneşten korunma ve enfeksiyonlara karşı önlemler almak yer almaktadır. Kanser araştırmaları, çevresel risk faktörlerinin belirlenmesi ve kanser gelişimindeki moleküler mekanizmaların anlaşılması üzerinde odaklanmaktadır. Bu araştırmalar, kanserle mücadelede önleyici stratejilerin geliştirilmesine ve daha etkili tedavi yöntemlerinin bulunmasını hedefler. Ayrıca, çevresel faktörlere maruziyetin azaltılması ve koruyucu önlemlerin alınması, kanser vakalarının önlenmesinde büyük önem arz etmektedir (Torre ve ark., 2016).

Kanser, anormal hücre çoğalması sonucu oluşan tümörlerden kaynaklanmaktadır. Bu tümörler iyi huylu veya kötü huylu olabilmektedir. İyi huylu tümörler, buldukları lokasyonda kalırlar ve çevredeki dokulara yayılmazlar. Bu tür tümörler genellikle daha yavaş büyürler ve çoğu zaman tedavi edilebilirler. İyi huylu tümörler, normal hücreleri çevreleyen dokulara baskı yapabilir, ancak bu dokuları istila etmezler. Normal vücut fonksiyonlarını bozmazlar. Kötü huylu tümörler ise istila etme ve metastaz yapma potansiyeline sahiptir. Bu tür tümörler, orijinal yerlerinden çıkarak çevredeki dokulara yayılabilir ve lenfatik sistem veya dolaşım sistemi aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine yayılabilirler. Metastaz, kanser hücrelerinin başka organlara veya dokulara yayılması anlamına gelir ve kanserin ilerlemesini daha tehlikeli hale getirir. Kötü huylu tümörler daha hızlı büyüebilir ve tedavi edilmemesi durumunda bireyin yaşamını tehdit edebilmektedirler (Skuse, 2015).

Kanser hücrelerinin istila etme ve metastaz yapma yetenekleri, kanserin ciddiyetini belirleyen faktörlerdir. Bu nedenle, kanserin erken teşhis ve tedavi edilmesi önemlidir. Çünkü erken aşamada kanserin tipi ve evresi belirlenirse, bireyin tedavi şansı daha yüksek olmaktadır. Kanser araştırmaları ve tedavileri, kanser hücrelerinin yayılmasını engellemek için çeşitli stratejiler geliştirmeye odaklanmaktadır. Kanserler genellikle karsinomlar, sarkomlar ve lenfomalar olarak sınıflandırılmaktadır. Bu grupların genel özellikleri:

Karsinomlar: Karsinomlar, vücudun epitel veya bezsel yapıdaki dokularında ortaya çıkan kanser türleridir. Epitel dokular, vücut yüzeyini (deri), iç organların iç yüzeyini (akciğerler, mide, bağırsaklar, meme gibi) ve dış salgı bezlerini (tiroid, pankreas, böbrek üstü bezleri gibi) kaplayan dokulardır. Karsinomlar, kanserlerin yaklaşık %90'ını oluştururlar ve meme, prostat, akciğer, kolon gibi birçok kanser türünü kapsayan sınıfa oluşturmaktadırlar.

Sarkomlar: Sarkomlar, bağ dokusunda (kas, kemik, kıkırdak, fibröz doku gibi) meydana gelen katı tümörlerdir. Sarkomlar, vücudun iskelet sistemine, kaslara ve yumuşak dokulara etki edebilirler. Kanser vakalarının karsinomlara nazaran daha küçük bir yüzdesini oluşturmakta ve genellikle daha ender görülmektedirler.

Lenfomalar: Lenfomalar, bağışıklık sisteminin bir parçası olan lenfatik sistemde ortaya çıkan kanser türleri olarak bilinen bir sınıflandırmadır. Lenfatik sistem; lenf düğümleri, lenf kanalları ve dalak gibi organları içermektedir. Lenfomalar, lenfosit adı verilen bağışıklık hücrelerinden kaynaklanır. Kanser vakalarının yaklaşık %8'ini lenfomalar oluşturmaktadır (Cooper, 2000).

Vücutun farklı bölgelerinde yer alan kanserlerin çeşitli türleri vardır. Meme, prostat, akciğer ve kolon kanserleri, tüm kanser vakalarının büyük bir yüzdesini oluşturmaktadır. Bu kanserler erken teşhis ve tedavi ile daha iyi sonuçlar elde edilebilen kanser türleridir. Kanser araştırmaları ve erken tarama yöntemleri, bu yaygın kanser türlerinin teşhisini ve tedavisini geliştirmek için devam etmektedir. Tümör hücreleri normal hücrelerden farklılık göstermektedir ve bir dizi değişikliklere sahiptirler. Bu farklılıklar kanser hücrelerinin büyüme kontrolünden hücre yapısına kadar birçok alanında ortaya çıkmaktadır. Bazı temel farklılıklara bakıldığında:

Büyüme kontrolü: Kanser hücreleri normal hücrelerden farklı olarak kontrolsüz bir şekilde büyür ve çoğalır. Normal hücrelerin büyüme ve çoğalma süreçleri sıkı bir şekilde düzenlenirken, kanser hücreleri bu düzenlemeyi kaybeder.

Morfoloji: Kanser hücreleri normal hücrelerden farklı bir şekle sahip olabilir. Normal hücreler düzenli bir yapıya sahipken, kanser hücreleri genellikle anormal bir şekle ve düzensiz bir görünüme sahip olabilir.

Hücreden hücreye etkileşimler: Kanser hücreleri normal hücrelerle sağlıklı etkileşimlerde bulunamazlar. Normal hücreler birbirleriyle iletişim kurarak doku yapısını korurken, kanser hücreleri bu etkileşimleri bozmaktadır.

Zar özellikleri: Kanser hücrelerinin hücre zarı, normal hücrelere kıyasla farklı özelliklere sahip olabilir. Bu değişiklikler kanser hücrelerinin istila ve metastaz yeteneklerini artırabilmektedir.

Hücre iskelet yapısı: Kanser hücreleri normal hücrelere göre farklı bir hücre iskelet yapısına sahip olabilir. Bu, hücrenin şeklini ve hareketini etkileyebilmektedir.

Protein salgısı: Kanser hücreleri normal hücrelere kıyasla farklı proteinler salgılayabilir. Bu proteinler, tümör büyümesini teşvik edebilmekte veya çevredeki dokulara zarar verebilmektedir (Lodish ve ark., 2000).

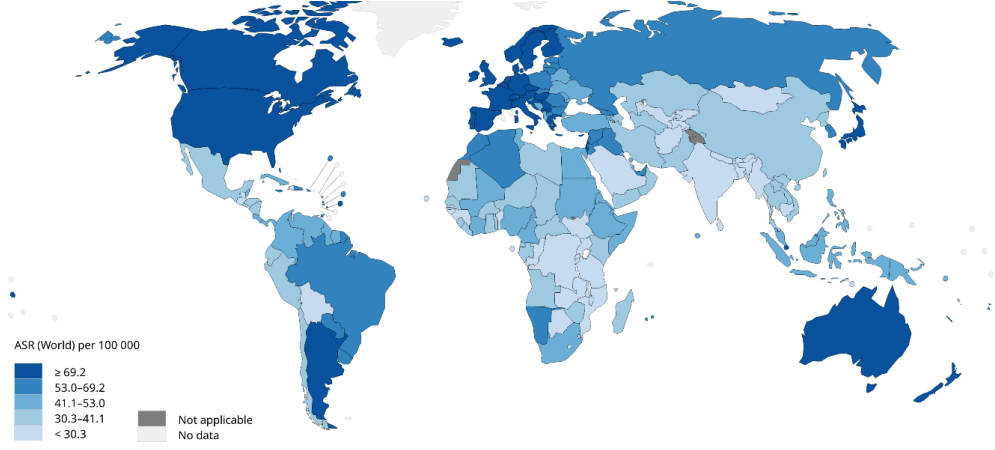
Kanser gelişiminde proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler önemli rol oynamaktadır. Proto-onkogenler normalde hücre büyümesini ve çoğalmasını kontrol eden proteinleri kodlar. Ancak, mutasyonlar veya aşırı gen ifadesi durumunda, proto-onkogenler kanser gelişimine katkıda bulunan onkogenlere dönüşebilmektedirler. Tümör baskılayıcı genler ise hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve hücrelerin anormal büyümesini önlemede önemli roller üstlenmektedir. Bu genlerin mutasyonları, kanser gelişimine katkıda bulunabilmekte ve hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına yol açabilmektedir. Bu farklılıkların anlaşılması, kanserin oluşumu ve ilerlemesiyle ilgili daha iyi anlayışa ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır (Feng ve ark., 2018).

1.3. Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Hem insidans (yeni vakaların sayısı) hem de mortalite (ölüm oranı) açısından önemli bir sağlık sorunudur. Meme kanseri tanısı konulan kadınların sayısı her yıl artmaktadır (Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü, 2023).

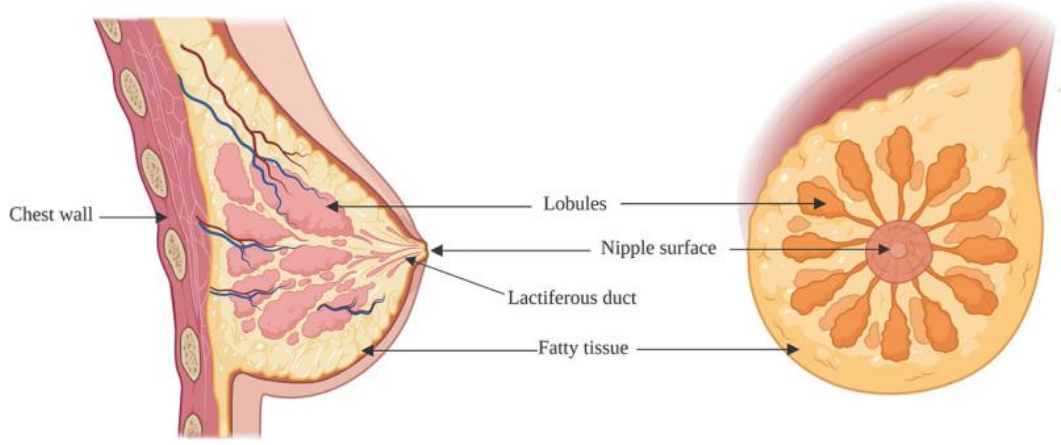
Meme kanseri, meme dokusunda başlayan anormal hücre büyümesiyle karakterizedir. Erken teşhis ve tedavi önemlidir, çünkü erken evrede teşhis edilen meme kanserinin tedavi edilebilme şansı daha yüksektir. Meme kanserinin risk faktörleri arasında yaş, genetik faktörler, hormonal faktörler, obezite, alkol tüketimi, sigara içme, hormonal tedaviler, radyasyon maruziyeti ve aile öyküsü gibi faktörler yer almaktadır. Ancak, birçok meme kanseri vakasının nedeni tam olarak bilinmemektedir (Park ve ark., 2022).

Tedavi yaklaşımı, meme kanserinin evresine, türüne ve diğer faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. Tedavi seçenekleri arasında cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi ve hedefe yönelik tedaviler bulunmaktadır. Tedavi planı, hastanın durumu ve tercihleri dikkate alınarak bireyselleştirilir. Meme kanseri hakkında farkındalık ve erken teşhis programları, bu hastalığın sıklığını azaltmada ve sağkalım oranlarını artırmada önemli bir rol oynamaktadır. Kadınlar, risk faktörlerini ve belirtileri öğrenerek kendi sağlıklarını takip etmeli ve düzenli olarak taramalara katılmalıdır (Park ve ark., 2022).



Şekil 1.2. 2020 yılındaki verilere göre her yaştan kadının Dünya genelindeki meme kanseri insidans oranı haritası (Cancer Today, 2023).

Memenin anatomik yapısı, göğüs bariyeri üzerinde bulunan pektoralis major kası ve göğüs duvarına bağlı olan destekleyici bağlardan oluşmaktadır. Meme dokusu, süt üretimiyle ilişkili bezleri içeren lobüllerden oluşan on beş ile yirmi arasında dairesel loblar içermektedir. Her lob, hormonlara yanıt olarak süt üretimi gerçekleştiren bezlerden oluşan lobülleri içerir. Lobüller, süt kanalları vasıtasıyla meme başına açılır. Bu süt kanalları, sütün memeden çıkmasını sağlar. Memenin büyüklüğü ve şekli, lobları örten yağ dokusunun miktarına bağlı olarak değişebilmektedir. Bu yağ dokusu, memenin görünümünü ve dolgunluğunu etkiler. Meme yapısı, hormonal değişikliklere ve yaşa bağlı olarak da değişiklik gösterebilmektedir. Özellikle gebelik ve emzirme dönemlerinde meme dokusu daha aktif hale gelir ve süt üretimi için hazırlanır. Hormonlar, meme dokusunun büyümesi ve süt üretiminin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Memenin anatomik yapısının iyi anlaşılması, meme kanseri gibi hastalıkların teşhis ve tedavisinde yardımcı olmaktadır. Meme muayenesi ve mamografi gibi tarama yöntemleri, meme kanserinin erken teşhisi için büyük bir önem arz etmektedir (Fares *ve ark.*, 2020; Orrantia *ve ark.*, 2022).



Şekil 1.3. Göğüs yapısının anatomisini gösteren bir ilüstrasyon (Orrantia ve ark., 2022).

Meme kanserinin çoğunluğu karsinom adı verilen tümörlerden oluşmaktadır. Karsinomlar, meme dokusunun epitelyal hücrelerinden köken almaktadır. Meme dokusunun bezlerinden veya süt kanallarından kaynaklanan bu tümörler, en sık görülen meme kanseri tipleridir. Sarkomlar ise meme kanserinde ender olarak görülmektedir. Filloid tümörler, meme stromasından (bağ dokusu) kaynaklanan ender tümörlerdir ve genellikle iyi huylu olma eğilimindedirler. Antiyosarkomlar ise meme stromasından kaynaklanan kötü huylu tümörler olarak adlandırılmaktadırlar (Fares ve ark., 2020).

Meme kanserinin risk faktörleri çoğunlukla bireyin kontrolü dışında gelişmektedir. Cinsiyet, önemli bir risk faktörüdür, çünkü kadınlarda meme kanseri görülme olasılığı erkeklere kıyasla çok daha yüksektir. Genetik faktörler de önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle *BRCA1* ve *BRCA2* gibi mutasyonlar, meme kanseri riskini artırmaktadır. Ayrıca ailede meme kanseri öyküsü olan kişilerde de risk yüksektir. Yaşlılık faktöründe meme kanseri riskini artıran faktörlerden biridir. Yaşın ilerlemesiyle birlikte meme kanseri riski artmaktadır. Diğer risk faktörleri arasında; hormonal faktörler (östrojen ve progesteron), önceden teşhis edilmiş meme kanseri, östrojen hormonu içeren hormon replasman tedavisi, obezite, alkol tüketimi ve radyasyon maruziyeti yer almaktadır (Smolarz ve ark., 2022).

BRCA1 ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonlar meme kanseri riskini artırırken, *PTEN* veya *TP53* gibi diğer genlerdeki mutasyonlar da meme kanseri gelişimine katkıda bulunabilmektedir. Yüksek risk grubunda olan kadınlarda bu genetik mutasyonların test edilmesi, meme kanserinin erken teşhis edilmesi veya gelişiminin önlenmesi için önemli olabilmektedir. Meme kanserinin kötü huylu olarak gelişmesinin ana sebeplerinden biri metastazdır.

Metastaz, meme kanseri hücrelerinin başlangıçta oluşan tümörden ayrılarak vücudun başka bölgelerine yayılması anlamına gelmektedir. Bu metastazlar genellikle kemik, akciğer, karaciğer ve beyin gibi uzak organlara ulaşabilmektedirler. Metastazlar, kanserin tedavi ve prognozunu etkileyebilirler. Bazı hastalarda meme kanseri agresif olmakta ve birincil tümörün tespit edilmesinden kısa bir süre sonra uzak bölgelere metastaz yapabilmektedir. Ancak diğer durumlarda, metastazlar daha uzun bir süre boyunca belirgin hale gelmeyebilir. Bu durumda, meme kanserinin metastaz risk faktörlerini belirlemek ve uygun tedavi seçeneklerini değerlendirmek zorlaşabilmektedir (Feng ve ark., 2018).

Tümör baskılayıcı genler, normal doku büyüme kontrolünde önemli bir rol oynar. Bu genler, hücre proliferasyonunu sınırlayan ve tümör oluşumunu önleyen proteinlerin üretiminden sorumludur. Ancak, tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen nokta mutasyonları, delesyonlar veya ekspresyon kaybı gibi değişiklikler sonucunda bu genlerin işlevi bozulabilmektedir. Bu durumda, hücre büyümesi ve çoğalması kontrolsüz hale gelebilmektedir. *BRCA1* ve *BRCA2* genleri, tümör baskılayıcı genler olarak kabul edilmektedirler. Bu genlerin mutasyonları, meme, yumurtalık, prostat ve kolon kanseri gibi çeşitli kanser türlerinin gelişimine yol açabilmektedir. Yıllardır yapılan araştırmalar, *BRCA* genlerindeki mutasyonların kanser riskini artırdığını göstermiştir. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde yüzden fazla farklı doğal mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar, *BRCA* genlerinin işlevini etkileyerek kanser gelişimine katkıda bulunabilmektedir (Tufail ve ark., 2022).

BRCA mutasyonlarının penetransı oldukça yüksektir, yani mutasyona sahip olan bireylerin büyük bir kısmında kanser gelişme riski artmıştır. Bu nedenle, *BRCA* mutasyonlarına sahip olan kişilerin düzenli tarama ve önleyici tedavi yöntemleriyle kanser riskini yönetmeleri büyük önem arz etmektedir. Ayrıca *BRCA* genetik testleri, yüksek risk taşıyan bireylerin erken teşhis ve tedavisi için uygun önlemleri almasına yardımcı olabilmektedir (Casabuon ve ark., 2020).

Meme kanseri araştırmaları ve çalışmaları, meme kanserinin farklı alt gruplara ayrılabilceğini göstermektedir. Bu alt gruplar, tümör hücrelerinin özelliklerine, hormon reseptörü durumuna ve genetik yapıya göre sınıflandırılmıştır. Aşağıda belirtilen altı ana alt grupta meme kanseri tanımlanmıştır:

Luminal A: Luminal A tümörleri, meme kanallarını kaplayan iç hücrelerden kaynaklanmaktadır. Bu tümörler genellikle östrojen reseptörü (*ER*) ve progesteron reseptörü (*PR*) pozitif, *HER-2* negatiftir. Luminal A tümörleri en iyi prognoza sahip olanlardır.

Luminal B: Luminal B tümörleri de iç hücrelerden kaynaklanmakta ancak Luminal A tümörlerine göre daha agresif özellikleri bulunmaktadır. Luminal B tümörleri, *ER* ve/veya *PR* pozitif olabilir. Daha yüksek dereceli tümörler, büyük boyut ve lenf düğümü tutulumu gibi özelliklere sahip olabilir ve daha kötü prognoza sahiptirler.

Üçlü negatif/bazal benzeri: Üçlü negatif meme kanseri, *ER*, *PR* ve *HER-2* negatif olan tümörleri tanımlamaktadır. Bu tümörler, bazal hücrelere benzer özelliklere sahip olabilir. Üçlü negatif meme kanseri genellikle agresif ve kötü bir prognoza sahiptir.

HER-2 tipi: *HER-2* tipi tümörler, *ER* ve *PR* negatif, *HER-2* pozitif olanlardır. Bu tümörler genellikle lenf düğümü oluşumu düşük dereceli olarak bilinmektedirler. *HER-2* tipi tümörlerin prognozu kötüdür ve tekrarlama ve metastaz eğilimine sahiptirler. Genellikle daha genç kadınlarda görülür.

Claudin-low: Claudin-low tümörler genellikle üçlü negatif tümörlerdir, ancak farklılıkları, hücre-hücre adezyon proteinlerinin azalması ve lenfosit infiltrasyonunun sıklıkla görülmesine dayanmaktadır. Claudin-low tümörler mezankimal ve kök hücre özelliklerine sahip olabilmektedir.

Normal benzeri: Normal benzeri tümörler, meme kanserinin daha nadir bir alt grubunu oluşturmaktadır. Bu tümörler genellikle küçük boyutta ve iyi bir prognoza tümör yapıları olarak bilinmektedirler (Torre ve ark., 2016).

Bu alt gruplar, meme kanserinin heterojen doğasını ve farklı moleküler özelliklerini yansıtmaktadır. Bu sınıflandırma, hastaların tedavi edilmesi ve prognoz açısından daha spesifik yaklaşımların geliştirilmesine yardımcı olabilir. Ancak, tedavi yaklaşımları bireyselleştirilmiş olmalıdır ve her hasta için en uygun olan tedavi planı belirlenmelidir (Mehrgou ve ark., 2016).

1.4. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

1.4.1. Cerrahi Yöntemler

Genişletilmiş veya süper radikal mastektomi: Meme koruyucu cerrahinin uygun olmadığı durumlarda, meme ve koltukaltı lenf bezlerinin büyük bir bölümünün çıkarıldığı bir operasyondur.

Radikal Mastektomi: Meme, koltuk altı lenf bezleri ve göğüs duvarındaki pektoral kasların alındığı bir cerrahi yöntemdir.

Basit Mastektomi: Meme uçları dahil olmak üzere tüm memenin alındığı bir işlemdir. Koltuk altı lenf bezlerine veya kas dokularına müdahale edilmez. Meme kanseri riski yüksek olan bazı kadınlarda her iki meme de alınabilir (double mastektomi) (Fares ve ark., 2020).

1.4.2. Radyoterapi

Radyoterapi, meme kanseri tedavisinde yüksek enerjili ışınların kullanıldığı bir yöntemdir. Meme kanserinin farklı dönemlerinde kullanılabilir ve yerel kontrolü sağlamak amacıyla bu işlem gerçekleştirilmektedir. Ayrıca palyatif tedavide semptomları hafifletmek içinde kullanılmaktadır. Radyoterapinin amacı, hedeflenen alanda homojen bir doz dağılımı sağlamak ve sağlam dokulara minimum doz vermektedir (Maani ve ark., 2022).

1.4.3. Kemoterapi

Kemoterapi, bir veya birden fazla ilacın kullanılarak kanser hücrelerini yok etmek amacıyla uygulanan bir tedavi yöntemidir. Meme kanserinde kemoterapi, tek başına veya hormonoterapi ile kullanılabilir. Hastanın yaşı, tümör boyutu, biyolojik ve patolojik özellikler göz önünde bulundurularak tedavi planı oluşturulur. Kemoterapötik ilaçlar farklı yan etkilere sahip olabilir ve hastaların yaşamında bazı zorluklar yaratabilir.

Bu tedavi yöntemleri, meme kanserinin klinik özelliklerine, yerleşim yerine ve hastanın durumuna göre değişebilmektedir. Tedavi planı, bir multidisipliner yaklaşım ile hastanın doktoruyla durumunu değerlendirmesine ve kişiye özgü bir yaklaşımın belirlenmesine dayanmaktadır (Kurt ve ark., 2018).

1.4.4. Meme Kanseri Tedavilerinin Dezavantajları

1.4.4.1. Kemoterapinin Dezavantajları

Yorgunluk: Kemoterapi tedavisi sırasında ve sonrasında yaygın bir yan etkidir. Hastalar genellikle kendilerini halsiz ve yorgun hissederler.

Saç kaybı: Kemoterapi, hızla bölünen hücreleri hedef aldığı için saç köklerini etkileyebilmektedir. Bu nedenle saç dökülmesi görülebilir. Saçlar tedavi sonrasında genellikle tekrar büyür, ancak bazen kalıcı saç kaybı da oluşabilir.

Cilt sorunları: Kemoterapi cildi etkileyebilir ve kızarıklık, kuruluk, kaşıntı, döküntüler veya hassasiyet gibi sorunlara neden olabilir.

Bağışıklık sistemi zayıflığı: Kemoterapi, bağışıklık sisteminin normal işleyişini etkileyebilir ve enfeksiyonlara karşı direnci azaltabilir. Hastalar enfeksiyonlara karşı daha duyarlı hale gelebilir.

Mide bulantısı ve kusma: Kemoterapi, mide bulantısı ve kusmaya neden olabilir. Bu yan etkiler, kullanılan kemoterapi ilaçlarına, doza ve bireysel farklılıklara bağlı olarak değişebilir.

İştahsızlık ve kilo kaybı: Kemoterapi tedavisi iştahsızlık ve kilo kaybına yol açabilir. Bu, hastaların yeterli besin almasını zorlaştırabilir ve zayıflamaya neden olabilir.

Sindirim sorunları: Kemoterapi bazen ishal, kabızlık, mide ağrısı, gaz veya sindirim sorunlarına neden olabilir.

Ellerde ve ayaklarda şişlik: Bazı kemoterapi ilaçları periferik sinirlerde hasara neden olabilir, bu da ellerde ve ayaklarda şişlik, karıncalanma, uyuşma veya ağrı gibi belirtilere yol açabilir. Bu durum, periferik nöropati olarak adlandırılır.

Kalp sağlığı sorunları: Bazı kemoterapi ilaçları kalp dokusuna zarar verebilir ve kalp problemlerine yol açabilir. Bu nedenle, kemoterapi alan hastalar düzenli olarak kalp fonksiyonları açısından takip edilmelidir.

Konsantrasyon sorunları: Kemoterapi tedavisi, bazı hastalarda konsantrasyon sorunları, hafıza kaybı ve bilişsel işlevlerde azalma gibi nörolojik etkilere neden olabilir.

Ruh hali değişiklikleri: Kemoterapi, bazı hastalarda depresyon, kaygı, irritabilite ve diğer ruh hali değişikliklerine neden olabilir.

Cinsel sorunlar: Kemoterapi, cinsel istekte azalma, kısırlık veya diğer cinsel sorunlara yol açabilir. Bu yan etkiler, tedavinin türüne ve dozuna bağlı olarak değişebilir (Nurgali ve ark., 2018).

Özet olarak, kemoterapi tedavisi birçok yan etkiye ve dezavantaja sahip olabilir. Ancak bu etkiler her hastada farklılık gösterebilir ve çoğu yan etki tedavi sonrasında geri dönebilir. Tedavi sürecinde hastaların sağlık ekibiyle iletişim halinde olmaları ve yan etkileri yönetmek için destek almaları önemlidir (Ramirez *ve ark.*, 2010).

1.4.4.2. Radyoterapinin Dezavantajları

Radyoterapinin meme kanseri tedavisinde kullanılmasının bazı dezavantajları ve yan etkileri şunlar olabilir:

Sağlıklı doku hasarı: Radyoterapinin ana hedefi kanser hücrelerini hedef almak olsa da sağlıklı dokular da radyasyona maruz kalabilir ve zarar görebilir. Radyasyonun normal dokuya yapacağı hasar, tedavi alanının genişliği ve lokalizasyonuna, uygulanan toplam ve günlük doz miktarına ve hastanın yaşına ve genel durumuna bağlı olarak değişebilmektedir.

Akut yan etkiler: Radyoterapinin akut yan etkileri, tedavinin başladığı ilk haftalarda ortaya çıkabilir. Bu yan etkiler arasında ciltte kızarıklık, yanma, kaşıntı, kabarcıklar, göğüs ağrısı, yorgunluk, bulantı ve kusma gibi şikayetler bulunabilir. Bu etkiler genellikle tedavi sonrasında gerilemektedir.

Kronik yan etkiler: Radyoterapinin kronik yan etkileri, tedavi sonrasında aylar veya yıllar içinde ortaya çıkabilmektedir. Kronik yan etkiler arasında; ciltte renk değişiklikleri, kalıcı kıllanma veya kıllarda seyrelme, lenfödem (kol ve elde şişme), göğüs duvarında sertleşme, kalp ve akciğerlerde hasar, kaburgalarda kırılmalar ve ikincil kanser riski gibi etkiler bulunabilir.

Cilt sorunları: Radyoterapi alanında cilt hassaslaşabilir ve kızarabilir. Bunun yanı sıra cilt kuruluğu, kaşıntı, kabarcıklar, yara oluşumu ve enfeksiyon riski gibi sorunlar da görülebilir.

Meme rekonstrüksiyonuna etkisi: Radyoterapi, meme rekonstrüksiyonu yapılacak hastalarda cerrahi sonrası iyileşmeyi etkileyebilir. Radyasyon, implantlar veya dokusal fleplerin başarısını azaltabilir ve cilt dokusunu bozabilir.

Kalp ve akciğer hasarı: Meme kanseri radyoterapisi, kalp ve akciğerlere yakın bölgeleri etkileyebilir ve bu organlarda hasara neden olabilir. Bu nedenle, radyoterapi alan hastaların kalp fonksiyonları düzenli olarak izlenmelidir.

İkincil kanser riski: Radyoterapinin uzun vadede ikincil kanser gelişimine yol açma potansiyeli vardır. Özellikle radyasyon alanında bulunan diğer organlarda kanser riski artabilir.

Radyoterapi tedavisinin yan etkileri, tedavi süreci boyunca dikkatli takip ve yönetim gerektirebilmektedir (Ertem *ve ark.*, 2009; Akdemir *ve ark.*, 2004).

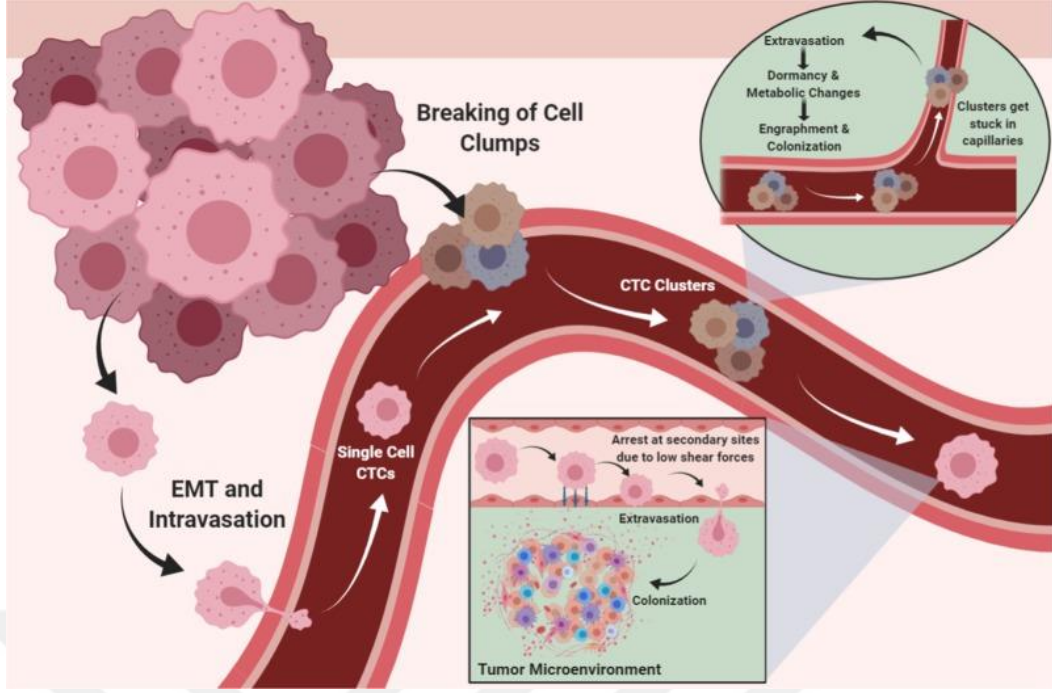
1.5. Metastaz ve İnvazivite

Kanser hücreleri vücutta yayılabilir ve birincil tümörün bulunduğu bölgeden uzak bölgelere metastaz yapabilir. Metastaz, kanser hücrelerinin kan dolaşımı veya lenf sistemi aracılığıyla vücudun farklı bölgelerine yayılması anlamına gelmektedir.

Metastatik tümörler, birincil tümörün kanser hücrelerinin yayılması sonucu oluşan ikincil tümörlerdir.

Metastaz süreci oldukça karmaşıktır ve birçok faktörün etkileşimini gerektirir. Birincil tümör hücreleri, invaziv özellikler kazanarak çevre dokulara sızmaya başlamaktadır. Daha sonra, kan dolaşımı veya lenf sistemi yoluyla vücudun farklı bölgelerine taşınırlar. Ancak, metastaz yapabilme potansiyeline sahip kanser hücrelerinin sayısı oldukça düşüktür.

Metastaz, kanserin ilerlemesi ve tedavi seçeneklerini sınırlaması açısından önemli bir aşamadır. Metastaz yapabilen kanser hücrelerinin erken tespiti ve hedeflenmiş tedavilerle engellenmesi veya durdurulması, kanserin yayılmasını kontrol etmek ve tedavi başarısını artırmak için önemlidir (Alkabban *ve ark.*, 2022).



Şekil 1.4. Kanser hücrelerinin kan dolaşımındaki bir illüstrasyonu. Kanser hücreleri, tek tek veya küme halinde dolaşabilirler. İkincil bölgelere ulaştıktan sonra, dolaşımdaki kanser hücreleri (CTC'ler) bazen kılcal damarların duvarlarına tutunabilir veya sıkışabilir. Daha sonra, bu hücreler dışarı çıkabilir ve yeni bir bölgede kolonileşerek metastatik tümör oluşturabilirler (Fares ve ark., 2020).

Hücreler arasında bulunan etkileşimdeki yapışma potansiyelinin azalması veya kaybolması metastaz sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Birincil tümörden ayrılan kanser hücreleri, hücre-matris etkileşimlerinde değişiklikler yaşarak hareketli bir fenotipe geçmektedirler.

Normal hücreler, çevreleriyle etkileşim halindedir ve çevrelerindeki dokulara bağlanma yeteneğine sahiptirler. Bu bağlanma, hücrelerin bir arada tutulmasını sağlar ve doku yapısının korunmasına katkıda bulunur. Ancak, kanser hücreleri, bu bağlanma yeteneğini kaybedebilir veya azaltabilir.

Metastaz sürecinde, kanser hücreleri birincil tümörden ayrılırken, çevrelerindeki hücre-matris etkileşimlerinde değişiklikler yaşarlar. Bu değişiklikler, hücrelerin bağlantılarını gevşetebilir ve onları hareket etme yeteneği kazandırabilir. Kanser hücreleri, çevrelerindeki matris proteinlerine bağlanma yeteneklerini değiştirerek veya kaybederek, çevrelerinde serbestçe hareket edebilirler. Bu değişiklikler, kanser hücrelerinin dolaşım sistemine girmesini ve vücudun diğer bölgelerine ulaşmasını sağlamaktadır.

Ayrıca, metastaz sürecinde hedef bölgelere yerleşirken de yapışma potansiyellerindeki değişiklikler önemli bir rol oynar. Kanser hücreleri, yeni bölgelere tutunmak ve yeni tümör oluşumunu başlatmak için çevrelerindeki hücrelerle veya matriks proteinleriyle etkileşime geçmelidir. Yapışma yeteneklerindeki değişiklikler, kanser hücrelerinin bu etkileşimleri düzenleyerek veya değiştirerek metastatik tümör oluşumunda yer almaktadır. Bu süreçte, yapışma molekülleri ve hücre yüzey reseptörleri gibi faktörler önemli roller üstlenirler. Bu faktörler, kanser hücrelerinin diğer hücrelere veya matriks proteinlerine bağlanma yeteneklerini belirler. Metastaz sürecindeki yapışma potansiyelinin azalması veya kaybolması, kanser hücrelerinin metastatik bölgelere kolonize olmasını kolaylaştırabilmektedir (Martin *ve ark.*, 2013).

Metastaz süreci hala tam olarak anlaşılammış olsa da yapılan araştırmalar yapışma moleküllerinin ve hücre-matris etkileşimlerinin metastazda önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

1.5.1. Meme Kanserinde Metastaz

Meme kanseri hastalarında metastaz kaynaklı ölümlerin yaygın olması ve özellikle kemik metastazının sık görülmesi gerçekten büyük bir sorundur. Geleneksel tedavilere rağmen, metastatik meme kanseri olan hastaların sağkalım oranları düşüktür. Bu durum, metastatik meme kanserinin moleküler mekanizmalarının sınırlı anlaşılmasından kaynaklanmaktadır.

Meme kanseri hücreleri, yayılma sürecinde en sık olarak kemik yapısını hedef almaktadır. Bununla birlikte, akciğer, karaciğer ve beyin gibi diğer organlara da metastaz yapabilirler. Özellikle ileri evre meme kanserinde, hastaların %70'inde kemik metastazı görülebilir. Kemik metastazı olan hastalar, tümör hücrelerinin mekanik basınç ve inflamatuvar sitokinlerin etkisiyle oluşturduğu şiddetli ağrıdan muzdariptirler. Ayrıca, kemik metastazı, kısıtlı hareketlilik, hiperkalsemi (kalsiyum seviyelerinin yükselmesi), kırıklar, omurilik sıkışması ve kemik iliği rejenerasyon yeteneğinin azalması gibi sorunlara yol açarak hastaların yaşam kalitesini ciddi şekilde etkilemektedir (Fares *ve ark.*, 2020).

Metastatik hücre popülasyonunun alt kümesi, primer tümörde belirli özelliklere sahiptir ve uzak metastaz ve düşük sağkalım oranlarıyla ilişkilidir. Kemik mikro ortamı, diğer bölgelere daha güçlü bağlanma yeteneği ve bağışıklık sistemine daha güçlü direnç gibi belirgin özelliklere sahip olabilir. Bu da tümör hücreleri için en uygun lokalizasyonu sağlamaktadır.

Bu nedenle, metastatik meme kanserinin yönetimi için kemik mikro ortamının ve metastaz mekanizmalarının daha iyi anlaşılması büyük önem taşır. Bu bilgi, daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ve metastatik meme kanseri olan hastaların sağkalım oranlarının artırılmasına yardımcı olabilmektedir (Luo *ve ark.*, 2020).

1.6. Etoposid İlacı ve Etki Mekanizması

DNA topoizomerazları, DNA molekülünde geçici kırılmalar yaparak genetik materyalin topolojik durumunu düzenleyen enzimlerdir. Bu enzimler, çift sarmallı DNA'nın çözülmesi ve geri sarılması, protein hareketi ve DNA'nın yapısının sarılması gibi süreçlerde rol almaktadırlar (Montecucco *ve ark.*, 2015).

DNA topoizomeraz II (TopoII), tip II topoizomerazlar sınıfına aittir ve çift sarmallı DNA kopmalarının üretimini gerçekleştirmektedir. TopoII, iki transesterifikasyon reaksiyonu aracılığıyla topolojik dönüşüm sağlamaktadır. İlk transesterifikasyon reaksiyonu, enzimin aktif bölgesindeki bir tirozin kalıntısı tarafından başlatılmakta ve DNA molekülünün omurgasındaki fosfatla kovalent bir kalıntı oluşturmaktadır. Böylece çift sarmallı DNA'da geçici bir kırılma oluşur. İkinci transesterifikasyon reaksiyonu, DNA kopmasını yeniden mühürlemekte (yeniden ligasyon) ve serbest tirozini yeniden oluşturmaktadır. TopoII'nin üç ana reaksiyonu vardır: DNA gevşemesi, katenasyon/dekatenasyon ve düğümlenme/düğüm çözme. DNA gevşemesi, TopoI enzimlerinde de görülen bir özelliktir ancak katenasyon/dekatenasyon ve düğümlenme/düğüm çözme reaksiyonları TopoII'ye özgüdür (Baldwin *ve ark.*, 2005).

TopoII enzimlerinin işlevi, hücrelerin DNA replikasyonu, transkripsiyon, onarım ve kromatin yeniden düzenlenmesi gibi temel biyolojik süreçlerini düzenlemektedir. TopoII inhibitörleri, kanser tedavisinde kullanılan önemli ilaçlardan biridir. Bu inhibitörler, kanser hücrelerinin DNA replikasyonunu ve bölünmesini engelleyerek tümör büyümesini durdurmayı hedeflemektedirler.

TopoII-DNA kompleksi ve etoposid arasında oluşan üçlü kompleksin incelenmesi, kompleksin stabilizasyonunda önemli olan etkileşim öğelerini ortaya çıkarmıştır. Etoposidin, TopoII-DNA kompleksiyle etkileşime girmesi için enzimin özgül amino asitleriyle bağlantı kurması büyük bir önem arz eder. Bu üçlü kompleksin TopoIIcc'yi teşvik etme ve stabilize etmede aktif rolü bulunmaktadır ve etoposidin tek başına serbest DNA'ya düşük afinite gösterdiği, zayıf bir DNA interkalatörü olduğu fikriyle uyumludur. Ancak, yakın zamandaki çalışmalar, etoposidin kromatine ve histonlara, özellikle H1 histonuna karşı yüksek bir afiniteye sahip olduğunu göstermiştir.

Bu da etoposidin sadece TopoII'yi hedeflemekle kalmayıp, aynı zamanda kromatin yapısını da bir hedef haline getirebileceğini düşündürmektedir (Meresse *ve ark.*, 2004).

Etoposid, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan önemli bir kemoterapötik ajandır. Etoposidin hedefi topoizomeraz II enzimidir. Topoizomeraz II, DNA'nın alt ve üst sarmalını düzenleyen bir enzimdir ve genomdaki düğümleri gidermek için geçici çift sarmallı kırılmalar oluşturmaktadır. Topoizomeraz II'nin kanserin hem tedavi hem de başlangıç aşamasındaki merkezi rolü göz önüne alınmalıdır. Böylece etoposidin ve diğer antikanser ilaçların topoizomeraz II işlevini nasıl değiştirdiği ve DNA sarmal kırılmalarına nasıl yol açtığı daha iyi anlaşılabilir. Bu anlayış, kanser tedavisi ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde yardımcı olabilir.

Etoposid, testis kanseri ve lenfoma gibi bazı kanser tedavisinde kullanılan bir antitümör ajandır. 1971'den beri kullanılan bu ilaç, güçlü antineoplastik özellikleri nedeniyle kimya ve biyoloji alanlarında yoğun bir şekilde çalışılmıştır (Montecucco *ve ark.*, 2015; Baldwin *ve diğ.*, 2005).

1.7. Vinkristin İlacı ve Etki Mekanizması

Vinblastine, aslında vinka alkaloidleri olarak bilinen bir ilaç grubuna aittir. Vinkristin ise vinka alkaloidlerinden bir başkasıdır. Vinkristin, vindolin ve katerantin adı verilen iki çoklu halkadan oluşmaktadır. Vinka domeni olarak adlandırılan yapı, GTP bağlanma bölgesinin yanındaki bir bölgede β -tübülin ile etkileşime girmektedir. Vinkristin, hücrelerde kromozomları hareket ettirme ve hizalama mekanizmasını devre dışı bırakan mikrotübüllerin oluşumunu engellemektedir. Ayrıca kardeş kromatit değişimi, kromozom sapmaları ve tek sarmallı DNA'ya olanak veren DNA yapısına zarar vermekte ve DNA, RNA, akabinde protein sentezine müdahale edebilmektedir. Bunun yanı sıra aksonal dejenerasyon görülen sinir uyarılabilirliğinin artmasına neden olan bir moleküldür (Mohammadgholi *ve ark.*, 2013).

Vinkristin, mikrotübül polimerizasyonuna müdahale ederek hücreleri durdurup çoğalmasını bloke etmektedir. Mikrotübüller, hücre yapıları sırasında önemli bir rol oynayan protein yapılarıdır. Vinkristin, mikrotübül hücrelerini inhibe ederek hücrelerin mitotik aktivitesini engellemektedir.

Antikanser ilaçlarının çoğunluğuna bakıldığında, biyolojik etkilerini nükleik asit ve protein bağlarına bağlanarak göstermektedirler. Vinkristin ilacı, güçlü bir topoizomeraz II inhibitörü olarak literatürde yer edinmiştir. DNA'nın yapısıyla doğrudan etkileşime girmektedir. Vinkristin'in mitotik iğ yapısını bloke etmesiyle beraber, p53 aktivasyonundan bağımsız olarak hücreler apoptoza yönelmektedir. Bunun yanı sıra akson taşınmasının inhibisyonu, sekresyon süreçleri, trombosit fonksiyonlarının bozulması gibi mikrotübülleri içeren diğer tüm süreçlerde de vinkristin ilacının etkileri görülmektedir. Bu nedenle vinkristin, antitümör aktivitesini tübülünlerin polimerizasyonunu engelleyerek göstermektedir (Skubnik ve ark., 2022; Zhou ve ark., 2019; Below ve ark., 2022).

1.8. VEGF-A Geni ve Etki Mekanizması

Vasküler endotel büyüme faktör A (*VEGF-A*), hücrelerin çoğalmasını, büyümesini ve yeni kan damarlarının davranışlarını (anjiyogenez) teşvik eden bir protein olan damar endotel büyüme faktör (*VEGF*) ailesinin bir üyesidir. *VEGF-A*, kan damarlarındaki endotel hücrelerine bağlanır ve genellikle endotel hücreleri tarafından salgılanır.

VEGF-A, sekiz ekzon ve yedi intron içermektedir. Ekzonlar, proteinin yapısı ve işlevi için kodlanan bölümlerdir ve intronlar aralarda bulunan işlevi henüz tanımlanmamış kılavuzlardır (Brogowska ve ark., 2023).

VEGF-A'nın farklı izoformları, alternatif ekleme adı verilen bir süreçle meydana gelir. Bu süreçte, aynı genden farklı protein ürünleri elde edilir. *VEGF-A*'nın izoformları:

VEGF121: Ekson 6 ve 7'den yoksun olan en küçük izoformdur.

VEGF145: Ekson 6'dan yoksun ve ekson 7'nin bir kısmını içeren izoformdur.

VEGF148: Ekson 6'dan yoksun ve ekson 7'nin tamamını içeren izoformdur.

VEGF162: Ekson 6'yı içerir ve ekson 7'nin bir kısmından yoksundur.

VEGF165: Ekson 6'yı içerir ve heparin yuvasını içinde ekson 7'ye sahiptir. Ayrıca *VEGF-A*'nın en baskın izoformudur.

VEGF165b: Ekson 6'dan türetilir ve *VEGF165* ile benzer büyümeye sahip olmasına rağmen, farklı biyolojik etkilere sahip bir izoformdur.

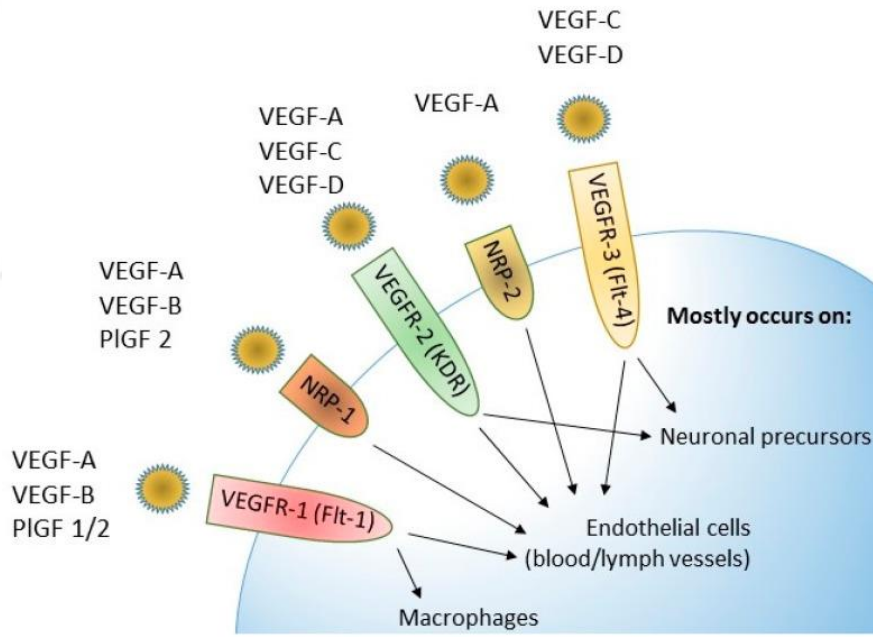
VEGF183: Ekson 6'yı içerir ve *VEGF-A*'nın daha uzun izoformlarından biridir.

VEGF189: Ekson 6 ve 7'yi içerir ve heparin yuvasını içinde barındıran güçlü bir izoformdur.

VEGF206: Ekson 6, 7 ve 8'i içerir ve *VEGF-A*'nın en uzun izoformudur.

Bu izoformların her biri, anjiyogenez sürecinde önemli bir rol oynamaktadır ancak farklı uzunluklar ve yapılaraya sahip olduklarından farklı bir karmaşık süreci de başlatmaktadırlar. Örneğin, *VEGF165*, ekson 6'dan yoksun olan *VEGF-A*'nın en baskın izoformu olup, endotelial sistemlere bağlanabilme yeteneği sayesinde performansı daha yüksektir. Diğer izoformlar ise farklı heparin bağlantı yeteneklerine sahiptir ve farklı alıcılara etkileşim hızları bulunmaktadır.

VEGF-A, özellikle endotel hücreleri tarafından salgılanır. Bu protein, doku rejenerasyonu ve normal hücre gelişimi gibi faktörlerde önemli bir rol oynar. Ayrıca, *VEGF-A*'nın aşırı üretimi veya regülasyonu, kanser gibi hastalıkların patolojik anjiyogenezin oluşmasına katkıda bulunabilir. Bu nedenle, *VEGF-A* ve izoformlarının hedeflenmesi, tedavi ve ilaç geliştirme alanında önem arz etmektedir (Melincovici ve ark., 2018).



Şekil 1.5. *VEGF* ailesindeki reseptör ve ligand ilişkisi arasındaki bağların şematik gösterimi (Brogowska ve ark., 2023).

Vasküler endotel faktör büyüme A (*VEGF-A*), çeşitli faaliyetler üzerindeki etkileri olan önemli bir büyüme faktörüdür. *VEGF-A*, endotel ürününde bulunan *VEGFR-1* (*VEGFR-1/Flt-1*) ve *VEGFR-2* (*VEGFR-2/KDR*) alıcılara bağlanarak etki göstermektedir (Ramakrishnan ve ark., 2014).

VEGF-A'nın aktif halde gösterdiği etkiler aşağıdaki gibidir;

Endotel Hücre Çoğalma ve Migrasyonu: *VEGF-A*, endotel çoğalmasını ve hareket etmelerini teşvik eder. Bu, yeni kan damarlarının oluşması ve mevcut damarların beslenmesi için önemlidir.

Vasküler Geçirgenlik: *VEGF-A*, kan damarlarında bulunan sıvı ve hücrelerin geçişine izin verir. Bu, doku rejenerasyonu ve inflamasyon sürecinde rol oynayabilir.

Enflamatuar Hücre Aktivasyonu: *VEGF-A*, makrofajlar ve granülositler gibi enflamatuar hücreleri aktif hale getirerek inflamasyon etkilerini etkiler.

Rejeneratif Kapasite: *VEGF-A*, bazı iç organların rejenerasyon sürecinde rol oynayabilir, boşaltma, genişletme ve kapsamlı rejenerasyonunda etkili olabilir.

Nöral Progenitör Hücreler: *VEGF-A*, nöral progenitör hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için önemli bir rol oynar ve sinaptik olarak bu yapıları düzenleyebilir.

Podositler ve Retinal Pigment Epitel (RPE) Hücreleri: *VEGF-A*, koruyucu ve göz dokularında podositler ve RPE hücreleri tarafından üretilir ve bu dokuların sağlığının ve işlevlerinin korunmasında rol oynar.

Yağ Asidi Regülasyonu: *VEGF-A*, yağ asitlerinin alımı ve tedavisinde etkili olan endotelyumdaki yağ asitlerini bağlayıcı proteini (FABP4) düzenleyerek yağ metabolizmasında da rol oynar.

VEGF-A, bu çeşitli etkileriyle önemli bir rol oynar ve sağlıklı doku ve organların etkilerinin korunması, rejenerasyonu sürecine katkıda bulunur. Ancak genin dengesiz ifade edilmesi, *VEGF-A* regülasyonunu etkileyerek patogenezlere rol üstlenmesini sağlayabilir. *VEGF-A*'nın aşırı ifade edilmemesi bu yüzden büyük bir önem arz etmektedir (Matsumoto *ve ark.*, 2014).

1.9. MMP-2 Geni ve Etki Mekanizması

Matris metaloproteinaz (*MMP*) ailesi, hücre dışı matrisin parçalanmasında rol oynayan proteinleri içermektedir. Bu proteinler, normal fizyolojik süreçlerde, örneğin embriyonik gelişim, üreme ve doku yeniden şekillenmesi gibi olaylarda yer alırken, aynı zamanda artrit, kanser metastazı gibi hastalıklarda da önemli roller üstlenirler. *MMP*'ler genellikle inaktif proprotein formunda salgılanır ve hücre dışı proteinazlar tarafından aktive edildiklerinde etkin hale gelirler. Bu aktivasyon genellikle hücre dışında gerçekleşir. *MMP-2* geni ise tip IV kollajenin ana yapısal bileşeni olan bir enzimi kodlar. *MMP-2* enzimi, endometriyal parçalanmasında, vaskülarizasyonun düzenlenmesinde ve enflamatuar yanıtta rol oynar.

Ayrıca, bazal membranın bozulmasında ve metastaz sürecinde de önemli bir rol oynayabilir. Böylece, *MMP-2*'nin normal fizyolojik süreçlerin yanı sıra bazı hastalıkların gelişiminde de etkili olduğu düşünülmektedir (Weekly ve ark., 2023).

MMP-2'nin kısıtlamaları, proteolitik işlemleri içerir. Aktivasyon süreci genellikle hücrelerde meydana gelir ve bir dizi faktör etkileşimini gerektirir. Aktivasyon, hücre yapısında *MT1-MMP* (*MMP-14*) ile *pro-MMP-2*'nin (inaktif form) kompleksini oluşturmaktadır. Bu kompleks, *pro-MMP-2*'nin hücre dışına taşınmasını sağlar. Daha sonra, aktif bir *MT1-MMP* ayrılmasına dayalı oto-katalitik bir bölünme işlemi gerçekleşir. *MT1-MMP*, *pro-MMP-2*'yi aktif eder.

Bütünleşik zincirlerinin kümelenmesi, *MMP-2*'nin kısıtlamalarını teşvik eden bir faktördür. Bütünleştiriciler, ağlar arası bağlantılardan sorumlu olan proteinlerdir ve *MMP-2*'nin yapılarında önemli bir rol oynarlar. Ayrıca, *MMP-2*'yi aktif hale getirmek için bir diğer faktör de hücre-hücre kümelenmesidir. Hücrelerin bir araya gelmesi, *MMP-2*'nin ifade edilebilecekleri bir ortam yaratır. Bunların yanı sıra, bir diğer olması gereken faktör de bir lökosit adezyon bölümü olan ALCAM'dır. ALCAM, *MMP-2*'nin kısıtlamalarını teşvik eden ve düzenlemesinde rol oynayan bir faktördür. Bu unsurların bir araya gelmesi, *MMP-2*'nin doğru şekilde aktif olarak muhafaza edilmesini ve hücre dışı matrisin parçalanmasını sağlamaktadır (Feng ve ark., 2022).

Matris metaloproteinazlar (*MMP*'ler), tümör istilasında, metastazda ve yeni kan damarlarının oluşumunda yönetilen önemli enzimlerdir. *MMP*'ler, hücre dışı matrisi (ECM) ve bazal membranı bozarak tümörlerin kontrollerini ve sonuçlarını hızlandırır. Matris metaloprotein-2 (*MMP-2*) hücre dışı matrisi parçalayan ana enzimlerdir. Bu enzimler, tümör oluşumlarının çevre dokulara yayılmasına teşvik edebilir ve tümörlerin ilerlemesine yol açabilir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

PARPi (Poli (ADP-riboz) polimeraz inhibitörleri), *BRCA* mutasyonu taşıyan tümör hücrelerinde DNA hasar tepkisini (DDR) hedefleyerek seçici bir şekilde öldürebilen potansiyel tedavi seçeneklerinden biridir. Zhang ve ark., 2017 yılında etoposid ilacının farklı meme kanseri tipleri üzerindeki *BRCA1* ekspresyonunu araştırmıştır. DNA hasarına yanıt olarak regüle edilen *BRCA1*'in, etoposid gibi DNA hasar ajanlarına yanıt verdiği ve bu yanıtın sitoplazmik *BRCA1* protein seviyesinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, sitoplazmik *BRCA1* protein seviyesinin değerlendirilmesi, meme kanseri alt tiplerini daha iyi ayırt etme ve tedavi yanıtını bulma potansiyeline olanak sağlamaktadır (Zhang ve ark., 2017).

Ancak, bu çalışmanın sonuçları daha fazla doğrulama ve genişletme gerektirmektedir. Daha büyük bir hasta kohortunda, *BRCA1* protein seviyeleri ile meme kanseri alt tipleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, sitoplazmik *BRCA1* protein seviyelerinin klinik uygulanabilirliğini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Zhang ve diğ., 2017).

Yu ve arkadaşlarının 2023 yılında yayınladığı çalışmada, etoposid ilacının Daam1 proteini ile etkileşimine bakmışlardır. Etoposid'in küçük hücreli karaciğer kanser (H446) hücreleri ve meme kanseri (MCF-7) hücreleri üzerindeki Daam1 proteinini eksprese eden geninin üzerinde apoptotik bir etki sağladığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, 270 µmol/L dozunda etoposidin, H446 ve MCF-7 hücrelerinin çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu büyük ölçüde engellediği bulunmuştur (Yu ve ark., 2023).

Skubnik ve arkadaşlarının 2021 yılında yayınladığı araştırmada, vinkristin ilacıyla birleştirilmiş bir diğer modern yaklaşım, kansere yatkın antikörlerin kullanılması olmuştur. Lösemili çocukların organlarında, vinkristin sayesinde sağlıklı hücrelerin yeniden üretimi eski düzeyine çıkmıştır (Skubnik ve ark., 2021).

Sonuç olarak, vinkristin temelli ilaç tedavileri, kanser tedavisinde önemli bir yer edinmektedir. İlacın yan etkilerine rağmen, vinkristin ilacının yerini alacak daha etkili bir ilaç halen bulunamamıştır (Skubnik ve ark., 2021).

Thomas ve arkadaşlarının 1994 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada, vinkristin ve etoposidin sinerjik etkisi metastatik meme kanseri olan belirli bir grup hastada denenmiştir. Faz II aşamasına kadar gelen bu süreçte daha öncesinde *in vitro* bir çalışma yapılmamış; ilaç kombinasyonu hastalara uygulanmıştır (Thomas ve ark., 1994).

Deneye toplam 18 metastatik meme kanseri hastası dahil edilmiştir. Bu hastaların geçmiş profillerine bakıldığında, 14'ü adjuvana sahiptir ve 8'i ilerlemiş metastatik etkiye sahiptir.

Değerlendirme UICC (Uluslararası Kansere Karşı Birlik) kriterlerine göre yapılarak; yanıt değerlendirme sonucu, bir hastada tam yanıt (CR) (%6-%48 güven aralığı) ve üç hastada ise genel yanıt (PR) olarak elde edilmiştir.

Tedavinin başarısızlığına kadar geçen süre 3,5 ay olmuş ve çalışmanın başlamasından itibaren sağkalım 8,3 ay olarak bulunmuştur. Başlıca ilaç kombinasyonun yan etkisi miyelosupresyon (kemik iliği baskısı) olarak raporlanmıştır. Dokuz hastada (%50), beyaz kan hücreleri (WBC) toplamı 1.000/mm³'nin altına düşmüştür. Beş hastada (%28) 3.derece ateş ve kusma nöbetleri gözlemlenmiştir. Vinkristin ve etoposid ilaç kombinasyonun metastatik meme aktivasyonunda etkili olabileceğini göstermesine rağmen, çalışma tedavinin etki profili de dikkate alınarak Faz II'de durdurulmuştur. Bunun sebebi, hastalarda oldukça sık görülen yan etkilerin oluşmasından kaynaklanmıştır (Thomas ve ark., 1994).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Tezde Kullanılan Hücre Hatları

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Laboratuvarından MDA-MB-231 hücre hattı temin edilmiş ve MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı geliştirilmiştir.

3.1.2. Laboratuvarda Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Tablo 3.1. Çalışmalarda kullanılmış olan kimyasallar ve kitlerin bir tablosu.

Kullanım Amacı	Kimyasallar, Kitler	Ürün Firma Adı
Hücrelerin Büyütülmesi ve Geliştirilmesi	RPMI-1640 Medium	Biological Industries, İsrail
	Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biological Industries, İsrail
	Fetal Bovin Serum (FBS)	Biological Industries, İsrail
	Gentamisin	Biological Industries, İsrail
	Trypsin-EDTA	Biological Industries, İsrail
	Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Amresco®, ABD
Ticari Satın Alınan Kitler	Memeli Hücresi RNA İzolasyon Kiti	GeneAll®, Kore
		ABC®, Kore
	cDNA Sentez Kiti	
Çalışmada Kullanılan İlaçlar	Etoposid	Koçak Farma, Türkiye
	Vinkristine	Koçak Farma, Türkiye
Hücre Sayımı	Trypan Mavisi	ThermoFisher, Türkiye
İnvazyon Tahlili	Gieamsa	Merck, Türkiye
	Formaldehit	
	Metanol	

3.1.3. Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.2. Laboratuvarında kullanılan cihazların listesi.

Kullanım Amacı	Cihazlar	Ürün Firma Adı
Hücrel Çalışma İçin Kullanılanlar	CO ₂ İnkübatör	Nüve EC 160, Türkiye
	Laminar Akımlı Kabin	Nüve MN 090, Türkiye
	İnverted Mikroskop	BAB, Türkiye
	Mikroskop Kamerası	Leica, Almanya
Moleküler Çalışma İçin Kullanılanlar	Stereo Mikroskop	Leica, Almanya
	PCR Cihazı	Thermo Hybaid, ABD
	Vorteks	IKA® Vortex, ABD
	Mini Santrifüj Cihazı	Nüve NF 024, Türkiye
	Santrifüj Cihazı	Nüve NF 400, Türkiye
Nanodrop Cihazı	Mecasys Obtizen NanoQ, Kore	
Malzeme Depolanması İçin Kullanılanlar	Buzdolabı (+4 °C)	Vestel, Türkiye
	Buzdolabı (-20 °C)	Vestel, Türkiye
	Derin Dondurucu (-80 °C)	ARCTIKO, Danimarka
Diğer Cihazlar	Masa Üstü Bilgisayar	Hewlett Packard (Hp), ABD
	Dizüstü Bilgisayar	Hewlett Packard (Hp), ABD

3.2. Metot

3.2.1 Hücre Kültürü

3.2.1.1. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarının İki Boyutlu Geliştirilmesi

MDA-MB-231 ve MDA-MB-231/Sisplatin dirençli meme kanseri hücre hatları % 10 (v/v) Fetal Bovin Serum ve % 1 (v/v) Gentamisin antibiyotiği eklenerek hazırlanmış % 88 (v/v) RPMI-1640 besiyerinde 37 °C'de % 5 karbondioksit optimizasyonunda bulunan inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücreler büyütülürken 75 cm²'lik flasklarda üretilmiştir. 500mL satın alınan mediumun içerisine 50mL FBS ve 1mL gentamisin antibiyotik eklenmiş ve kullanıma hazır hale getirilmiştir. Daha sonrasında 75 cm²'lik flaskların içerisinde total olarak 12mL medium eklenerek hücrelerin gelişmeleri sağlanmıştır. Kullanılan hücre hatlarına ait flask yüzeylerinin % 80'i hücreler tarafından kaplandığı takdirde hücreler tripsin-EDTA kullanılarak pasajlanmış; pasajlanma ihtiyacı duyulmadığı ancak ölü hücreler bulunduğu süreç içerisinde PBS ile yıkanarak mediumu değiştirilmiştir.

3.2.1.2.MDA-MB-231 Hücre Hattına Sisplatin Direncin Kazandırılması

MDA-MB-231 hücre hattının büyütülmesinin ardından cisplatin ilacı belirli dozlarda belirli sürelerde verilerek hücre hattının direnç kazanması sağlanmıştır. Cisplatin ilacının ana stok dozuna bağlı olarak ara stok dozları hesaplanmış ve yaklaşık birkaç aylık bir süreçte hücrelerin direnç kazanması sağlanmıştır. Bu süreçte istenilen μM 'a gelindikten sonra hücreler üzerinde tez içerisinde yapılacak olan çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Cisplatin'in hazırlandığı ara stoklar aşağıdaki gibidir. Bu dozlar farklı μL seviyelerinde hücrelerin durumuna göre flask içerisine ilave edilmiştir.

Cisplatin Ara Stok Doz Hesaplaması:

$$1660\mu\text{M}.x=250\mu\text{M}.2000\mu\text{L}$$

$$= 301,2 \text{ Cisplatin} + 1698,8 \text{ RPMI 1640 medium}$$

$$1660\mu\text{M}.x=500\mu\text{M}.2000\mu\text{L}$$

$$= 602,4 \text{ Cisplatin} + 1397,4 \text{ RPMI 1640 medium}$$

$$1660\mu\text{M}.x=1000\mu\text{M}.2000\mu\text{L}$$

$$= 1204,8 \text{ Cisplatin} + 794,2 \text{ RPMI 1640 medium}$$

NOT: Cisplatin ilacının satın alındığı firmanın belirttiği ana stok dozu 1660µM'dır. Bu ana stok birimine göre ara stoklar hazırlanmış ve 333µM direnç kazandırılarak tez çalışmasında kullanılmıştır.

3.2.1.3.Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler yeterince büyüüp geliştiğinde üst üste çıkma eğilimine sahiptirler. Birbirleri üzerine çıkmaları altta kalan hücrelerin ölmesini sağlayacağı ve çalışmada bu istenmediği; tam tersine hücrelerin yaşayarak gerekli deneylerde kullanılması gerektiği için pasajlanması şarttır. Kontakt inhibisyonu adıyla literatürde yer alan bu ölüme dayalı mekanizmayı engellemek için hücrelerin yüzey alanından substrat ile ayrılması gerekmektedir. Kanser hücreleri yüzeye yapışmak için ekstraselüller matris adı verilen bir enzim salgılar ve bu sayede flaskların yüzeyine tutunurlar. Bu enzim yapısının parçalanması hücrelerin tutundukları yüzeyden kalkmalarını sağlayacaktır. Hücre kültürü bulunduğu flaskın yüzey alanını büyük ölçüde kapladıklarında, laminar akış kabini içerisinde tripsinizasyon işlemi adını verdiğimiz bir tepkime ile kaldırılır (Kwist ve ark., 2016).

Karbondioksit içeren inkübatörde steril bir şekilde bulunan flask içindeki hücreler ilk başta mikroskopta incelendi. İncelendiğinde yüzeyinin %80'lik bir kısmı kaplandığı belirlenerek flask içinde bulunan ve "kirli medium" olarak adlandırdığımız içindeki 12mL'lik medium çekiler sıvı atık kutusuna atıldı. Ardından flaskın içerisinde otoklavlanmış steril PBS tamponu 4mL olacak şekilde serolojik pipet yardımıyla aktarıldı ve ölü hücreler (flask yüzeyinde yapışık değillerdir) arındırıldı. Flaskın kapağı kapalı olacak şekilde oldukça yavaş bir şekilde sallanarak hücreler PBS ile muamele edilip, ardından PBS tamamen flaskın içinden çekilerek sıvı atık kutusuna boşaltıldı. Ölü hücrelerden arındırılan flask tripsin-EDTA ile muamele görmeye hazırlandı. Hücrelerin ekstraselüler yapılarının parçalanıp kalkması için tripsin-EDTA 75cm²'lik flaskın içerisine 2mL kadar eklendi. Bu işlemin ardından 37°C'de yaklaşık olarak 2 ile 5 dakika arasında inkübatöre konulara inkübe edilmesi sağlandı. Bu süreç zarfında hücreler yapıştıkları yüzeyden kalktılar. Tripsin-EDTA'nın toksik etkilerini azaltmak adına flask inkübatörden alındıktan sonra üzerine RPMI 1640 mediumu 4mL kadar ilave edildi ve hücrelerin belirli bir miktarı çalışmalarda kullanılmak için hücre sayımı yapılmak üzere 15mL'lik falkona aktarıldı. Yine başka deneylerde kullanılacak olan flask içerisine toplam konsantrasyonu 12mL'ye denk gelecek şekilde RPMI 1640 mediumu ilave edildi.

3.2.1.4. Etoposid ve Vinkristine İlaçlarının Ana ve Ara Stok Dozlarının Hesaplanması

- Etoposid Ana Stok Hesaplama İşlemi

0,1 gram

$$\frac{588.6 \text{ mol}}{0,005 \text{ Litre}} = 0,03397 = 33.978\mu\text{M}$$

0,005 Litre

- Etoposid Ara Stok Hesaplama İşlemi

$$33\,978 \cdot x = 10\mu\text{M} \cdot 1000\mu\text{L} =$$

0,29 μL ilaç + 999,71 μL medium (100 μL hücre + 899,71 μL boş medium)

$$33\,978 \cdot x = 5\mu\text{M} \cdot 1000\mu\text{L} =$$

0,145 μL ilaç + 999,855 μL medium (100 μL hücre + 899,855 μL boş medium)

- Vinkristin Ana Stok Hesaplama İşlemi

0,001 gram

$$\frac{824,958 \text{ mol}}{0,001 \text{ Litre}} = 0,0012122 = 1212,2\mu\text{M}$$

0,001 Litre

- Vinkristine Ara Stok Hesaplama İşlemi

$$1212 \cdot x = 100\mu\text{M} \cdot 1000\mu\text{L} =$$

82,5 μL ilaç + 817,5 μL medium (100 μL hücre + 717,5 μL boş medium)

$$1212 \cdot x = 50\mu\text{M} \cdot 1000\mu\text{L} =$$

41,25 μL ilaç + 858,75 μL medium (100 μL hücre + 758,75 μL boş medium)

- Etoposid ve Vinkristin Ara Stok Kombinasyonlarının Üç Boyutlu Deney İçin Hesaplanması İşlemi

Vinkristine 50µM ve Etoposid 5µM (Total Konsantrasyon 1000µL) için;

$$1212 \cdot x = 400\mu\text{M} \cdot 500\mu\text{L} = 33.978 \cdot x = 40\mu\text{M} \cdot 500\mu\text{L}$$

165µL vincristine + 335µL medium ve 0,6µL etoposid + 499,4 medium

Vinkristine 50µM ve Etoposid 10µM (Total Konsantrasyon 1000µL) için;

$$1212 \cdot x = 400\mu\text{M} \cdot 500\mu\text{L} = 33.978 \cdot x = 80\mu\text{M} \cdot 500\mu\text{L}$$

165µL vincristine + 335µL medium ve 1,2µL etoposid + 498,8 medium

Vinkristine 100µM ve Etoposid 5µM (Total Konsantrasyon 1000µL) için;

$$1212 \cdot x = 800\mu\text{M} \cdot 500\mu\text{L} = 33.978 \cdot x = 40\mu\text{M} \cdot 500\mu\text{L}$$

330µL vincristine + 170µL medium ve 0,6µL etoposid + 499,4 medium

Vinkristine 100µM ve Etoposid 10µM (Total Konsantrasyon 1000µL) için;

$$1212 \cdot x = 800\mu\text{M} \cdot 500\mu\text{L} = 33.978 \cdot x = 80\mu\text{M} \cdot 500\mu\text{L}$$

330µL vincristine + 170µL medium ve 1,2µL etoposid + 498,8 medium

NOT: Hücre hatları pasajlandıktan sonra hücre sayımı yapılmıştır. Bunun akabinde üç boyutlu hücrelerin geliştirilmesinin ardından yukarıda belirtilen dozlar total konsantrasyonları 1000µL'ye eşdeğer gelecek şekilde karışım olarak hazırlanmıştır. Bunun yanı sıra her iki ilaç kendi dozlarında da hesaplanarak ara stokları oluşturulmuştur.

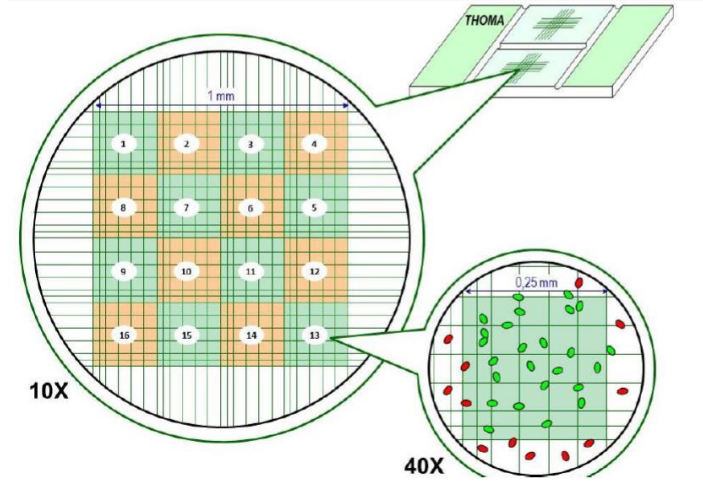
3.2.2. Trypan Mavisi ile Hücre Sayımı

Trypan mavisi boyası ile hücre sayımının gerçekleşmesi kromoforun negatif yüklü olmasına bundan ötürü de membran hasar görmediği sürece hücre ile etkileşime girmemesine bağlı olan bir tepkimedir. Hücrelerin ölü olması durumunda mavi renkte gözükmeleri gerekirken; ölü olmayan hücrelerin trypan boyası ile boyanmamış olması gerekir (W. Strober, 2015).

Pasajlanmış ve falkon ya da ependorf içersine alınmış hücreler, trypan mavisi solüsyonuyla 10:1 oranı kullanılarak karıştırılır. Boya ışığa hassas durumda olduğundan oranına göre 250 µL hücre solüsyonu, 25 µL trypan mavisi solüsyonu ile karıştırılıp bir mühlet alüminyum folyo sarılmış bir şekilde bekletilir. Ardından Thoma lamı üzerine konularak hücreler mikroskopta incelenir ver sayımı yapılır.

$$1 \text{ mL 'deki Hücre Sayısı} = \text{Karelerdeki Hücre Sayısı} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 4 \times 10^6$$

[Denklem 3.1.]



Şekil 3.1. Thoma lamından hücre sayımının şematik gösterimi (Freshney, 1987).

3.2.3. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarında Sitotoksosite Analizi

Etoposid ve vinkristine ilaçlarının ayrı ayrı ve kombinasyon halinde belirli dozlarda her iki hücre hattında da sitotoksosite analizi gerçekleştirilmiştir.

12 kuyucuğa sahip platalere her iki hücre hattından hücre sayımı yapılmış hücreler total konsantrasyonu temiz medium ile 1000µL olacak şekilde eklenmiştir ve 37°C'de %5'lik karbondioksitli inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücrelerin bir gece inkübe edilmesinin ardından kuyucukların %80'inini kapladığı mikroskop yardımıyla belirlenerek hücrelere literatürde yapılan çalışmalara dayanarak hazırlanan belirli ara stok dozlardaki ilaçlar ayrı ayrı ve kombinasyon halinde verilmiştir. İnkübasyona bırakılan hücreler 24,48 ve 72.saat olmak üzere mikroskopta fotoğrafları çekerek gözlemlenmiş ve dozların hücreler üzerindeki metastatik, sitotoksik ve morfolojik proliferasyonu incelenmiştir. Aşağıda hazırlanmış tabloda kuyucuklara verilen ilaçlar ve dozları bulunmaktadır (Riss ve ark., 2019).

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan ilaçlar, ana ve ara stok dozları ve kullanılma miktarlarının gösterimi.

İlaç	Ana Stok Hesaplaması	Kullanılan Ara Stoj Dozu (µM)	Kullanılan İlaç Miktarı (µL)	Kullanılan Medium Miktarı (µL)
Etoposid	0,1 gram	5	0,14	999,855
	$\frac{588.6 \text{ mol}}{0,005 \text{ Litre}} = 0,03397 = 33.978\mu\text{M}$	10	0,29	999,71
Vinkristin	0,001 gram	50	41,25	858,75
	$\frac{824,958 \text{ mol}}{0,001 \text{ Litre}} = 0,0012122 = 1212,2\mu\text{M}$	100	82,5	817,5

3.2.4. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarında Motilite Analizi (ing. *Migrasyon Assay*)

Tezde kullanılan iki hücre hattı içinde metastaz kabiliyetinin ilaçlarla etkileşimini incelemek adına hücre göç analizi yapılmıştır. Öncelikle ara stok dozları hesaplanmış ve hesaplanan dozlarla doz belirleme deneyi gerçekleştirilmiştir. Daha sonrasında belirlenen dozlarla kontrol grubu dahil olmak üzere 12 kuyucuklu bir plaka içerisine her kuyucuğa total olarak 2×10^5 hücre ilâve edilmiştir. İlaçlar total konsantrasyon $1000\mu\text{L}$ 'ye denk gelecek şekilde dilüe edilip ara stoklar hazırlandığından; her kuyucuktaki toplam konsantrasyon $1000\mu\text{L}$ 'ye denk gelmektedir. Bir gece boyunca 37°C 'de %5'lik karbondioksit içeren inkübatörde hücreler inkübe edildikten sonra kuyucukların yüzeyi tamamen kaplandığı gözlemlenmiştir. Böylece $10\mu\text{L}$ 'lik pipet ucu yardımıyla, dikkatli ve hızlı bir şekilde tam orta üstten orta aşağıya kadar dikey bir yara açılmıştır. Bunun ardından ilaçlar belirlenen dozlarda belirlenen kuyucuklara verilmiş ve 24,48,72.saat fotoğrafları çekerek metastatik etkileri mikroskopta gözlemlenmiştir (Wells ve ark., 2013).

3.2.5. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarında İnvazyon Tahlili

Her iki hücre hattında daha iyi morfolojilerini ve nükleus yapılarını görmek adına giemsa boyama deneyi gerçekleştirilmiştir. Flasklarda büyütülen hücreler pasajlanıp ardından ependorflarda toplanmıştır. Bunun ardından hücre sayımı yapılmış ve hücreler 24'lü kuyucuklara ekilmiştir. Ekilen hücrelerin toplam konsantrasyonu temiz medium ve hücre bileşimi olarak her bir kuyucukta 1000µL'dir. Hücre ekimi işleminin gerçekleştirilmesiyle 37°C'de %5'lik karbondioksit içeren inkübatörde bir gece boyunca inkübe edilmesinin ardından kuyucuklar %80'lik bir şekilde yüzeyi kaplamıştır. Ertesi gün yüzeyi %80 hücreyle kaplı olan kuyucuklara belirlenen dozlarda ayrı ayrı ve kombinasyon halinde ilaçlar verilmiş ve tekrar inkübe edilmek üzere inkübatöre yerleştirilmiştir. İlaç verildikten 24 saat itibarıyla ilk 8 kuyucuk için boyama işlemine geçilmiştir.

İlk öncelikle "kirli medium" olarak adlandırdığımız kuyucukların içerisinde bulunan mediumlar hücrelere herhangi bir şekilde zarar vermeden alınmış ve sıvı atığa aktarılmıştır. Her bir kuyucuğa 250µL olacak şekilde formaldehit eklenmiş ve 2dk boyunca hücreler bu kimyasal ile muamele edilmiştir. Ardından formaldehit otomatik pipet yardımıyla çekilerek sıvı atığa atılmıştır. İki kez kuyucuklar PBS ile yıkamıştır. Yıkama işlemi bitince iyice PBS kuyucuklardan arındırılmış ve 500µL metil alkol eklenerek 20 dakika kadar hücreler muamele edilmiştir. Bu işlemle beraber formaldehit ile tabana yapışmış olan hücrelerin hücre zarının geçirgen bir yapıya sahip olması sağlanmıştır. Metil alkolün kuyucuklardan çekilmesi ve tekrar iki kez PBS ile kuyucukların yıkanmasıyla 250µL giemsa boya her bir kuyucuğa ilave edilmiştir. Bu aşamada steril kabinin ışığı kapatılır çünkü giemsa boyanın ışığa hassasiyeti mevcuttur. Boya eklenen plate, üzeri alüminyum folyo ile kaplanarak 20 dakika muamele edilmiştir. Boya 20 dakika sonunda kuyucuklardan çekilip son olarak iki kez PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kuyucukların mikroskopta net gözükmesi için steril swap yardımıyla kuyucuk kenarlarındaki su damlacıkları toplanmıştır. Bu işlem yapılırken hücrelere temas etmemesine özen gösterilmiştir (Barcia ve ark., 2007).

Boyama işleminde her saat için ayrı bir boyama yapılması gerekmektedir. Bu yüzden boyama işlemi her iki hücre hattı için 24,48 ve 72.saatlerde ayrı ayrı boyanmış; toplamda altı kez boyama işlemi gerçekleşmiştir. Her boyama işleminin bitmesiyle 24,48 ve 72.saat boyama fotoğrafları çekilerek deney tamamlanmıştır.

3.2.6. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarının Üç Boyutlu Geliştirilmesi

Hücre hatları pasajlanıp bir ependorfa alındıktan sonra hücre ekimi için sayımı yapılmış, bunun akabinde üç boyutlu asılı damla yöntemi kullanılarak (ing. spheroid) ekilmiştir. Hücreler buldukları ependorfta otomatik pipet yardımıyla pipetaj yapılarak homojen bir süspansiyona dönüştürülmüşlerdir. Hücrelerin bu süreden önce birkaç dakikada dibe çökme olasılıkları bulunmaktadır. Bu yüzden pipetaj yapılmıştır.

Ardından petri kabının kapak kısmı ters çevrilerek belirli satırlar ve sütunlar oluşturulacak şekilde otomatik pipet yardımıyla 10 μ L (\approx 10.000 hücre) hücre süspansiyonu petrinin üst tabanına damlacık olarak konumlandırılmıştır. Nem kontrolünü sağlamak ve medium ile karışık hücrenin bulunduğu yerde kurumaması için petrinin alt tabanına 5 mL PBS eklenmiştir.

Bununla beraber hücrelerin damlacık yapısı bozulmadan petri kapağı ters çevrilmiş ve 37 °C'de % 5 karbondioksitli inkübatörde bir gece inkübasyona bırakılmıştır (Lv ve ark., 2017).

Hücrelerin bir gece inkübe olmasıyla beraber ilaç dozları belirli konsantrasyonlarda hazırlanmış ve bu dozlar total konsantrasyonları 10 μ L'ye denk gelecek şekilde hazırlandığı için bulunan damlacıkların üzerine yine bir otomatik pipet yardımıyla 10'ar μ L ilaç dilüsyonları eklenmiş, damlacıklar total olarak 20 μ L'lik bir konsantrasyona ulaşmışlardır. Damla modeli bozulmadan tekrar petri kabı inkübatöre yerleştirilmiş ve 24,48,72. saat olmak üzere mikroskopta fotoğrafları çekilerek incelenmişlerdir.

3.2.7. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

3.2.7.1. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarında RNA İzolasyonu

RNaz inaktivasyonu için tüm materyaller, dietil karbonat (DEPC) ile işlenmiş damıtılmış su ile muâmele edilmiştir. Üreticinin protokolüne göre toplam RNA izolasyonu için GeneAll® Hybrid-R™ RNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Yaklaşık 1×10^6 ilâ 5×10^6 arasında değişen iki boyutlu ve üç boyutlu MDA-MB-231 ve MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücrelerinin üzerine 1 mL RiboEx™ ilâve edilip 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Hücreler liziz olduğunda üzerine 200 µL kloroform eklenip 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. (+4 °C) Kolonun üst fazındaki 500 µL şeffaf süpernatant temiz bir ependorfa alınmıştır ve 500 µL RBI Tampon ilâve edilmiştir. Pipetaj yapıldıktan sonra karışım spin kolona (yeşil) aktarılmıştır ve 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüp yenisi ile değiştirilmiştir. Spin kolon üzerine 500 µL SWI Tampon ilâve edilip 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüp yenisi ile değiştirilmiştir. Spin kolon üzerine 500 µL RNW Tampon ilâve edilip 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. İçerisinde herhangi bir tampon kalmaması için 10.000 g'de 1 dakika boş santrifüj yapılmıştır. 1,5 mL etiketlenmiş ependorflara spin kolonlar aktarılmıştır. Son olarak 50 µL DNaz ve RNaz içermeyen distile su ilâve edilip 10.000 g'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır (Samandi ve ark., 2015).

İzole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyon durumu NanoDropta belirlendikten sonra cDNA sentezi ile deneye devam edilmiştir.

3.2.7.2. NanoDrop ile İzole Edilen RNA'ların Ölçülmesi

Optik yoğunlukta, izole edilmiş toplam DNA ve RNA örneklerin konsantrasyonunun ve saflığının belirlenmesi için 260 nm ve 280 nm'de verdiği absorbans değerleri oranlanır. (A_{260}/A_{280}) 260 nm'de DNA ve RNA maksimum absorbans değeri (veya dalga boyu) gösterecektir. İdeal DNA saflık oranı yaklaşık 1.8 ve ideal RNA saflık oranı ise yaklaşık 2.0 olmalıdır. Toplam RNA saflığının nicelleştirilmesi için kullanılan denklem:

$$[RNA] = A_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times \text{RNA'nın Ortalama Ekstinksiyon Katsayısı (40.0)}$$

[Denklem 3.2.]

RNA saflığı ve konsantrasyon değeri NanoDrop cihazı kullanılarak ölçülmüştür. İzole edilen iki boyutlu ve üç boyutlu MDA-MB-231 ve MDA-MB-231/Sisplatin dirençli RNA örneklerinden 2 µL kadar alınıp cihaza yüklenmiştir. Cihazın verdiği konsantrasyon ve saflık değerleri gözlenmiştir (Samandi ve ark., 2015).

3.2.7.3.cDNA Sentezi ve Ekspresyon Analizi

İzole edilen tek zincirli mRNA'nın, çift zincirli komplementer DNA'ya yani cDNA'ya çevrilmesi gerekmektedir. Bunun için cDNA sentezi yapılır. Üreticinin protokolüne göre toplam cDNA sentezi için ABM® OneScript™ cDNA sentez kiti kullanılmıştır. Bütün cDNA sentezi süreci boyunca kullanılan malzemeler DEPC'li ve otoklavlıdır.

10 pg ve 500 ng arasında total RNA için gerekli hacimler kit protokolü çerçevesinde hesaplanmıştır. Bu hesaplara her bir örnek için; 1 µL dNTP ve 1 µL Oligo DT primer karışımı hazırlanmıştır. Belirlenen RNA hacimleri üzerine bu karışım ilâve edilmiştir ve üzerine nükleaz free water (DNA ve RNA içermeyen su) ilâve edilmiştir. PCR cihazında 5 dakika 65 °C'de inkübe edilip ardından 1 dakika buz blok üzerinde bekletilmiştir. Böylece cDNA ilk zincir sentezi gerçekleşmiştir.

cDNA ikinci zincir sentezi için ayrı bir ependorf içerisinde; 2 µL RTaz Reaksiyon Tamponu (10x), 2 µL DTT (0.1 M), 1 µL HyperScript™ Reverse Transkriptaz ve 1 µL ZymAll™ RNaz inhibitör karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım cDNA ilk zincir sentezinde elde edilen karışım ile birleştirilmiştir. PCR cihazında; 55 °C'de 60 dakika, 85 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Nihâî inkübasyondan sonra cDNA ürünleri ekspresyon analizi için -20 °C'de muhafâza edilmiştir (Kuang ve ark., 2018).

Elde edilen cDNA'ların gen ifade düzeyini (*ing. ekspresyon analysis*) belirlemek için hizmet alımı kapsamında revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) düzeneği kurulmuştur. Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu yardımıyla mRNA ekspresyonunun kantitasyonu; kompetitif polimeraz zincir reaksiyonu ve real-time polimeraz zincir reaksiyonu olarak iki ana basamakta gerçekleşmiştir. Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyon muhtemel basamakları düzeneğinde gösterilmiştir (Kuang ve ark., 2018).

Tablo 3.4. RT-PCR’da kullanılan primerlerin sekansları ve ısı dereceleri.

VEGF-A Forward; 5’-GAAGAAGCAGCCCATGACAG-3’ (9.(AT).2) + (9(GC).4) = 54= T _m
VEGF-A Reverse; 5’-CTCACACACACACAACCAGG-3’ (9.(AT).2) + (9(GC).4) = 54= T _m
MMP-2 Forward; 5’-CTCGAGATGCTAACGTTTCACCGC-3’ (9.(AT).2) + (9(GC).4) = 54= T _m
MMP-2 Reverse; 5’-CTCGAGATGCTAACGTTTCACCGC-3’ (9.(AT).2) + (9(GC).4) = 54= T _m
B-Actin Forward (Kontrol); 5’-CTCGAGATGCTAACGTTTCACCGC-3’ (9.(AT).2) + (9(GC).4) = 54= T _m
B-Actin Reverse (Kontrol); 5’-CTCGAGATGCTAACGTTTCACCGC-3’ (9.(AT).2) + (9(GC).4) = 54= T _m

Tablo 3.5. cDNA sentezinde kullanılan bileşenler ve hacimleri.

Bileşenler	Hacim
2X SYBRGreen Mastermix	10µL
Forward Primer (10µM)	1µL
Reverse Primer (10µM)	1µL
Örnek cDNA	2µL
Nuclease-free Water	6µL
Toplam Hacim	20µL

Tablo 3.6. RT-PCR döngü işlemlerindeki optimum değerler.

Adımlar	Sıcaklık	Zaman	Döngü
HotStart Aktivasyonu	95°C	5 dk.	1
Amplifikasyon	95°C	15 sn.	40
	55°C	30 sn.	



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

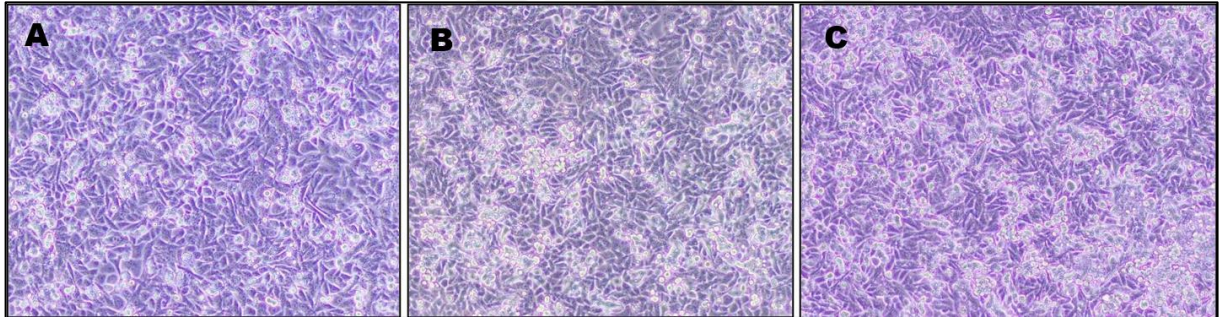
4.1.1. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarında Sitotoksosite Bulguları

Hücrelere belirlenen dozlarda ilaç verilmesinin ardından sitotoksitelerini gözlemek için 4X mikroskop görüntüleri çekildi. Bu işlem sırasında 24,48 ve 72.saat hücre proliferasyonları incelendi.

4.1.1.1. Duyarlı MDA-MB-231 Hücre Hattının Sitotoksosite Analiz Bulguları

- MDA-MB-231 Hücre Hattı Sitotoksosite Kontrol Grubu

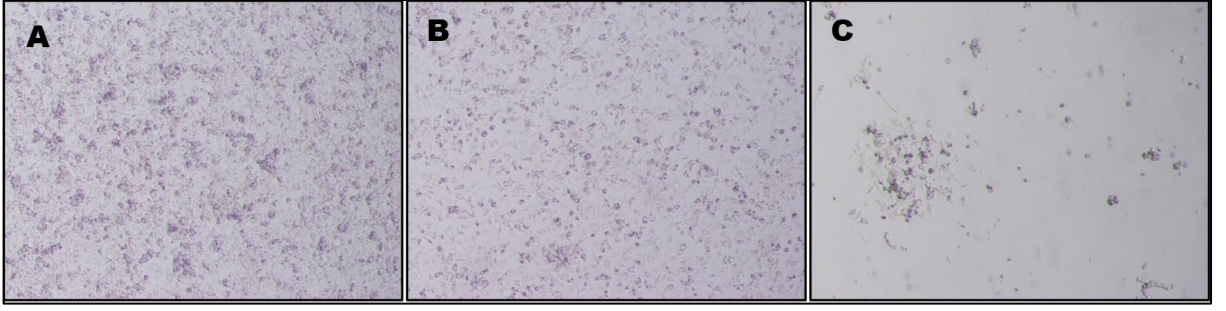
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından kontrol grubunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksosite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.1. MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminde kontrol grubunun 24 (A), 48(B), 72(C) 4X mikroskop görüntüleri.

- Etoposid 5 μ M

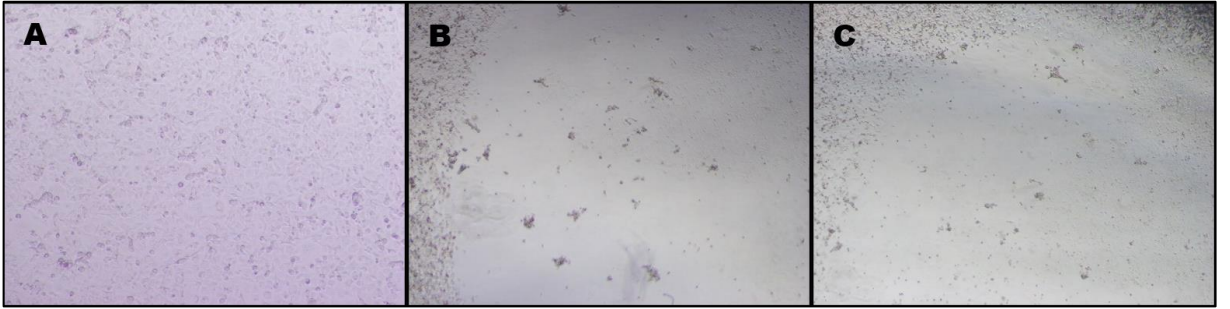
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminin yapılmasının ardından bir kuyucuğuna 5 μ M ara stok etoposid ilacı eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksosite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.2. MDA-MB-231 hücre hattına 5µM ara stok etoposid uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri.

- Etoposid 10µM

MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminin yapılmasının ardından bir kuyucuğuna 10µM ara stok etoposid ilacı eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.3. MDA-MB-231 hücre hattına 10µM ara stok etoposid uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri.

- Vinkristin 50µM

MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminin yapılmasının ardından bir kuyucuğuna 50µM ara stok vinkristin ilacı eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.4. MDA-MB-231 hücre hattında 50µM ara stok vinkristin uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksosite 4X mikroskop görüntüleri.

- Vinkristin 100 µM

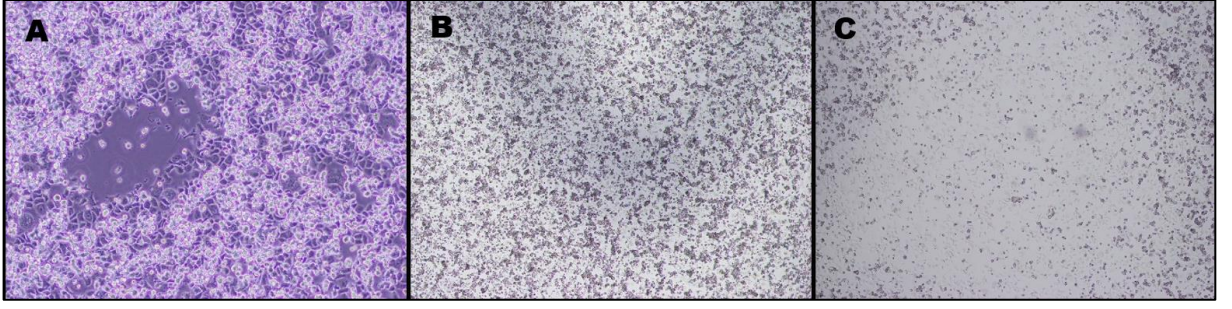
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminin yapılmasının ardından bir kuyucuğuna 100µM ara stok vinkristin ilacı eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksosite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.5. MDA-MB-231 hücre hattında 100µM ara stok vinkristin uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksosite 4X mikroskop görüntüleri.

- 5µM Etoposid + 50µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu Sitotoksosite Analizi Sonuçları

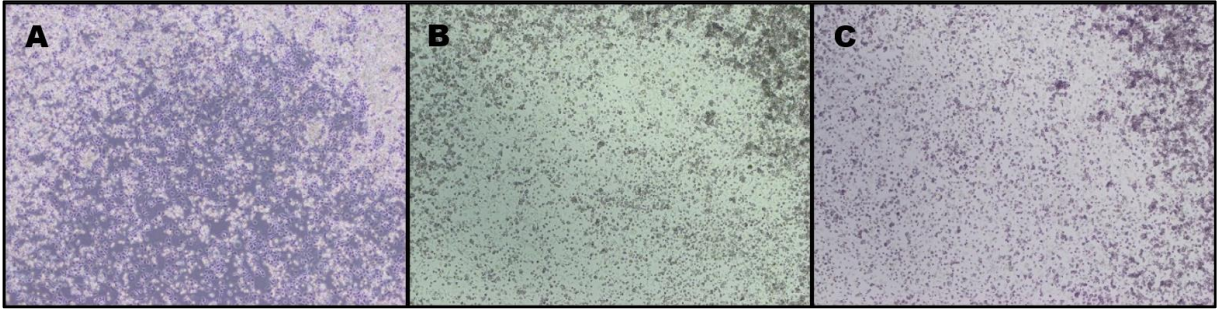
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminin yapılmasının ardından bir kuyucuğuna 5µM etoposid + 50µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksosite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.6. MDA-MB-231 hücre hattında 5µM etoposid ve 50µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri.

- 10µM Etoposid + 50µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu Sitotoksisite Analizi Sonuçları

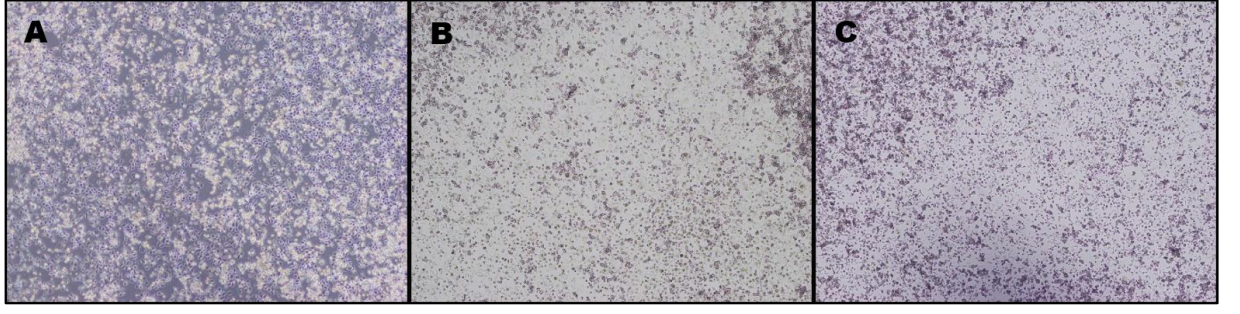
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminin yapılmasının ardından bir kuyucuğuna 10µM etoposid + 50µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.7. MDA-MB-231 hücre hattında 10µM etoposid ve 50µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri.

- 5µM Etoposid + 100µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu Sitotoksisite Analizi

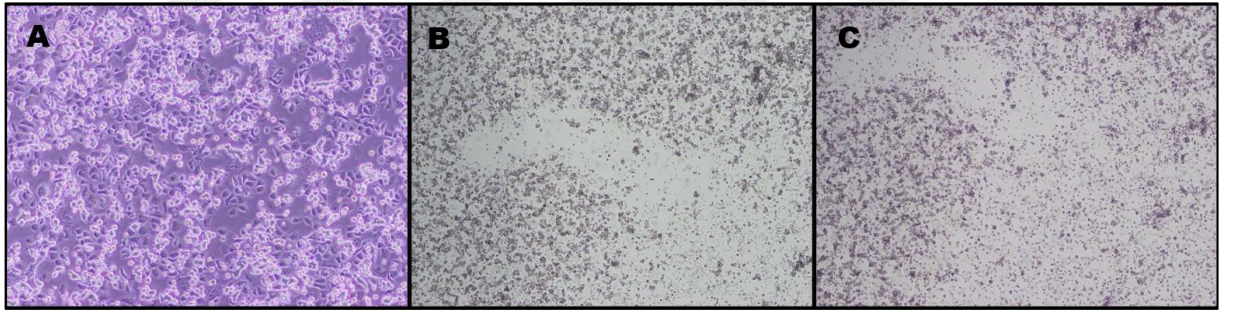
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminin yapılmasının ardından bir kuyucuğuna 5µM etoposid + 100µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.8. MDA-MB-231 hücre hattında 5µM etoposid ve 100µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri.

- 10µM Etoposid + 100µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu Sitotoksisite Analizi

MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminin yapılmasının ardından bir kuyucuğuna 10µM etoposid + 100µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.

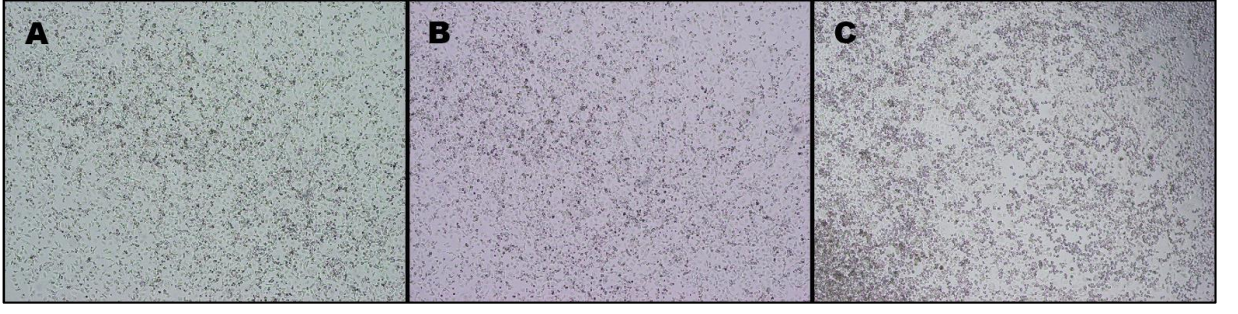


Şekil 4.9. MDA-MB-231 hücre hattında 10µM etoposid ve 100µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri.

4.1.1.2. Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hattının Sitotoksisite Analiz Bulguları

- MDA-MB-231/Sisplatin Dirençli Sitotoksisite Kontrol Grubu

MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından kontrol grubunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.10. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında kontrol grubunun 24 (sağ), 48(orta), 72(sol) 4X mikroskop görüntüleri.

- Etoposid 5 μ M

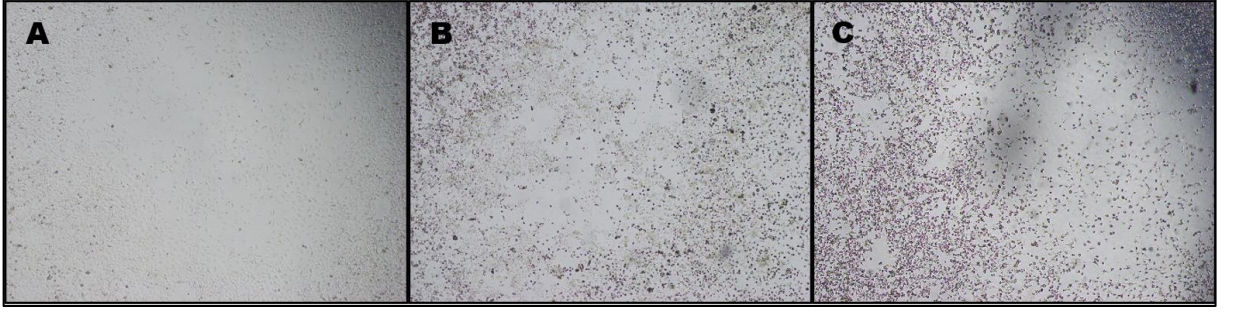
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminin yapılmasının ardından bir kuyucuğuna 5 μ M ara stok etoposid ilacı eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.11. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 5 μ M ara stok etoposid uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri.

- Etoposid 10 μ M

MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminin yapılmasının ardından bir kuyucuğuna 10 μ M ara stok etoposid ilacı eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.12. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 10µM ara stok etoposid uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri.

- Vinkristin 50µM

MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminin yapılmasının ardından bir kuyucuğuna 50µM ara stok vinkristin ilacı eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.13. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 50µM ara stok vinkristin uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri.

- Vinkristin 100µM

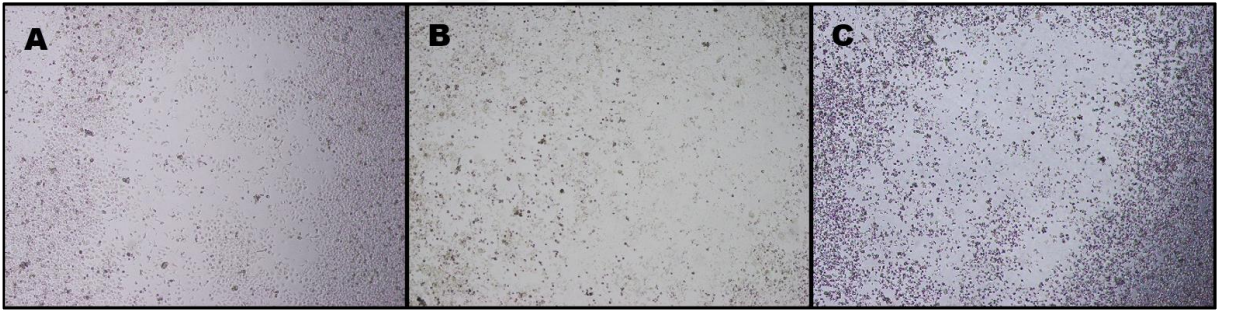
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminin yapılmasının ardından bir kuyucuğuna 100µM ara stok etoposid ilacı eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.14. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 100µM ara stok vinkristin uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksosite 4X mikroskop görüntüleri.

- 5µM Etoposid + 50µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu Sitotoksosite Analizi Bulguları

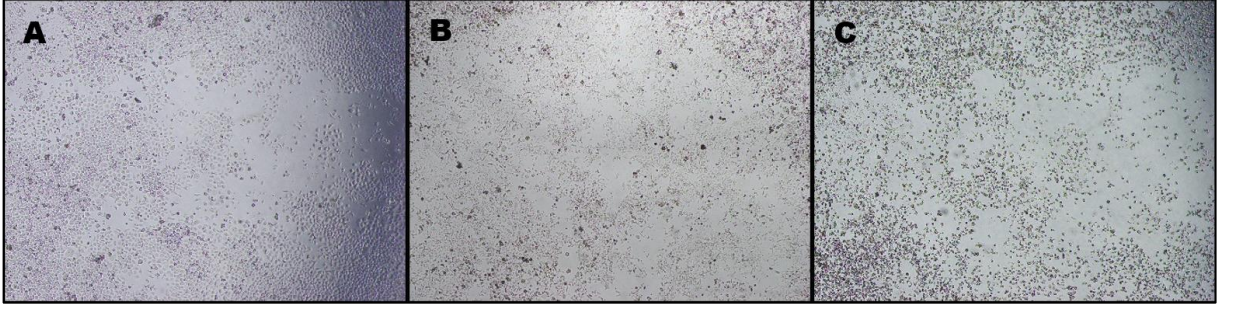
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminin yapılmasının ardından bir kuyucuğuna 5µM etoposid + 50µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksosite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.15. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 5µM etoposid ve 50µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksosite 4X mikroskop görüntüleri.

- 10µM Etoposid + 50µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu Sitotoksosite Analizi Bulguları

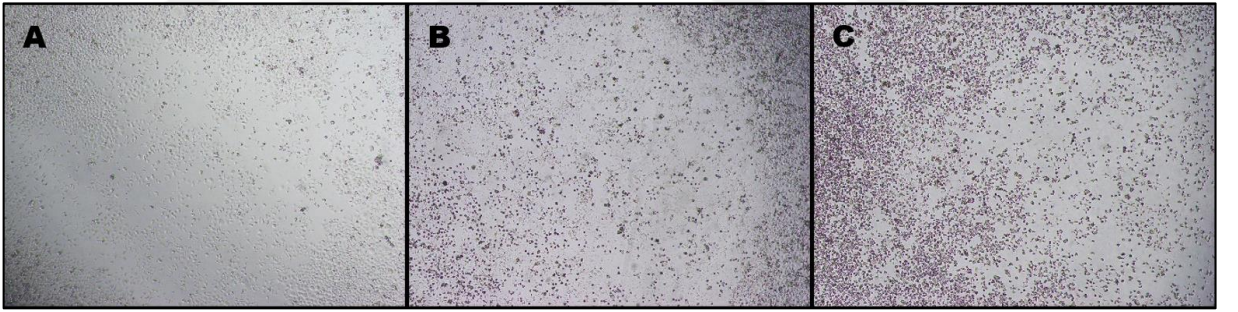
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminin yapılmasının ardından bir kuyucuğuna 10µM etoposid + 50µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksosite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.16. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 10µM etoposid ve 50µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri.

- 5µM Etoposid + 100µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu Sitotoksisite Analizi Bulguları

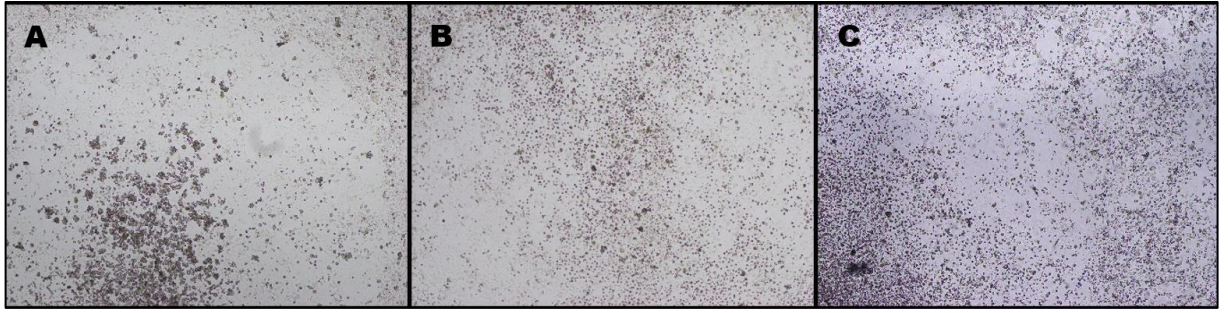
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminin yapılmasının ardından bir kuyucuğuna 5µM etoposid + 100µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.17. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 5µM etoposid ve 100µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri.

- 10µM Etoposid + 100µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu Sitotoksisite Analizi Bulguları

MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminin yapılmasının ardından bir kuyucuğuna 10µM etoposid + 100µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.18. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 10µM etoposid ve 100µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksosite 4X mikroskop görüntüleri.

4.1.2. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarında Motilite Bulguları (*ing. Migrasyon Assay*)

Hücreler ekildi ve kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10µL'lik) yara açıldı. Belirlenen dozlarda ilaç verilmesinin ardından motilitelerini gözlemek için 4X mikroskop görüntüleri çekildi. Bu işlem sırasında 24,48 ve 72.saat hücre proliferasyonları incelendi.

4.1.2.1. Duyarlı MDA-MB-231 Hücre Hattı Motilite Testi Bulguları

- MDA-MB-231 Hücre Hattı Motilite Kontrol Grubu

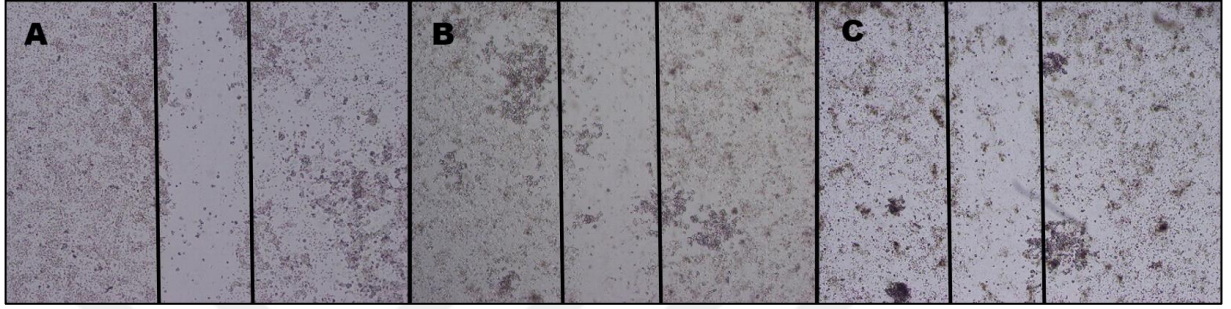
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10µL'lik) yara açıldı. Ardından kontrol grubunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.19. MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminde kontrol grubunun 24 (sağ), 48(orta), 72(sol) 4X mikroskop görüntüleri.

- Etoposid 5 μ M

MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10 μ L'lik) yara açıldı. Ardından bir kuyucuğuna 5 μ M ara stok etoposid ilacı eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.20. MDA-MB-231 hücre hattında 5 μ M ara stok etoposid uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri.

- Etoposid 10 μ M

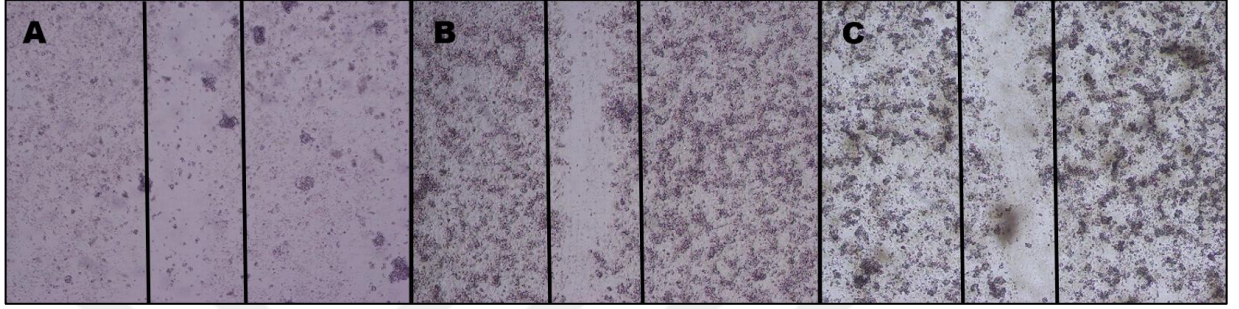
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10 μ L'lik) yara açıldı. Ardından bir kuyucuğuna 10 μ M ara stok etoposid ilacı eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.21. MDA-MB-231 hücre hattında 10 μ M ara stok etoposid uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri.

- Vinkristin 50 μ M

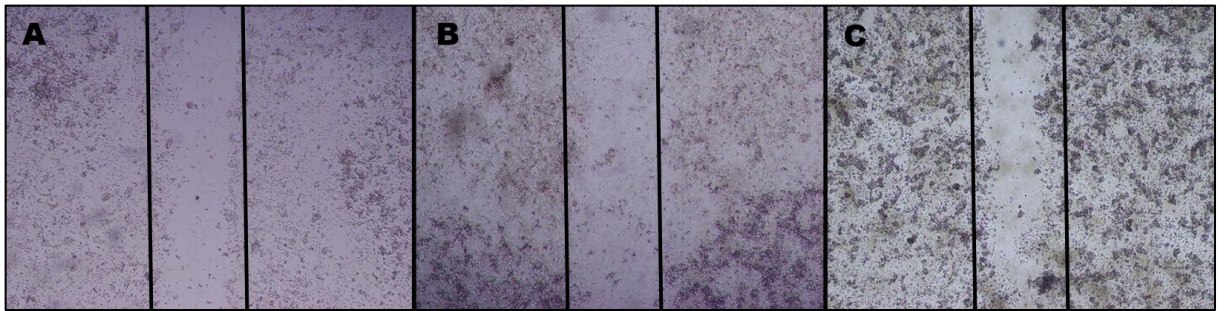
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10 μ L'lik) yara açıldı. Ardından bir kuyucuğuna 50 μ M ara stok vinkristin ilacı eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.22. MDA-MB-231 hücre hattında 50 μ M ara stok vinkristin uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri.

- Vinkristin 100 μ M

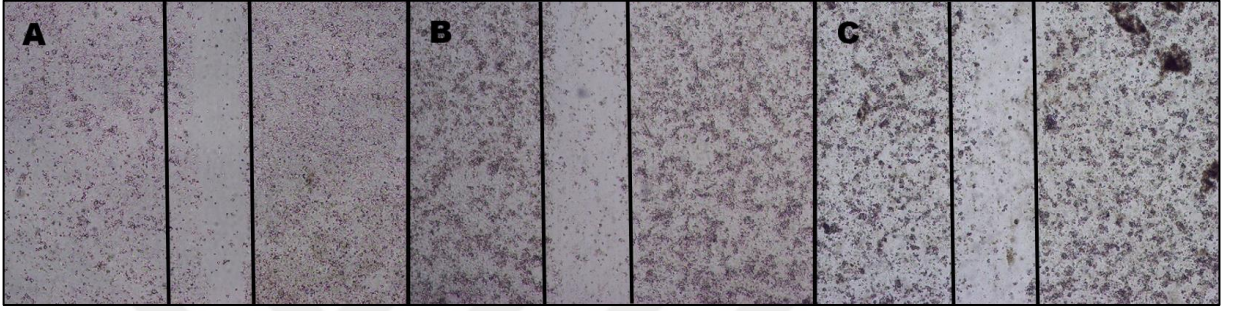
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10 μ L'lik) yara açıldı. Ardından bir kuyucuğuna 100 μ M ara stok vinkristine ilacı eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) sitotoksisite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.23. MDA-MB-231 hücre hattında 100 μ M ara stok vinkristin uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri.

- 5µM Etoposid + 50µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu Motilite Analizi Bulguları

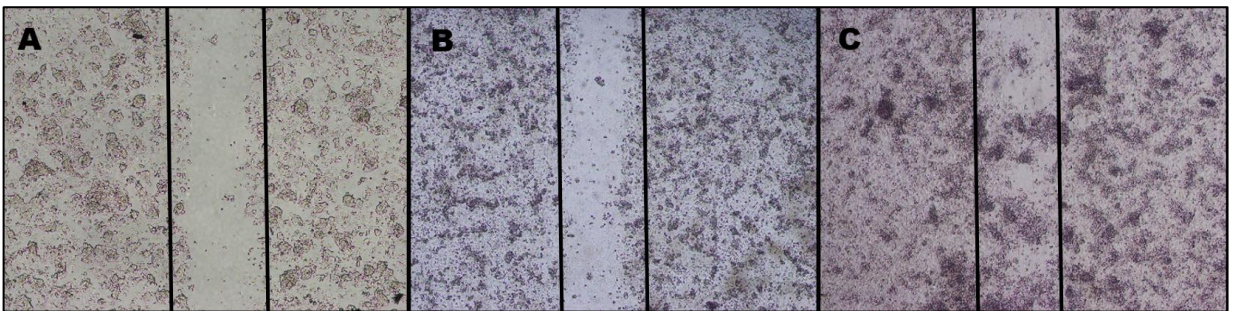
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10µL'lik) yara açıldı. Ardından bir kuyucuğuna 5µM etoposid + 50µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.24. MDA-MB-231 hücre hattında 5µM etoposid ve 50µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri.

- 10µM Etoposid + 50µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu Motilite Analizi Bulguları

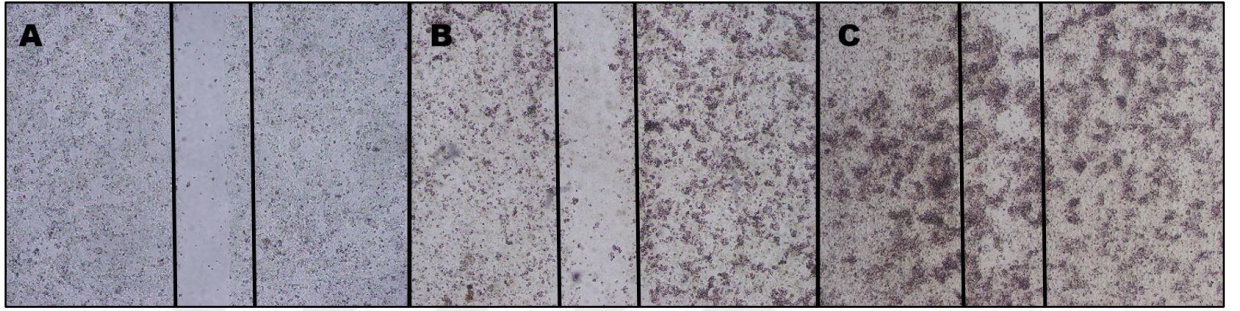
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10µL'lik) yara açıldı. Ardından bir kuyucuğuna 10µM etoposid + 50µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.25. MDA-MB-231 hücre hattında 10µM etoposid ve 50µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri.

- 5µM Etoposid + 100µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu Motilite Analizi Bulguları

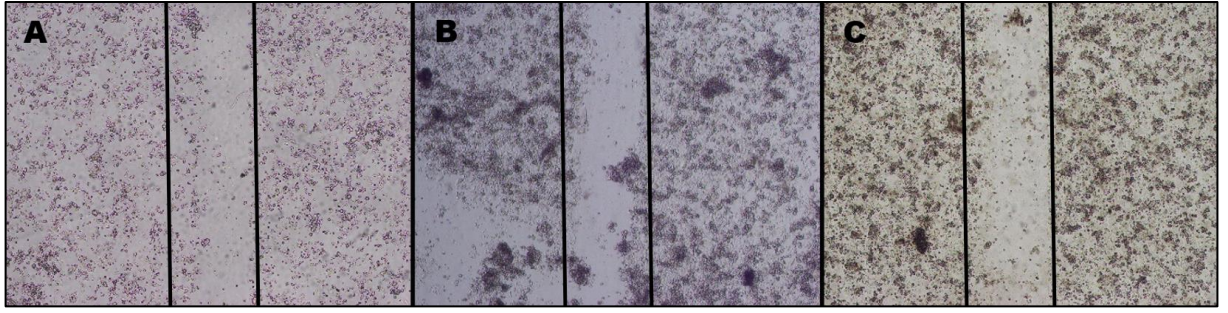
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10µL'lik) yara açıldı. Ardından bir kuyucuğuna 5µM etoposid + 100µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.26. MDA-MB-231 hücre hattında 5µM etoposid ve 100µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri.

- 10µM Etoposid + 100µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu Motilite Analizi Bulguları

MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10µL'lik) yara açıldı. Ardından bir kuyucuğuna 10µM etoposid + 100µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.

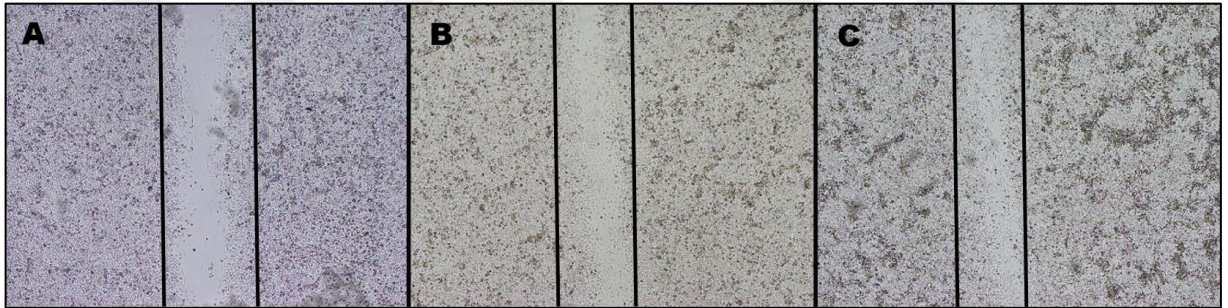


Şekil 4.27. MDA-MB-231 hücre hattında 10µM etoposid ve 100µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri.

4.1.2.2. Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hattı Motilite Analizi Bulguları

- MDA-MB-231/Sisplatin Dirençli Hücre Hattı Motilite Kontrol Grubu

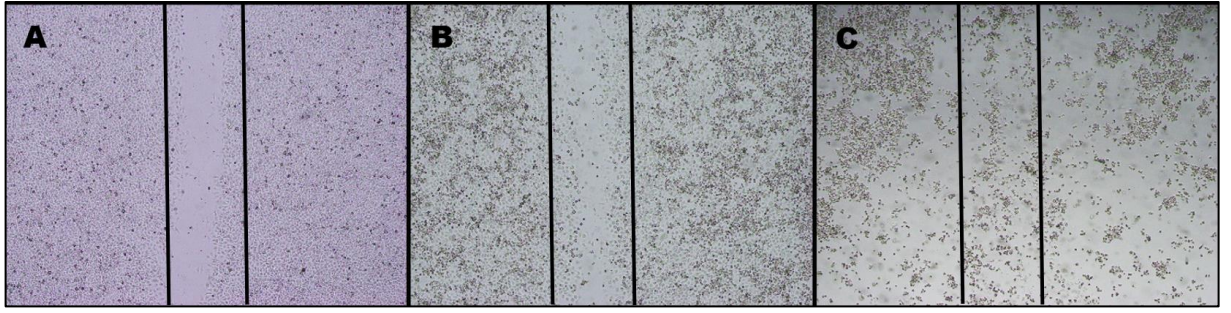
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10µL'lik) yara açıldı. Ardından kontrol grubunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.28. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminde kontrol grubunun 24 (sağ), 48(orta), 72(sol) 4X mikroskop görüntüleri.

- Etoposid 5 µM

MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10µL'lik) yara açıldı. Ardından bir kuyucuğuna 5µM ara stok etoposid ilacı eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.29. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 5µM ara stok etoposid uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri.

- Etoposid 10 µM

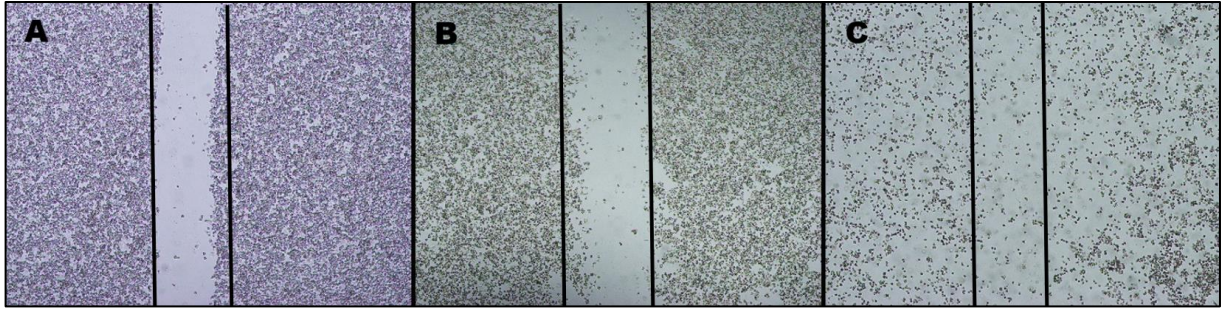
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10µL'lik) yara açıldı. Ardından bir kuyucuğuna 10µM ara stok etoposid ilacı eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.30. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 10µM ara stok etoposid uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri.

- Vinkristin 50 µM

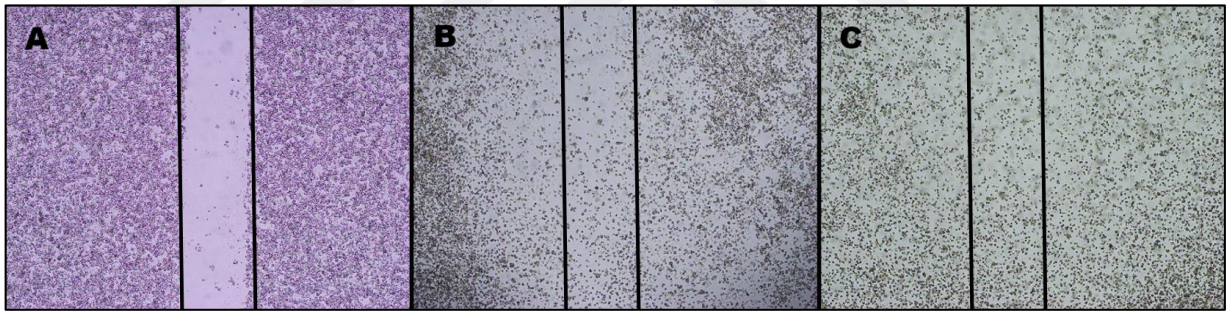
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10µL'lik) yara açıldı. Ardından bir kuyucuğuna 50µM ara stok vinkristin ilacı eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.31. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 50µM ara stok vinkristin uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri.

- Vinkristin 100 µM

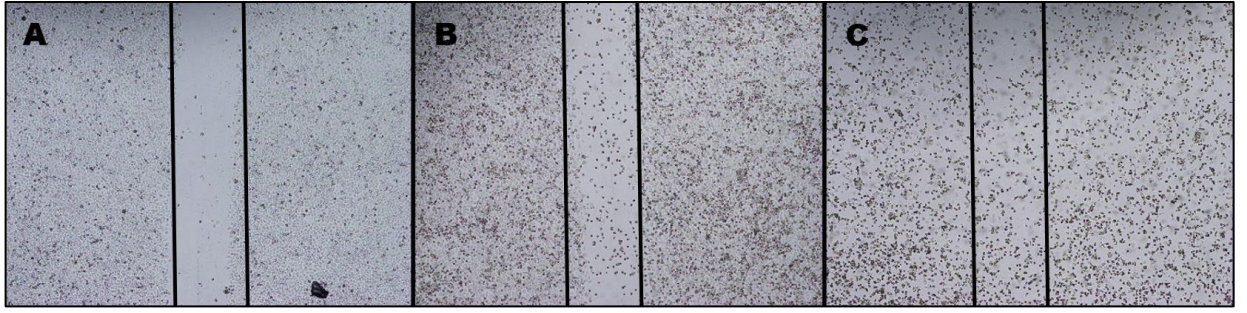
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10µL'lik) yara açıldı. Ardından bir kuyucuğuna 100µM ara stok vinkristin ilacı eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.32. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 100µM ara stok vinkristin uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri.

- 5µM Etoposid + 50µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu Motilite Analizi Bulguları

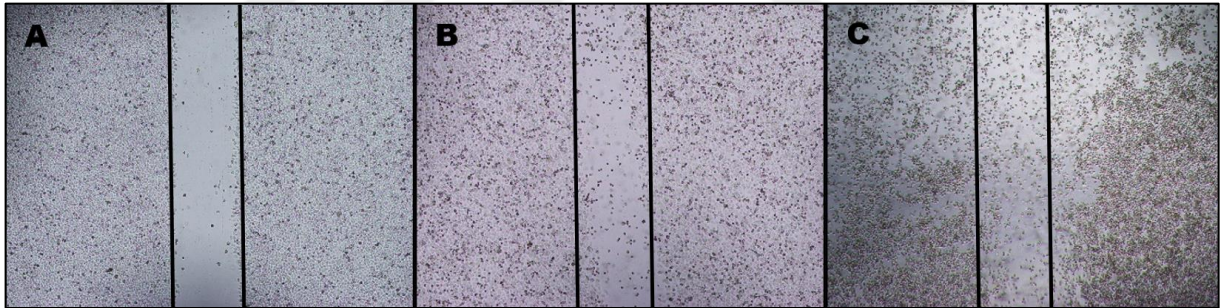
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10µL'lik) yara açıldı. Ardından bir kuyucuğuna 5µM etoposid + 50µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.33. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 5µM etoposid ve 50µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri.

- 10µM Etoposid + 50µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu Motilite Analizi Bulguları

MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10µL'lik) yara açıldı. Ardından bir kuyucuğuna 10µM etoposid + 50µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.34. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 10µM etoposid ve 50µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri.

- 5µM Etoposid + 100µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu Motilite Analizi Bulguları

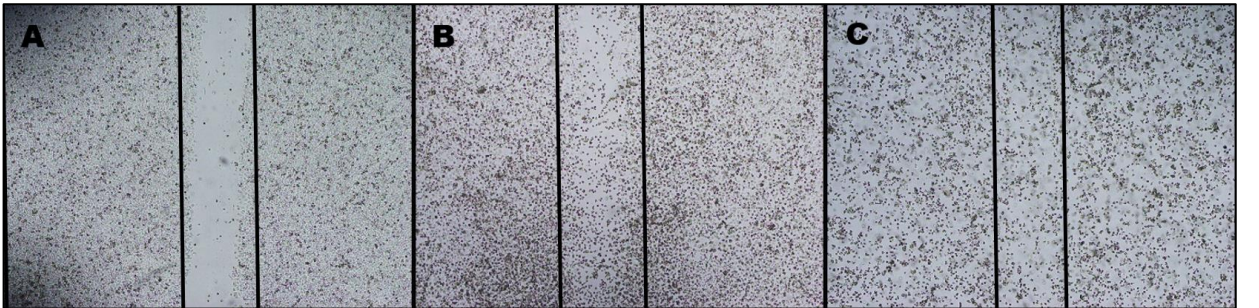
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10µL'lik) yara açıldı. Ardından bir kuyucuğuna 5µM etoposid + 100µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.35. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 5µM etoposid ve 100µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri.

- 10µM Etoposid + 100µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu Motilite Analizi Bulguları

MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Kuyucuk yüzeyi %80 dolduktan sonra orta üstten orta alta doğru otomatik pipet ucuyla (10µL'lik) yara açıldı. Ardından bir kuyucuğuna 10µM etoposid + 100µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. İlaç verilmesi süresini müteakip 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.36 MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 10µM etoposid ve 100µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) motilite 4X mikroskop görüntüleri.

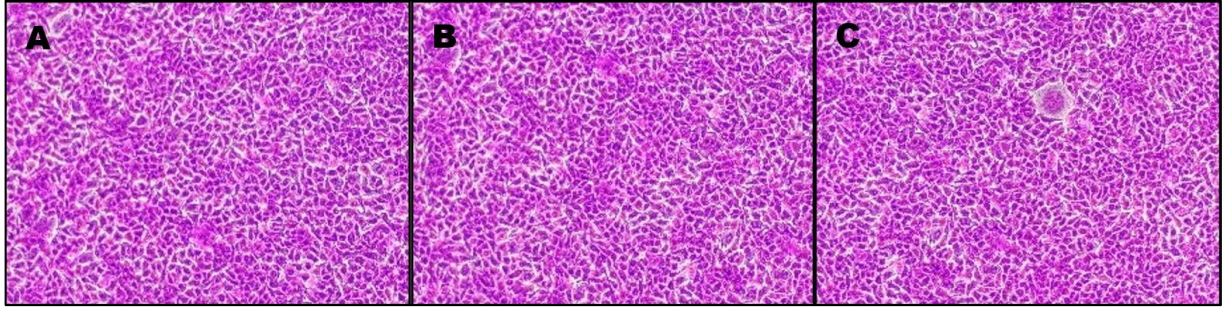
4.1.3. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre İnvazyon Tahlili Bulguları (*ing. İnvazyon Assay*)

Hücrelere belirlenen dozlarda ilaç verilmesinin ardından 24.saat, 48.saat ve 72.saat ayrı ayrı olmak üzere giemsa ile boyama işlemi gerçekleştirildi. Hücre istilalarını gözlemlemek için 4X mikroskop görüntüleri çekildi. Bu işlem sırasında 24,48 ve 72.saat hücre proliferasyonları incelendi.

4.1.3.1. Duyarlı MDA-MB-231 Hücre Hattında İnvazyon Tahlili Bulguları

- MDA-MB-231 Hücre Hattı İnvazyon Tahlili Kontrol Grubu

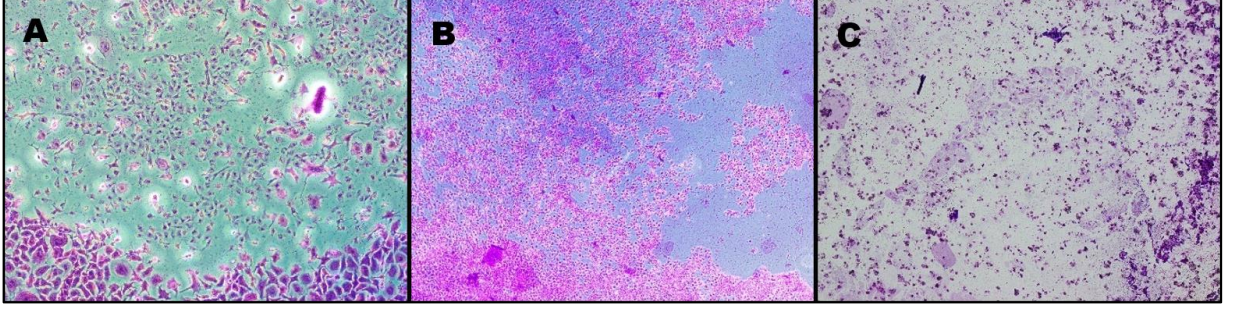
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenmiş ve boyama işlemi gerçekleştirildi. Ardından kontrol grubunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.37. MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminde kontrol grubunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri.

- Etoposid 5 μ M

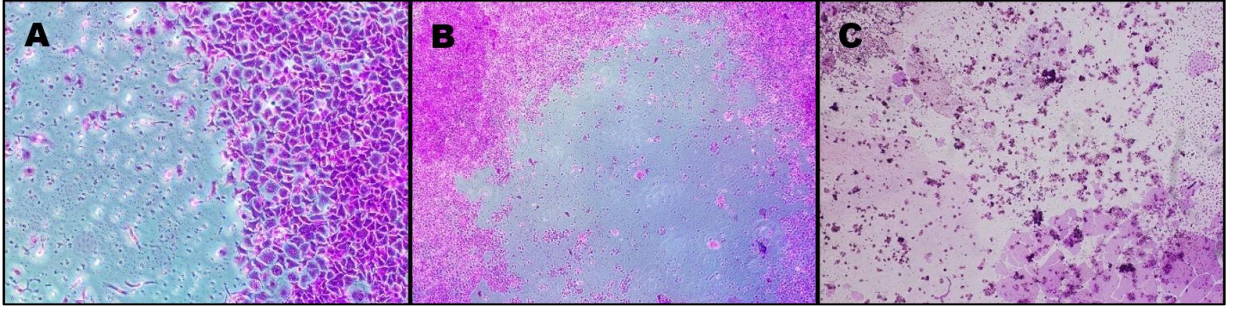
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından bir kuyucuğuna 5 μ M ara stok etoposid ilacı eklendi. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenerek boyama işlemi gerçekleştirildi. 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.38 MDA-MB-231 hücre hattında 5 μ M ara stok etoposid uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri.

- Etoposid 10 μ M

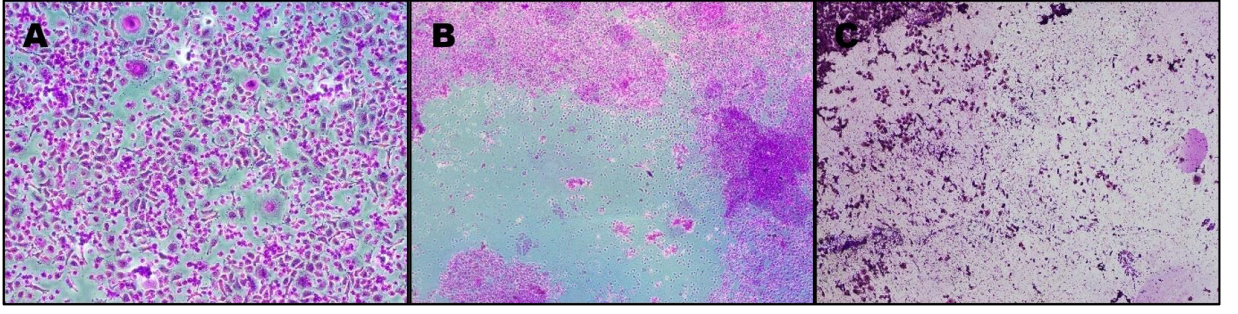
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından bir kuyucuğuna 10 μ M ara stok etoposid ilacı eklendi. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenerek boyama işlemi gerçekleştirildi. 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.39. MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminde 10 μ M ara stok etoposid uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri.

- Vincristine 50 μ M

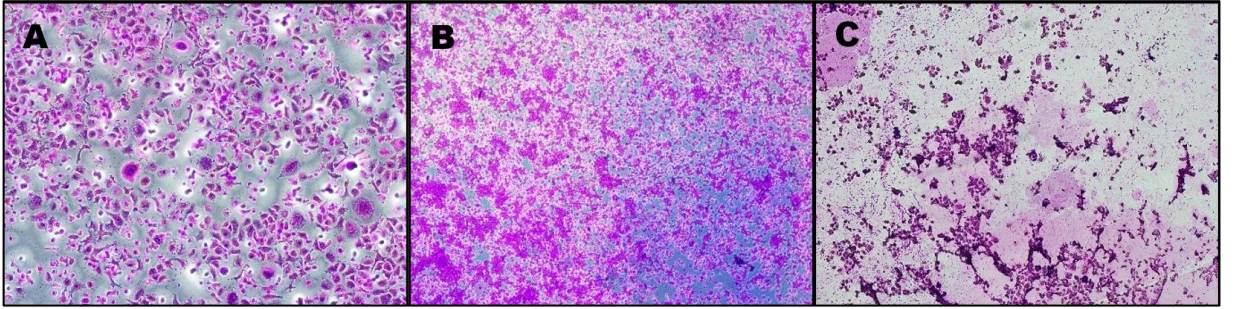
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından bir kuyucuğuna 50 μ M ara stok vinkristin ilacı eklendi. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenerek boyama işlemi gerçekleştirildi. 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.40. MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminde 50 μ M ara stok vinkristin uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri.

- Vinkristin 100 μ M

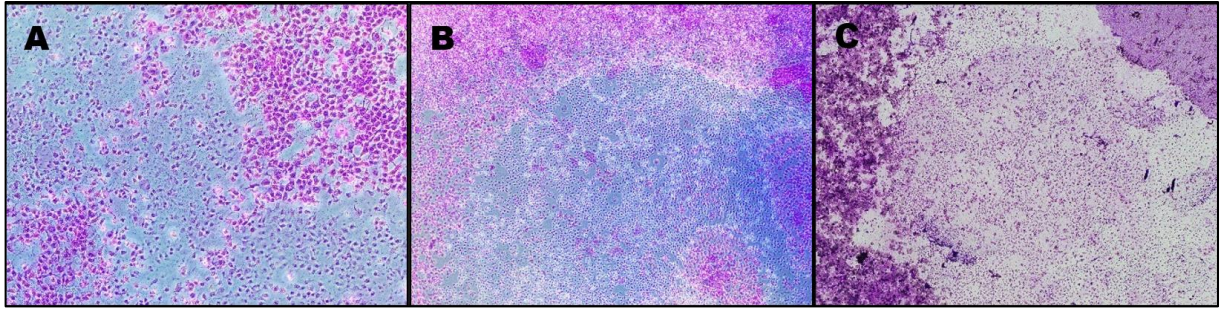
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından bir kuyucuğuna 100 μ M ara stok vinkristin ilacı eklendi. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenerek boyama işlemi gerçekleştirildi. 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.41. MDA-MB-231 hücre hattında 100 μ M ara stok vinkristin uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri.

- 5 μ M Etoposid + 50 μ M Vinkristin İlaç Kombinasyonu İnvazyon Tahlili

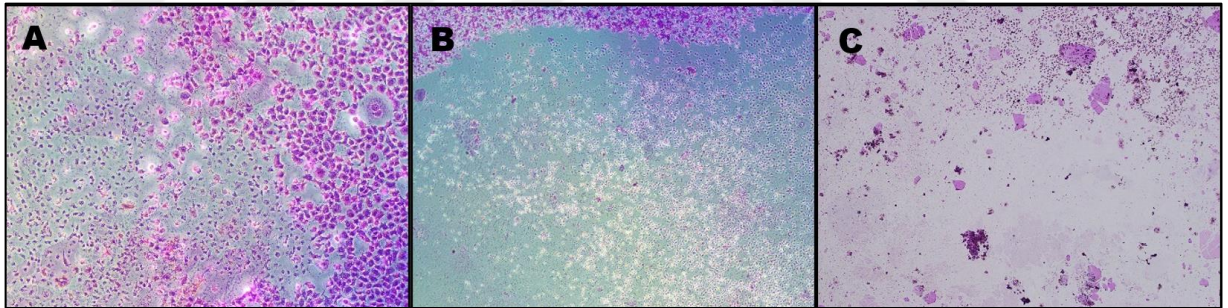
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından bir kuyucuğuna 5 μ M etoposid + 50 μ M vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenerek boyama işlemi gerçekleştirildi. 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.42. MDA-MB-231 hücre hattında 5µM etoposid ve 50µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri.

- 10µM Etoposid + 50µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu İnvazyon Tahlili Bulguları

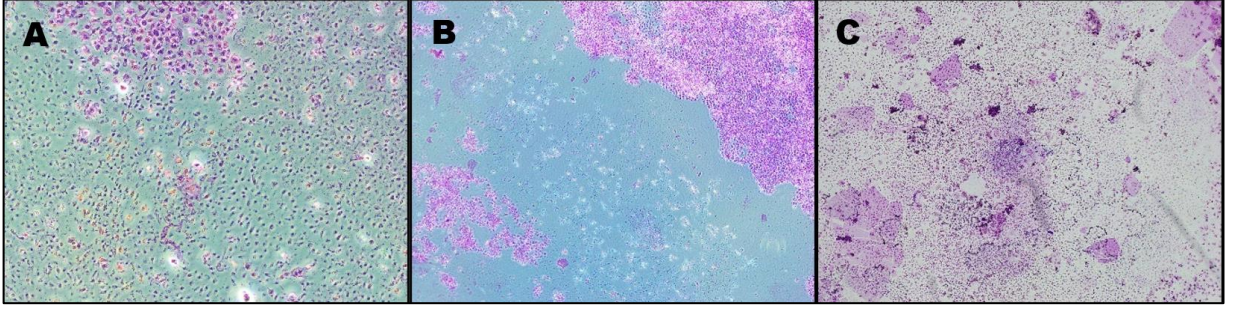
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından bir kuyucuğuna 10µM etoposid + 50µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenerek boyama işlemi gerçekleştirildi. 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.43. MDA-MB-231 hücre hattında 10µM etoposid ve 50µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri.

- 5µM Etoposid + 100µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu İnvazyon Tahlili Bulguları

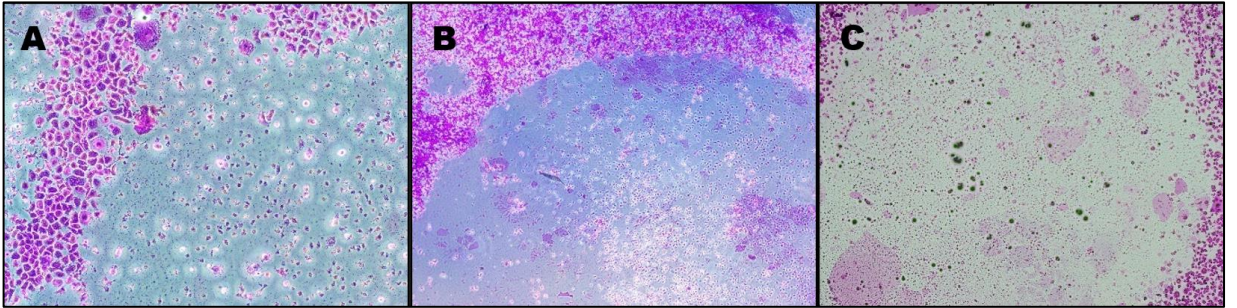
MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından bir kuyucuğuna 5µM etoposid + 100µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenerek boyama işlemi gerçekleştirildi. 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.44. MDA-MB-231 hücre hattında 5µM etoposid ve 100µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri.

- 10µM Etoposid + 100µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu İnvazyon Tahlili Bulguları

MDA-MB-231 hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından bir kuyucuğuna 10µM etoposid + 100µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenerek boyama işlemi gerçekleştirildi. 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.

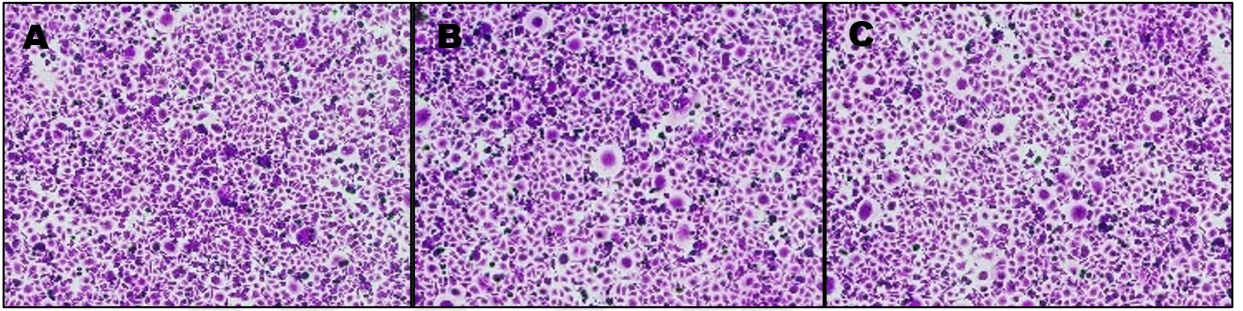


Şekil 4.45. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında, 10µM etoposid ve 100µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri.

4.1.3.2. Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hattında İnvazyon Tahlili Bulguları

- MDA-MB-231/Sisplatin Dirençli Hücre Hattı İnvazyon Tahlili Kontrol Grubu

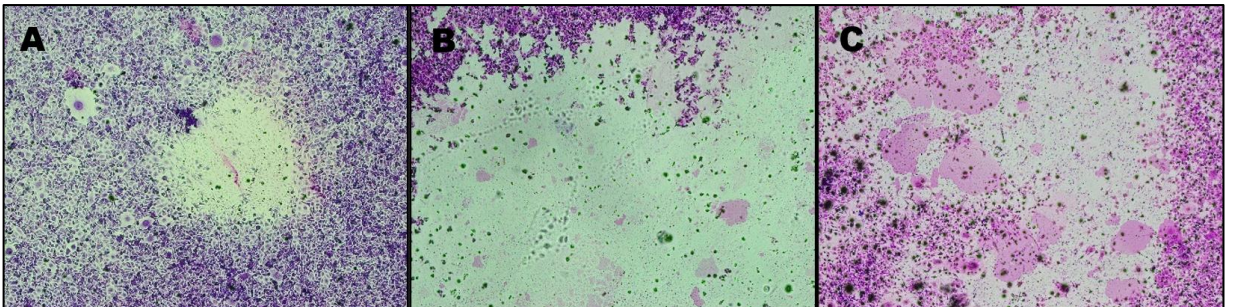
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenmiş ve boyama işlemi gerçekleştirildi. Ardından kontrol grubunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.46. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekiminde kontrol grubunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri.

- Etoposid 5 μ M

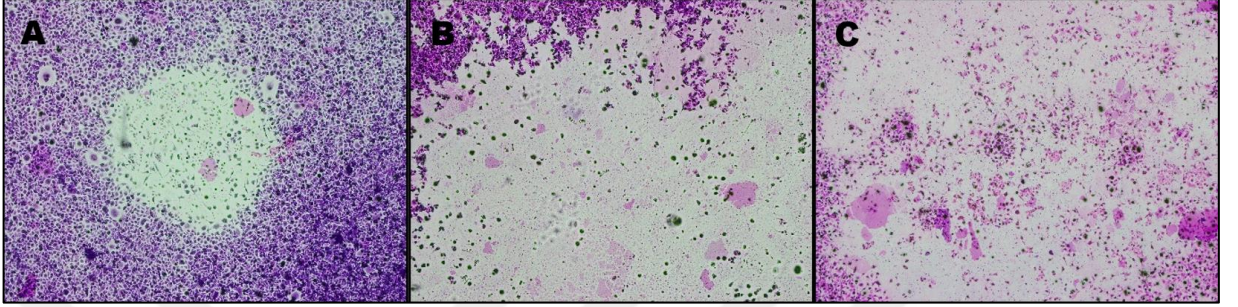
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından bir kuyucuğuna 5 μ M ara stok etoposid ilacı eklendi. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenerek boyama işlemi gerçekleştirildi. 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.47. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 5 μ M ara stok etoposid uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri.

- Etoposid 10 μ M

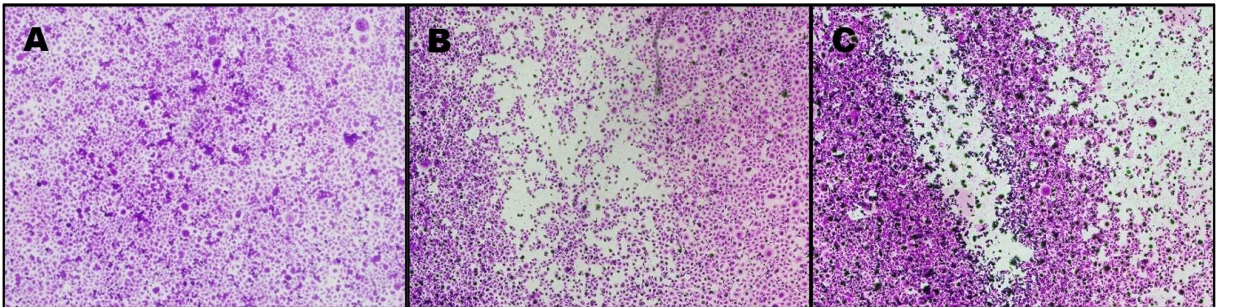
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından bir kuyucuğuna 10 μ M ara stok etoposid ilacı eklendi. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenerek boyama işlemi gerçekleştirildi. 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.48. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 10 μ M ara stok etoposid uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili analizi 4X mikroskop görüntüleri.

- Vinkristin 50 μ M

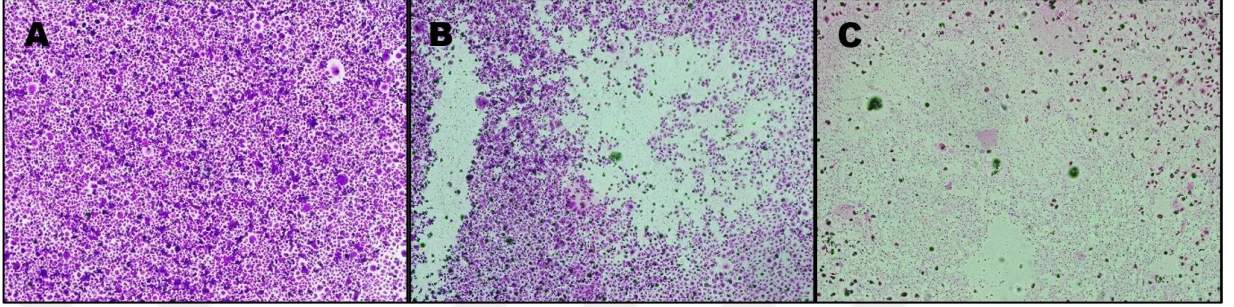
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından bir kuyucuğuna 50 μ M ara stok vinkristin ilacı eklendi. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenerek boyama işlemi gerçekleştirildi. 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.49. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 50 μ M ara stok vinkristin uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri.

- Vinkristin 100 μ M

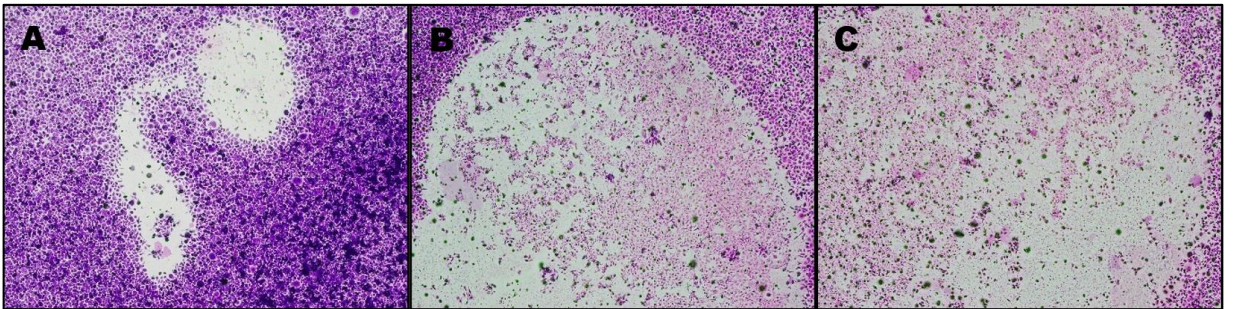
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından bir kuyucuğuna 100 μ M ara stok vinkristine ilacı eklendi. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenerek boyama işlemi gerçekleştirildi. 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.50. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 100 μ M ara stok vinkristin uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri.

- 5 μ M Etoposid + 50 μ M Vinkristin İlaç Kombinasyonu İnvazyon Tahlili Bulguları

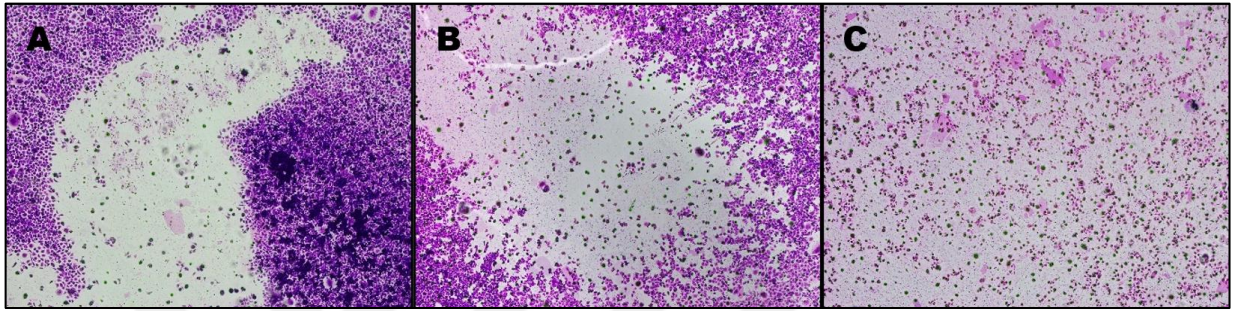
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından bir kuyucuğuna 5 μ M etoposid + 50 μ M vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenerek boyama işlemi gerçekleştirildi. 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.51. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 5 μ M etoposid ve 50 μ M vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri.

- 10 μ M Etoposid + 50 μ M Vinkristin İlaç Kombinasyonu İnvazyon Tahlili Bulguları

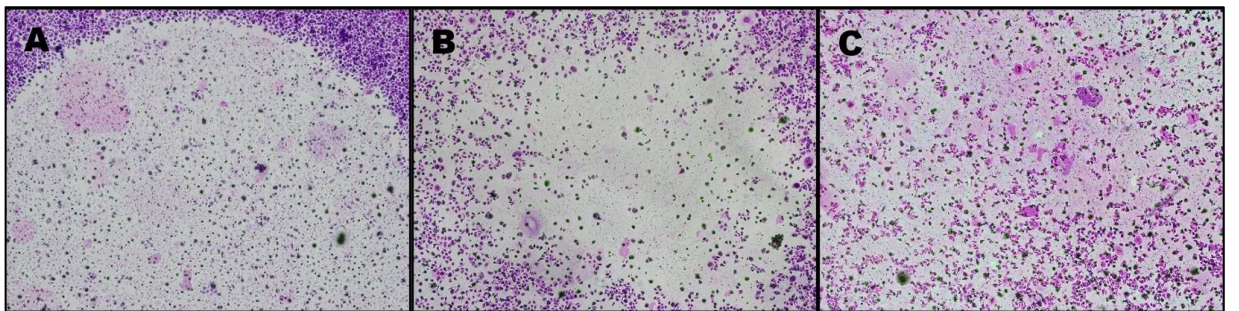
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından bir kuyucuğuna 10 μ M etoposid + 50 μ M vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenerek boyama işlemi gerçekleştirildi. 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.52 MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 10 μ M etoposid ve 50 μ M vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri.

- 5 μ M Etoposid + 100 μ M Vinkristin İlaç Kombinasyonu İnvazyon Tahlili Bulguları

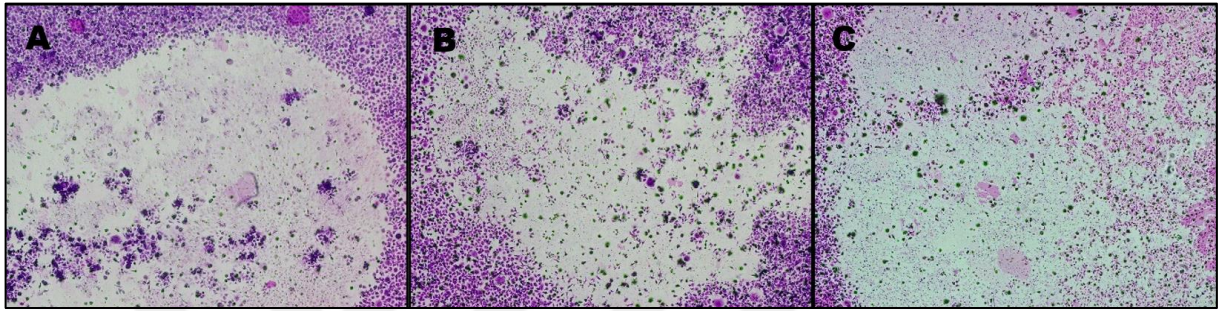
MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından bir kuyucuğuna 5 μ M etoposid + 100 μ M vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenerek boyama işlemi gerçekleştirildi. 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.53. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 5 μ M etoposid ve 100 μ M vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri.

- 10µM Etoposid + 100µM Vinkristin İlaç Kombinasyonu İnvazyon Tahlili Bulguları

MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının 12'lik kuyucuklara ekimi yapıldı. Ardından bir kuyucuğuna 10µM etoposid + 100µM vinkristin ara stoklarında ilaç kombinasyonu eklendi. Buna müteakip giemsa boyama prosedürü izlenerek boyama işlemi gerçekleştirildi. 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri çekildi.



Şekil 4.54. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 10µM etoposid ve 100µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) invazyon tahlili 4X mikroskop görüntüleri.

4.1.4 Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarının Üç Boyutlu Geliştirilmesinin Bulguları

4.1.4.1. Duyarlı MDA-MB-231 Hücre Hattının Üç Boyutlu Geliştirilmesinin Bulguları

Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10µL hücre ekimi gerçekleştirildi. Petri kabının alt tarafına PBS eklenerek hücre ekilen petri asılı damla yöntemi olacak şekilde kapatıldı. Bunun akabinde bir gece inkübasyondan sonra her bir damlacığa farklı ilaç dozlarında 10µL ilaç verilerek 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.

- MDA-MB-231 Hücre Hattı Üç Boyutlu Kontrol Grubu

Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10µL hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.



Şekil 4.55. MDA-MB-231 hücre hattının asılı damla yöntemiyle ekiminde kontrol grubunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüleri.

- 5 μ M Etoposid

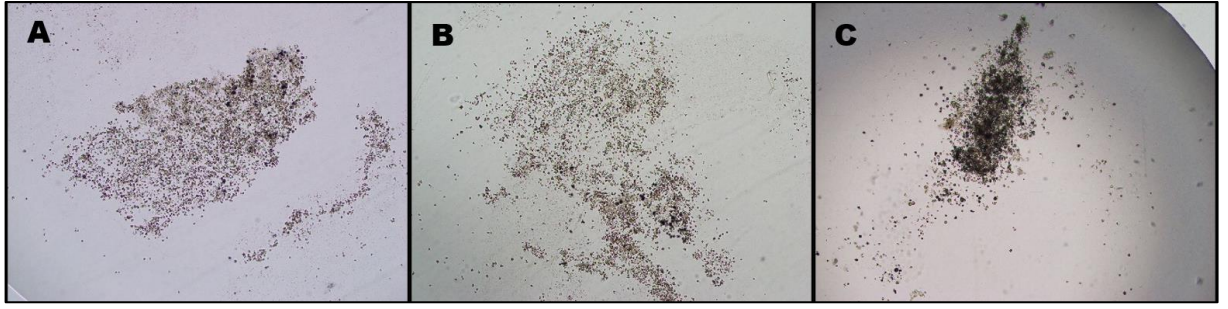
Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10 μ L hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde bir gece inkübasyondan sonra belirlenen damlacıklara 5 μ M etoposid ara stok dozuna sahip 10 μ L ilaç verilerek 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.



Şekil 4.56. MDA-MB-231 hücre hattında 5 μ M ara stok etoposid uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüleri.

- 10 μ M Etoposid

Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10 μ L hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde bir gece inkübasyondan sonra belirlenen damlacıklara 10 μ M etoposid ara stok dozuna sahip 10 μ L ilaç verilerek 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.



Şekil 4.57. MDA-MB-231 hücre hattında 10µM ara stok etoposid uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüleri.

- 50µM Vinkristin

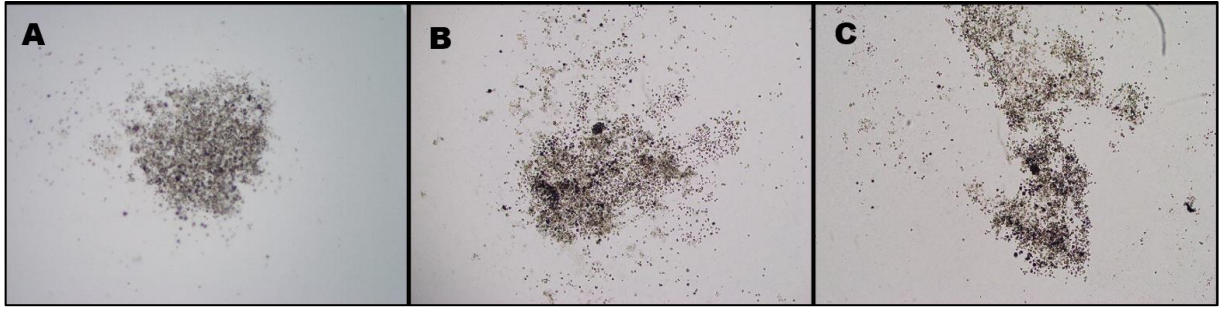
Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10µL hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde bir gece inkübasyondan sonra belirlenen damlacıklara 50µM vinkristin ara stok dozuna sahip 10µL ilaç verilerek 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.



Şekil 4.58. MDA-MB-231 hücre hattında 50µM ara stok vinkristin uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüleri.

- 100µM Vinkristin

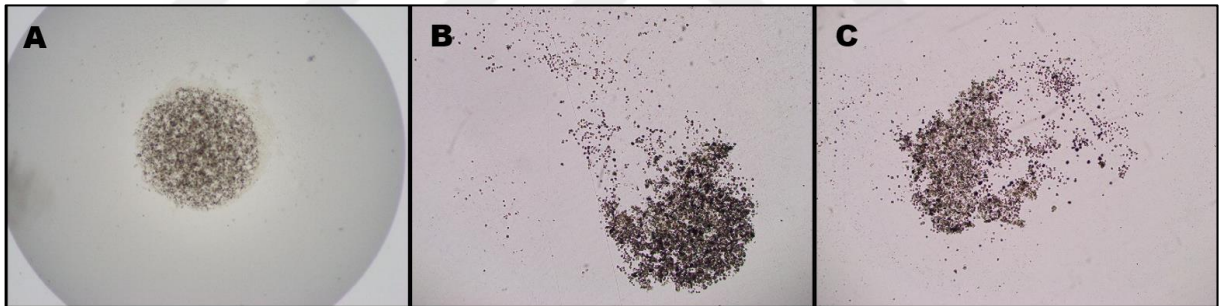
Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10µL hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde bir gece inkübasyondan sonra belirlenen damlacıklara 100µM vinkristin ara stok dozuna sahip 10µL ilaç verilerek 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.



Şekil 4.59. MDA-MB-231 hücre hattında 100µM ara stok vinkristin uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüleri.

- 5µM Etoposid + 50µM Vinkristin İlaç Kombinasyonunun Üç Boyutlu Geliştirilmesi Bulguları

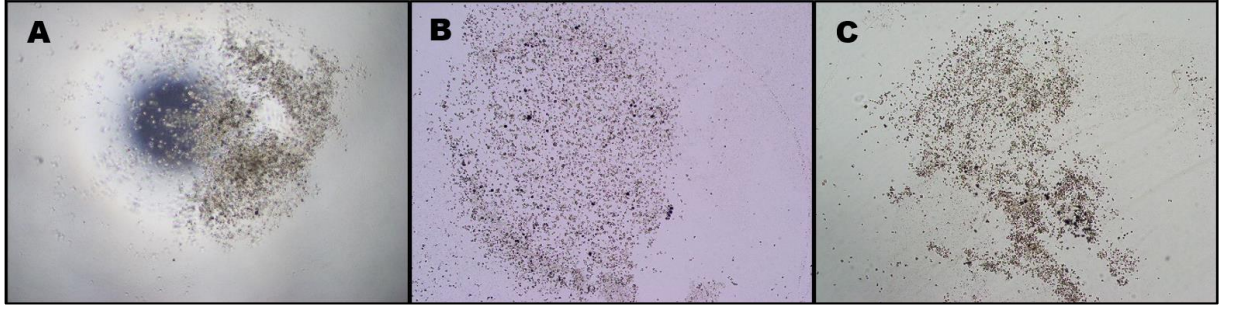
Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10µL hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde bir gece inkübasyondan sonra belirlenen damlacıklara 5µM etoposid + 50µM vinkristine ara stok dozlarına sahip 10µL ilaç kombinasyonundan verilerek 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.



Şekil 4.60. MDA-MB-231 hücre hattında 5µM etoposid ve 50µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüleri.

- 10µM Etoposid + 50µM Vinkristin İlaç Kombinasyonunun Üç Boyutlu Geliştirilmesi Bulguları

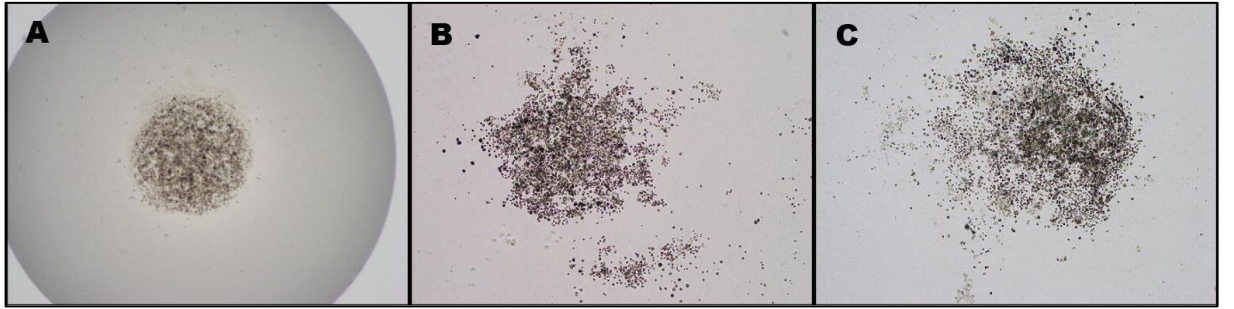
Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10µL hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde bir gece inkübasyondan sonra belirlenen damlacıklara 10µM etoposid + 50µM vinkristine ara stok dozlarına sahip 10µL ilaç kombinasyonundan verilerek 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.



Şekil 4.61. MDA-MB-231 hücre hattında 10µM etoposid ve 50µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüleri.

- 5µM Etoposid + 100µM Vinkristin İlaç Kombinasyonunun Üç Boyutlu Geliştirilmesi Bulguları

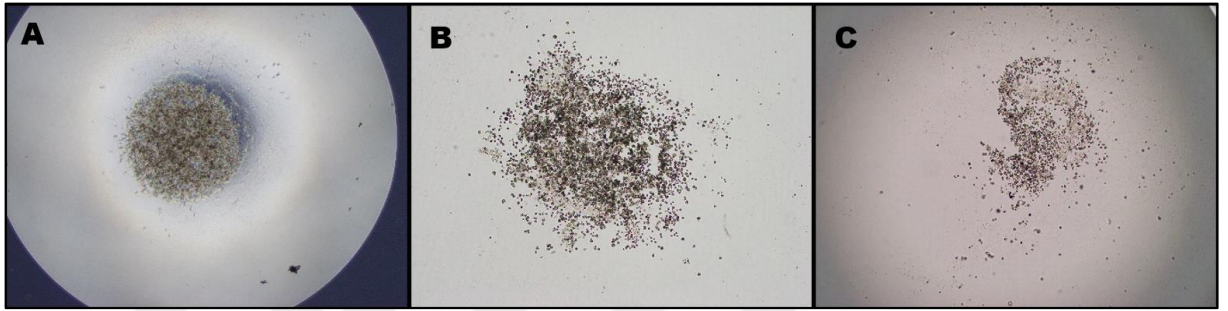
Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10µL hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde bir gece inkübasyondan sonra belirlenen damlacıklara 5µM etoposid + 100µM vinkristine ara stok dozlarına sahip 10µL ilaç kombinasyonundan verilerek 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.



Şekil 4.62. MDA-MB-231 hücre hattında 5µM etoposid ve 100µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüleri.

- 10µM Etoposid + 100µM Vinkristin İlaç Kombinasyonunun Üç Boyutlu Geliştirilmesi Bulguları

Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10µL hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde bir gece inkübasyondan sonra belirlenen damlacıklara 10µM etoposid + 100µM vinkristine ara stok dozlarına sahip 10µL ilaç kombinasyonundan verilerek 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.

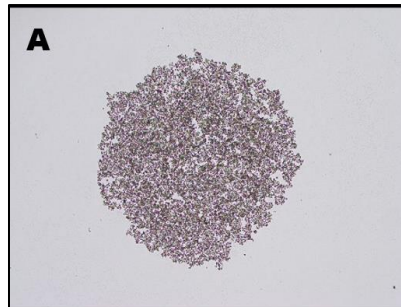


Şekil 4.63. MDA-MB-231 hücre hattında 10µM etoposid ve 100µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüleri.

4.1.4.2. Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hattının Üç Boyutlu Geliştirilmesinin Bulguları

- MDA-MB-231 Hücre Hattının Üç Boyutlu Kontrol Grubu

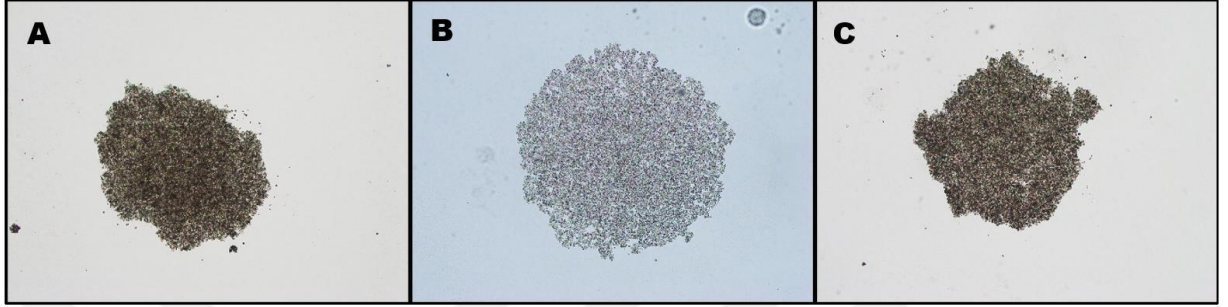
Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10µL hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.



Şekil 4.64. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının asılı damla yöntemiyle ekiminde kontrol grubunun 24.saat (A) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüsü.

- 5µM Etoposid

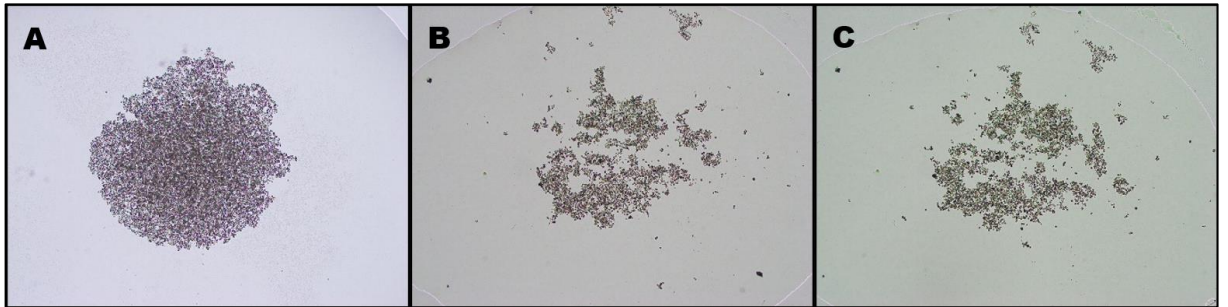
Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10µL hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde bir gece inkübasyondan sonra belirlenen damlacıklara 5µM etoposid ara stok dozuna sahip 10µL ilaç verilerek 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.



Şekil 4.65. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 5µM ara stok etoposid uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüleri.

- 10µM Etoposid

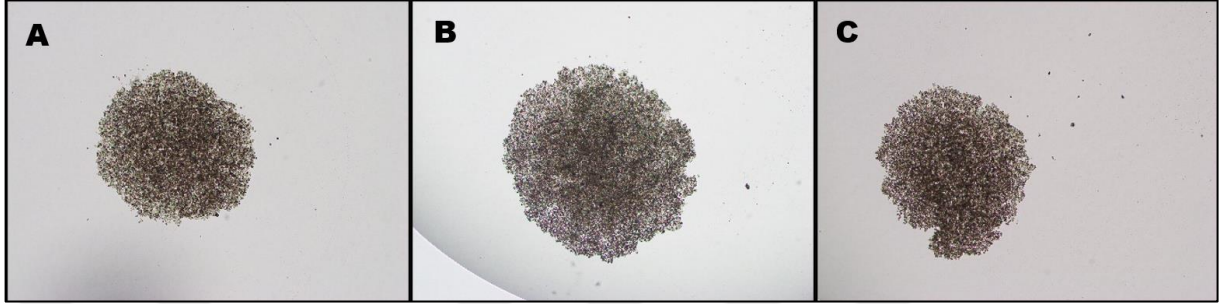
Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10µL hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde bir gece inkübasyondan sonra belirlenen damlacıklara 10µM etoposid ara stok dozuna sahip 10µL ilaç verilerek 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.



Şekil 4.66. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 10µM ara stok etoposid uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüleri.

- 50 μ M Vinkristin

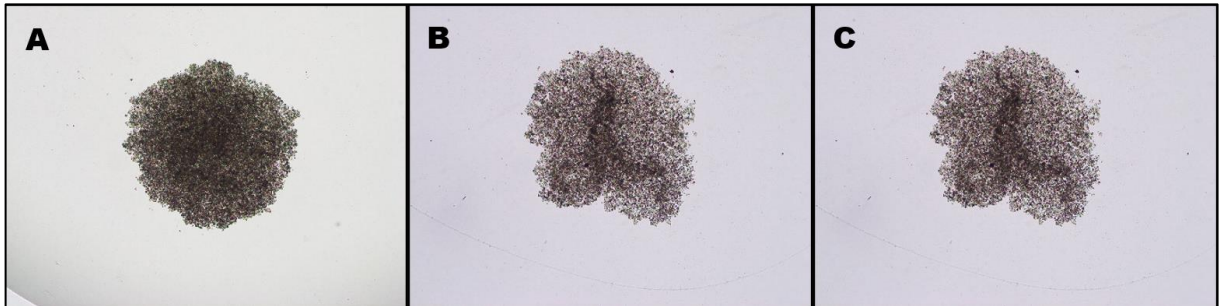
Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10 μ L hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde bir gece inkübasyondan sonra belirlenen damlacıklara 50 μ M vinkristin ara stok dozuna sahip 10 μ L ilaç verilerek 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.



Şekil 4.67. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 50 μ M ara stok vinkristin uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüleri.

- 100 μ M Vinkristin

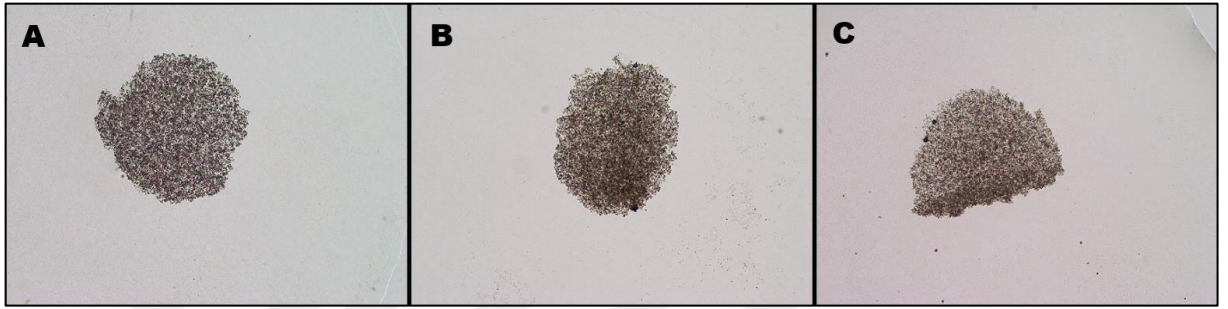
Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10 μ L hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde bir gece inkübasyondan sonra belirlenen damlacıklara 100 μ M vinkristin ara stok dozuna sahip 10 μ L ilaç verilerek 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.



Şekil 4.68. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 100 μ M ara stok etoposid uygulanmış halinin 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüleri.

- 5µM Etoposid + 50µM Vinkristin İlaç Kombinasyonunun Üç Boyutlu Geliştirilmesi Bulguları

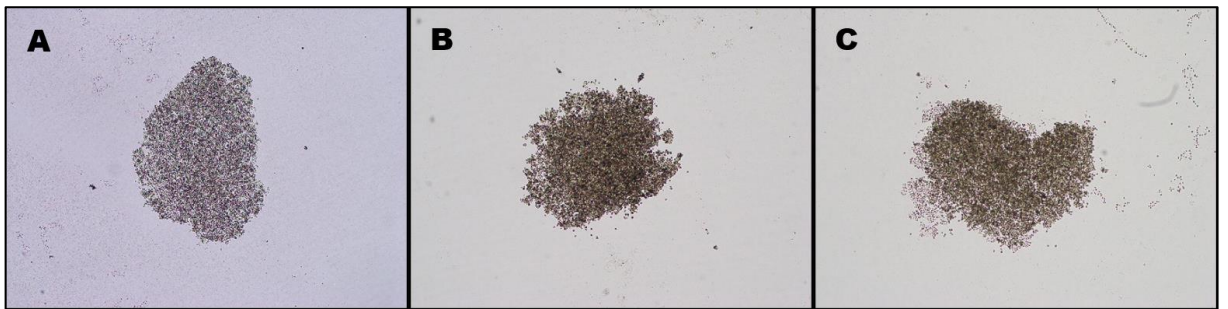
Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10µL hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde bir gece inkübasyondan sonra belirlenen damlacıklara 5µM etoposid + 50µM vinkristine ara stok dozlarına sahip 10µL ilaç kombinasyonundan verilerek 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.



Şekil 4.69. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 5µM etoposid ve 50µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonununun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüleri.

- 10µM Etoposid + 50µM Vinkristin İlaç Kombinasyonunun Üç Boyutlu Geliştirilmesi Bulguları

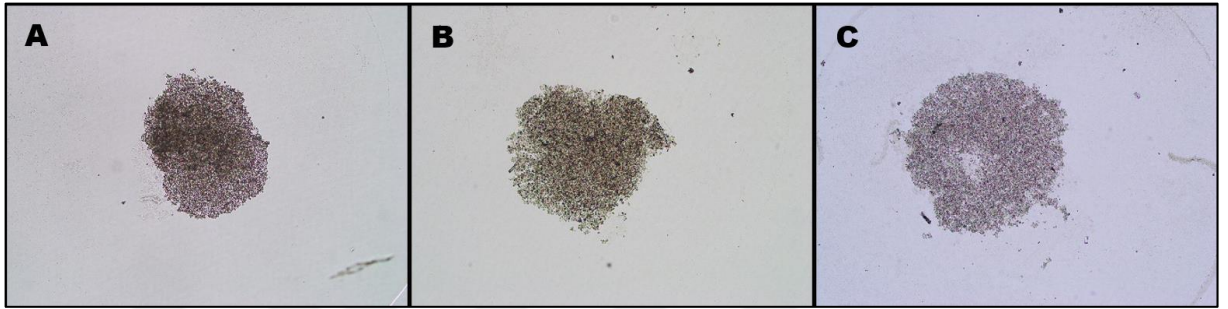
Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10µL hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde bir gece inkübasyondan sonra belirlenen damlacıklara 10µM etoposid + 50µM vinkristine ara stok dozlarına sahip 10µL ilaç kombinasyonundan verilerek 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.



Şekil 4.70. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 10µM etoposid ve 50µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonununun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüleri.

- 5 μ M Etoposid + 100 μ M Vinkristin İlaç Kombinasyonunun Üç Boyutlu Geliştirilmesi Bulguları

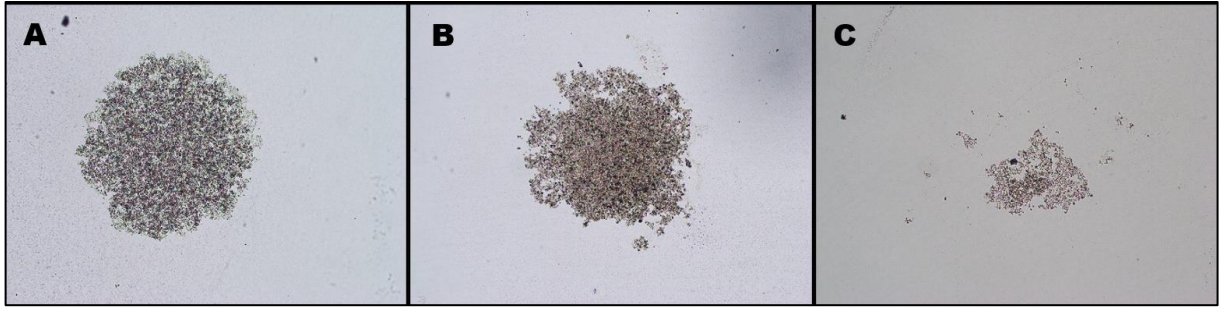
Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10 μ L hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde bir gece inkübasyondan sonra belirlenen damlacıklara 5 μ M etoposid + 100 μ M vinkristine ara stok dozlarına sahip 10 μ L ilaç kombinasyonundan verilerek 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.



Şekil 4.71 MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 5 μ M etoposid ve 100 μ M vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüleri.

- 10 μ M Etoposid + 100 μ M Vinkristin İlaç Kombinasyonunun Üç Boyutlu Geliştirilmesi Bulguları

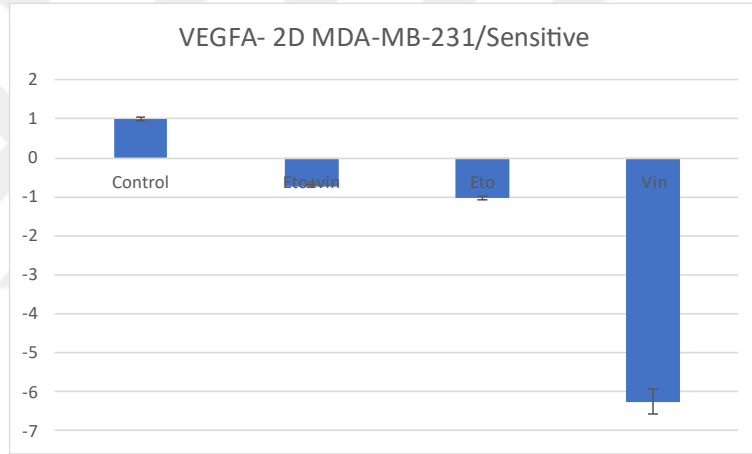
Hücreler flasktan pasajlanarak petri kaplarının kapakları ters çevrildi ve asılı damla yöntemi ile 10 μ L hücre ekimi gerçekleştirildi. Bunun akabinde bir gece inkübasyondan sonra belirlenen damlacıklara 10 μ M etoposid + 100 μ M vinkristine ara stok dozlarına sahip 10 μ L ilaç kombinasyonundan verilerek 24,48 ve 72.saat fotoğrafları alınmıştır.



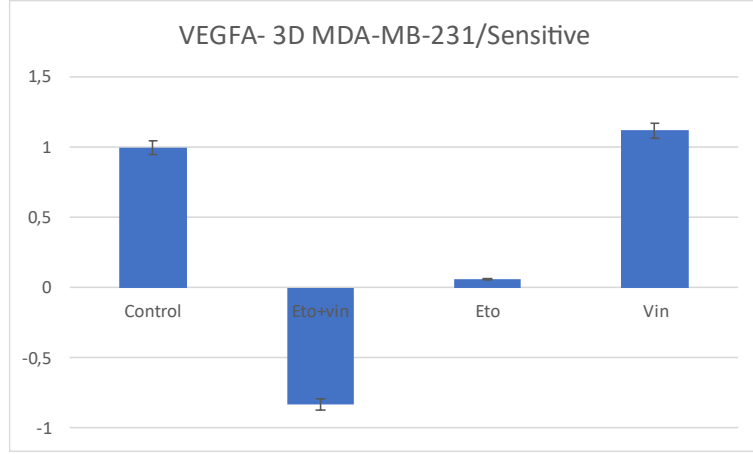
Şekil 4.72. MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında 10µM etoposid ve 100µM vinkristin ara stoklarına sahip ilaç kombinasyonunun 24.saat (A), 48.saat (B) ve 72.saat (C) üç boyutlu 4X mikroskop görüntüleri.

4.1.5 Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatları RT-PCR Bulguları

4.1.5.1. Duyarlı MDA-MB-231 Hücre Hattı RT-PCR Bulguları

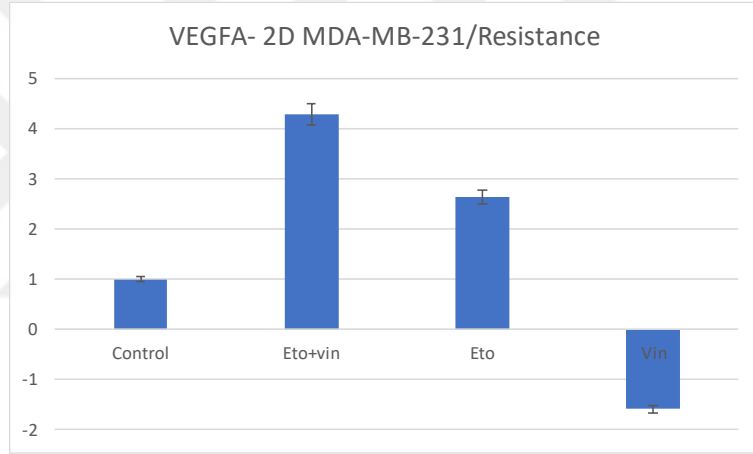


Şekil 4.73. 2 Boyutlu hücre hatlarından izole edilen cDNA'nın MDA-MB-231 hücre hattındaki RT-PCR *VEGF-A* geni ekspresyon değerleri.

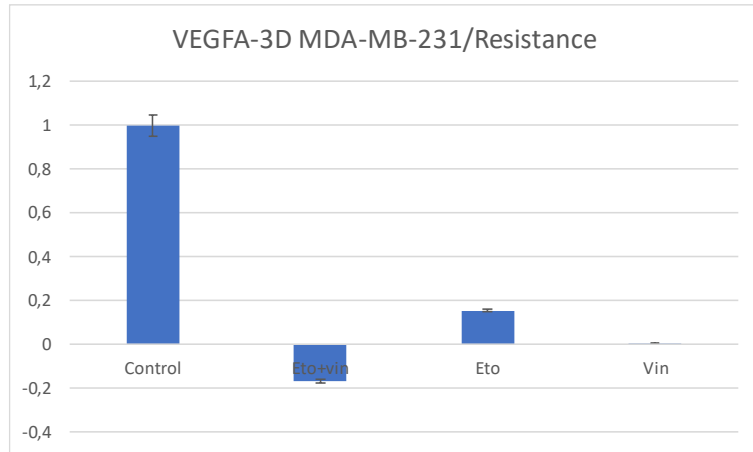


Şekil 4.74. 3 Boyutlu hücre hatlarından izole edilen cDNA'nın MDA-MB-231 hücre hattındaki RT-PCR *VEGF-A* geni ekspresyon değerleri.

4.1.5.2. Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hattı RT-PCR Bulguları

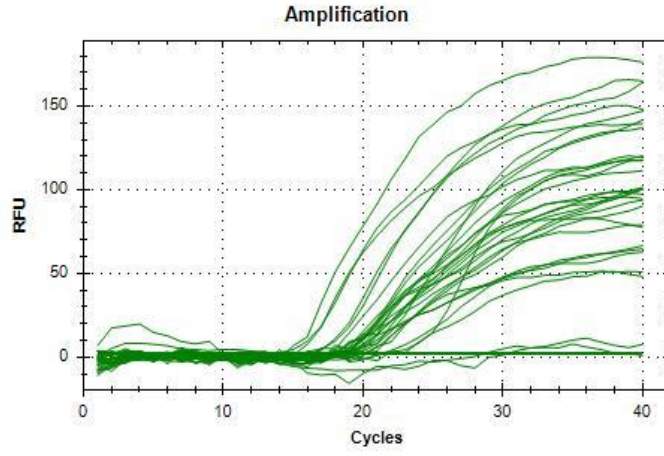


Şekil 4.75. 2 Boyutlu hücre hatlarından izole edilen cDNA'nın MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattındaki RT-PCR *VEGF-A* geni ekspresyon değerleri.

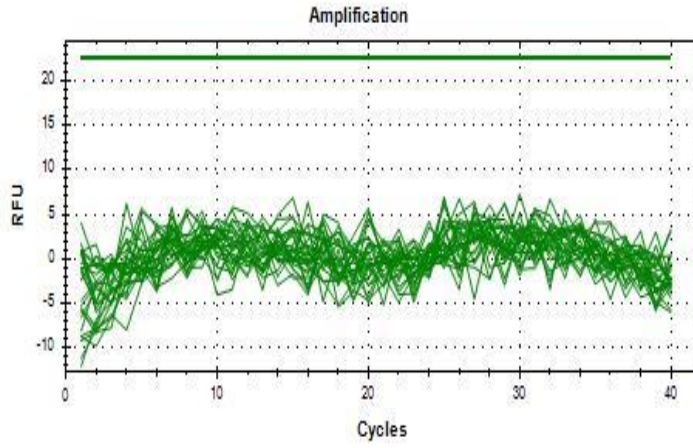


Şekil 4.76. 3 Boyutlu hücre hatlarından izole edilen cDNA'nın MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattındaki RT-PCR *VEGF-A* geni ekspresyon değerleri.

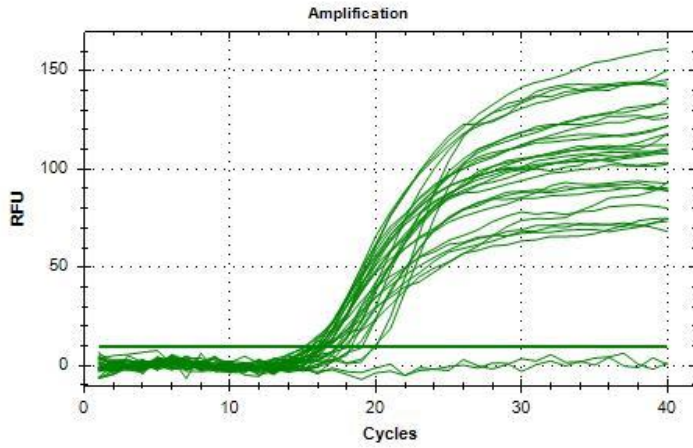
4.1.5.3. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarında β -Actin, MMP-2 ve VEGF-A Genlerinin RT-PCR Ekspresyon Bulguları



Şekil 4.77. β -Actin geninin RT-PCR ifadesinin sonuçları. β -Actin kontrol geni olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.78. MMP-2 geninin RT-PCR ifadesinin sonuçları.



Şekil 4.79. VEGF-A geninin RT-PCR ifadesinin sonuçları

4.2. Tartışma

Bu tez çalışması, etoposid ve vinkristin ilaçlarının, sisplatin dirençli ve duyarlı 2B ve 3B meme kanseri hücre hatlarına ayrı ayrı ve birlikte uygulandığındaki hücreler üzerinde sitotoksik, metastatik ve morfolojik sonuçlarını ortaya çıkarmıştır. MDA-MB-231 hücre hattı üçlü negatif meme kanseri hücrelerini temsil eden bir hücre hattı olarak tez çalışmasında seçildi. Meme kanserinin biyolojisini ve patolojisini daha iyi anlamak, bu kanser türünün mekanizmalarını keşfetmek ve potansiyel stratejileri geliştirmek için uygun bir seçenek olarak göz önüne alındı. Çünkü üçlü negatif meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231, hem östrojen reseptörü (*ER*) hem progesteron reseptörü (*PR*) hem de *HER2* gibi üç önem arz eden belirtecin eksik olduğu, bu yüzden bu reseptörlere dayalı tedavileri kabul etmeyen bir hücre hattıdır (Reyhanoğlu ve ark., 2022). Bunun yanı sıra ikincil olarak incelenen hücre hattı da MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattıdır. Bahsi geçen hücre hattı, MDA-MB-231 hücre hattına belirli ara dozlarda sisplatin ilacının verilmesi ile 333µM'lık dirençli hale getirilmiştir. Sisplatin, platin baz alınan bir ilaç olarak birçok kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Meme kanserinin mitotik aktivitesini hücrenin DNA'sına bağlanarak gerçekleştirmektedir. Yine de literatürde yer alan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara bakıldığında, MDA-MB-231 hücre hattı sisplatin tedavisine direnç gösterebileceği gözlemlenmiştir. Bu sayede hücreler artık sisplatin ilacına yanıt vermemekte ve morfolojik değişimleri bulunsada dahi metastaz yapmaya devam etmektedirler (Below ve ark., 2022).

Bugüne kadar yapılan klinik çalışmalarda sisplatin oldukça sıklıkla kullanılan bir ilaç olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan tez çalışmasında hücreler söz konusu ilaçla dirençli hale getirilmiş ve MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hatları üzerinde de etoposid ve vinkristin ilacı ayrı ayrı ve birlikte uygulanmıştır. Elde edilen bulgulara göre, duyarlı MDA-MB-231 ve ilaç dirençli hücre hatlarında farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Tez çalışması için seçilen iki farklı ilaç bulunmaktadır; birincisi etoposid, ikincisi ise vinkristindir. Etoposid VP-16 olarak bilinen ve yarı sentetik bir glikoizid türevi olarak kliniklerde yaygın kullanılan bir ilaçtır (Stalder ve ark., 2023). DNA'ya bağlanmakta daha sonrasında DNA zincirlerinin kopmasını sağlayarak hücreyi apoptoza sürüklemektedir. Vinkristin ilacı ise, hücreleri kontrol eden mikrotübüllerin bir parçası olan mitotik ipleri hedef alan bir ilaç grubudur. Mikrotübül polimerizasyonunu engelleyerek mitozun ilerlemesini durdurmakta ve metastazı inhibe etmektedir (Arora ve ark., 2022).

Çalıştığımız hücre hatlarının aksine vinkristin lösemi, lenfoma ve bazı solid tümör tedavilerinde kullanılmaktadır. Bu da tez çalışmasının özgünlüğünü ortaya koyabilmek için önem arz etmektedir. Duyarlı MDA-MB-231 ve MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücrelerde etoposid ve vinkristin bu hücrelere hem ayrı ayrı hem de birlikte uygulanmıştır.

Şekil 4.2. ve **Şekil 4.10'**dan yola çıkılarak sitotoksosite analizlerine bakıldığında, etoposid kendi başına en küçük ara dozu olan 5µM'da dahi duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücre hattının metastaz yeteneğini kısıtlıyordu. Zhang ve arkadaşlarının 2017 yılında yürüttükleri çalışmada, duyarlı MDA-MB-231 hücre hattına 25,50,75 ve 100µM etoposid uygulanmıştır (Zhang ve ark., 2017). Bu tezde yürütülen deneylerde, 5µM ve 10µM ara stok doza sahip etoposid ilacının hücrede mitotik etkiyi azalttığı ve ilaç dozunun artırılmasına gerek olmadığı gözlemlendi. Her iki hücre hattı da ekstraselüler matriks (ECM) adı verilen ve meme kanseri hücrelerinin çevresinde bulunan kompleks yapıya sahip olduğundan, bu yapı hücrelerin buldukları lokasyona tutunmalarını ve metastatik aktivitelerini devam ettirebilmelerini sağlamak için işlev görmesini sağlamaktadır. Ancak sitotoksosite deneylerinde etoposidin 24.saatinden itibaren uygulanan her iki dozunun (5µM ve 10µM), iki hücre hattı içinde ekstraselüler matriks yapısının degradasyonunu sağlayarak hücre-hücre, hücre-doku etkileşimini azalttığı gözlemlendi. Bu da ilacın hücrelerin buldukları yüzeyden ayrılmasına, mitotik aktivitelerinin etkilenecek hücrelerin büyümesini inhibe etmesine olanak sağlamıştır (Stalder ve ark., 2023).

Wawruzsak ve arkadaşlarının 2015'te yürüttüğü bir çalışmada vinkristin, duyarlı MDA-MB-231 hücre hatlarına 100µM'lık konsantrasyon ile verilmiştir (Wawruzsak ve ark., 2015). Çalışmadan referans alınan değerler ile tezde, hücreler 50µM ve 100µM ara stoklarda vinkristin ilacına maruz bırakıldı. Ancak, vinkristinin iki farklı dozunda da hücreler çoğalmaya devam ettiler. Vinkristin, etoposid ilacından farklı olarak hücrelerin doğrudan ölmesini değil, morfolojik değişimlerine neden olduğu görüldü. Hem duyarlı hem de dirençli MDA-MB-231 hücre hattının sitotoksik analiz sonuçlarına bakıldığında, kontrol gruplarındaki uzayan kollara sahip hücrelerin aksine (*bkz.* **Şekil 4.1.** ve **Şekil 4.10**) ilaca maruz kalan hücreler dairesel hale geldiler (*bkz.* **Şekil 4.4.** ve **Şekil 4.13**) ve bazıları bulunduğu yüzeyden ayrıldı. Yine de karşılaştırmalı olarak incelenmesi gerekirse vinkristin 100µM ara stoğa maruz kalmış MDA-B-231/sisplatin dirençli hücreler (*bkz.* **Şekil 4.14.**), duyarlı MDMB-231 hücre hattına göre daha yoğun inhibisyona uğramıştır (*bkz.* **Şekil 4.5.**).

Etoposid ilacında hücreler tamamen buldukları kuyucuğun içerisindeki mediyuma dağılırken; vinkristin uygulanan hücreler buldukları yerde ekstraselüler matriks tabakayı degrade ederek mediyum içerisinde dağılmak yerine topluluk halinde yapışık olmayan bir vaziyette lokasyonlarına yakın yerlerde kalmışlardır. Dirençli hücre hattının sitotoksisite analizi 100µM ara stok 72.saat sonuçlarına bakıldığında bu açıkça görülmektedir. Yine de bu durum içerisinde 72 saat ilaca maruz bırakılan hücrelerin mediyum içerisindeki besini tüketmesi, metastatik etkisini yavaşlatmış ve ilacın sitotoksik etkisine neden olmuştur.

İlaç kombinasyonları sitotoksisite analizinde hücreleri apoptoza yönlendirmeye dayalı olumlu sonuçlar ortaya çıkardı. 5µM etoposid ve 50µM vinkristin ilaç kombinasyonunun 24.saatinden 72.saatine kadar olan süreçte (bkz. **Şekil 4.6.** ve **Şekil 4.15.**) her iki hücre hattı için hücre ölümü gerçekleşmeye başladığı görülmüştür. Etoposid, vinkristinden farklı olarak uygulandığı bölgeye doğrudan etki ettiğinden; en düşük doz kombinasyonundaki duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücre hattı 24.saat fotoğraflarına bakıldığında belirli bir bölgede hücrelerin bulunmadığı, ECM yapının parçalanarak hücrelerin bulunduğu bölgeden ayrıldıkları gözlemlendi. Bunun yanı sıra ilacın doğrudan etki ettiği çevrede yakın bulunan hücrelerin metastaz yeteneklerinin azaldığı, büyüme fazının yavaşladığı görüldü (bkz. **Şekil 4.2** ve **Şekil 4.11**). Böylece vinkristinin kendi başına olan etkisinin etoposidin sağladığı toksik etki kadar büyük olmasa da kombinasyon halinde etoposidin etkisini artırdığı belirlenmiştir.

İlaç kombinasyonunda metastazı yavaşlatan ve hücreler üzerinde sititoksisitenin arttığı en iyi dozun 5µM etoposid ve 100µM vinkristin ilaç kombinasyonu olduğu belirlenmiştir. Literatürde yer alan çalışmalarda etoposid ve vinkristinin sinerjistik olarak uyduğu da eblirtilmiştir (Thomas ve ark., 1994). Ancak yapılan analizlerdeki kombinasyon dozlar, bu hücre hatları üzerinde daha öncesinde *in vitro* olarak literatürde yer almamıştır. Böylece yapılan çalışmadaki bulgular, etoposid ilacının en düşük ve vinkristin dozunun en yüksek kombinasyonun hücre üzerine olan etkilerini belirli bir düzeyde baskıladığını ortaya koydu. Yapılan sitotoksisite, migrasyon ve invazyon deneylerinde bu açıkça gözlemlenmektedir.

Motilite deneyinde hem duyarlı hem de dirençli hücre hatlarında açılan yaralarında, vinkristin ilacının hücre metastazını tamamen engelleyemediği ve yaranın 72.saatte dahi kapanması için sağlıklı kanser hücrelerine sahip olduğu gözlemlendi (bkz. **Şekil 4.22.** ve **Şekil 4.31.**).

Etoposid için en düşük doz migrasyonda çalışma için olumlu sonuç verirken; vinkristinin en güçlü dozunun bir yandan hücreleri apoptoza teşvik etti ve diğer ilaca nazaran mitotik aktivitedeki degradasyonda hedeflenen letaliteyi sağlayamadı. İlaç kombinasyonları incelendiğinde; duyarlı hücre hattı için 10µM etoposid ve 50µM vinkristin kombinasyonunun 72.saatinde yaranın kapanmadığı, kanser hücrelerinin öldüğü gözlemlendi (bkz. **Şekil 4.25.**). Dirençli hücre hatlarında farklı olarak duyarlıda belirlenen doz yerine, 5µM etoposid ve 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu hücre ölümünü hedeflediği biçimde sağlamıştır (bkz. **Şekil 4.33.**). Direnç kazanan hücre hatlarında yaranın iyileşmesi daha zor hale geldi ve dirençsiz hücre hattına göre ilaç doz seviyesi daha düşük dozda etki etmiştir. Sisplatin ilacının etki mekanizması, kombinasyon ilaç yapısını motilite deneyinde desteklediği gözlemlenmiştir.

İnvazyon deneyinde, her iki hücre hattında da etoposidin en düşük dozda (5µM) dahi hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdiği ve en iyi ilaç kombinasyonu dozunun 10µM etoposid ve 100µM vinkristinde olduğu tespit edilmiştir (bkz. **Şekil 4.45.** ve **Şekil 4.54.**). Ancak ayrı ayrı ilaçlar incelendiğinde duyarlı hücre hattının 100µM vinkristin uygulanan hücreler daha yavaş çoğalırken (bkz. **Şekil 4.41.**); dirençli hücre hattında kazanılan dirençten dolayı hücrelerin daha fazla çoğaldığı ve hücrelerin 24.saatte buldukları yüzeyi kapladığı ve 72.saate ise ölümlerinin gerçekleştiği belirlendi (bkz. **Şekil 4.50.**). Bunun sonucunda, etoposid etkisini duyarlı hücre hattında hızlı bir şekilde gösterirken; vinkristin ilacının sitotoksik etkisini bu hücre hattında daha uzun bir sürede gösterdi.

Duyarlı ve dirençli hücre hatları 3 boyutlu olarak geliştirildikten ve ilaçların hem ayrı hem kombinasyon olarak uygulanmasının ardından elde edilen sonuçlarda, duyarlı hücre hattında ilaç kombinasyonları dirençlilere göre daha çok etkilendiği belirlenmiştir. Dirençli hücre hatlarında, hücrelerin bir topluluk halinde diğer hücre hattına göre ilaçlardan daha az etkilendiği gözlemlendi. MDA-MB-231 hücre hattının 3 boyutlu hücrelerinde en düşük dozlarda ayrı ayrı her iki ilaçta hücre yapısının bozulmasına neden olurken; dirençli hücre hattında 10µM etoposid ancak 72.saatte istenilen sonucu verdiği belirlenmiştir (bkz. **Şekil 4.66.**). Duyarlı hücre hattından 50µM vinkristin ilacı 24.saatten itibaren hücre yapısını bozmaya başlarken (bkz. **Şekil 4.58.**); dirençli hücre hattında her iki vinkristin dozu da 3 boyutlu hücreler üzerinde etkili olamamıştır (bkz. **Şekil 4.67.** ve **Şekil 4.68.**). Duyarlı hücre hattına uygulanan 5µM etoposid ve 50µM vinkristin ilaç kombinasyonu (bkz. **Şekil 4.60.**)

24 saat itibariyle hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterirken, aynı durum dirençli hücre hattı için 10 μ M etoposid ve 100 μ M vinkristin ilaç kombinasyonu uygulanmasının ardından da gözlemlendi (bkz. **Şekil 4.72**). Duyarlı meme kanseri hücrelerinde ilaçlar dirençli meme kanseri hücrelerine göre daha yoğun etki gösterdi. **Literatür taraması yapıldığında, duyarlı ve dirençli hücre hatlarının üç boyutlu geliştirerek aynı veya benzer ilaç kombinasyonlarının verildiği başka bir çalışma bulunamadı.** Yapılan deneyde ilaçların hem ayrı hemde birlikte uygulama sonucu duyarlı meme kanseri hücre hattında apoptotik etkileri gözlemlendi. Bunun yanı sıra dirençli hücre modellerinde bu durumun gerçekleşmemesi, hücrenin kazandığı ilaç direncine ve morfolojisinin farklılaşmasına bağlı olarak değişmiş olabileceği öngörüldü.

Duyarlı hücre hatlarında, RT-PCR sonuçlarına bakıldığında, etoposid ve vinkristin ilaçları birlikte verildiğinde *VEGF-A* gen ifade düzeyinin 3B hücre modellerinde, 2B hücrelere göre daha fazla azaldığı görülmektedir (bkz. **Şekil 4.73**).

Dirençli hücre hatlarında ise etoposid ve vinkristin ilaçları birlikte verildiğinde *VEGF-A* gen ifade düzeyinin 2B hücre hattında yukarı düzeyde ifade edildiği, 3B hücre modellerinde ise aşağı ifade edildiği görülmektedir.

İki boyutlu ve üç boyutlu duyarlı hücre hatları karşılaştırıldığında (bkz. **Şekil 4.73** ve **Şekil 4.75**), ilaç kombinasyonu üç boyutlularda *VEGF-A* gen ifade düzeyinin arttığı ancak 2B hücrelerde gen ifade düzeyinin azaldığı görülmektedir. Tez içerisinde yapılan diğer çalışmalarda 3B hücre modellerine verilen dozların hücreler üzerinde etkisi görülsede moleküler düzeyde gen ifade düzeyinin baskılanmasına yetmediği görülmektedir.

Ayrıca tez çalışmasında gen ifade düzeyinin belirlenmesi için uygulanan tek zaman aralığının çalışılması da ekspresyon değişikliğinin kaçırılmasına neden olabileceği düşünülmektedir.

İki boyutlu ve üç boyutlu dirençli hücre hatları karşılaştırıldığında ise (bkz. **Şekil 4.74** ve **Şekil 4.76**), ilaç kombinasyonu üç boyutlularda *VEGF-A* gen ifade düzeyinin iki hücre modelinde azaldığı görülmektedir. Ancak dirençli hücre modellerinde bu azalmanın daha az olduğu göstermektedir. Sonuçlar karşılaştırıldığında, daha invaziv olan dirençli hücre hatlarında hücre sürekli direnç kazandığı için gen ifade düzeyinin 2 ve 3 boyutlu yapılarda farklılık göstermesine neden olmuştur. Bu yüzden mekanizmaları benzeyen bu ilaçlar her iki boyutta hücre hatlarında farklı sonuçlar ortaya koyarak duyarlı ve dirençli hücre hatlarındaki sonuçları etkilemiş olabileceği varsayılabilir.

İleriki çalışmalarda farklı genler üzerinde farklı dozların farklı zaman aralıklarında çalışılması oluşturulacak tedavinin en etkin optimum sonuca ulaştırılması için önem arz etmektedir. Bu bulgular, daha sonra gerçekleştirilecek çalışmalara referans niteliği taşımaktadır.





5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak tez çalışmaları, MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde gerçekleştirilmiş olup, etoposid ve vinkristin ilaçlarının ayrı ayrı ve kombinasyon halinde meme kanseri hücrelerine etkisini incelemiştir.

Mahdie ve arkadaşlarının 2021’de yürüttüğü bir çalışmada benzer olarak ilaç kombinasyonları denenmiş ve bu kombinasyonlar silibin ve etoposid ilaçlarının bileşimini içermiştir. Ancak 2021’de yürütülen bu çalışmada başlanan doz etoposid ara stoğu için 25µM olarak belirlenmişti. Bunun akabinde MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde yürüttükleri deneylerde yüksek doz etoposid kullanımının diğer ilaç üzerinde daha ağır bir etki yarattığı ve hücreleri apoptoza sürüklemenin yanı sıra toksisitesinin yüksek olduğu gözlemlendi (Koushki ve ark., 2021). Böylece Mahdie ve arkadaşları doz düşürme yöntemine başvurarak MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 5µM’lık ara stoğa sahip bir etoposid kullanmaya karar vermişlerdir. Tezde yapılan çalışma bu çalışmaya kıyasla şunu göstermektedir ki, her ne kadar *in vitro* çalışma gerçekleşmiş olsa da tezin asıl amacı *in vivo* olarak uygulanabilecek yeni bir tedaviyi oluşturmaktır. Fazla doz ilaç verilmesi meme kanseri hücrelerini pekâlâ öldürebilirken; *in vivo* şartlarda sağlıklı normal hücrelerde de toksisite yayabilir ve bu da istenilmeyen yan etkilere yol açabilir. Bu amaçla tezde sadece istenilen hücre yapılarını öldürmeye yönelik doz belirlenmiş, 33.978µM ana stoğuna sahip güçlü bir ilaç olan etoposidin fazla dozda zararlı bir etkisi olabileceği araştırılarak deneyler buna göre gerçekleştirilmiştir. Tezdeki her iki etoposid dozu da hücreleri apoptoza götürmüş ancak vinkristin bu etoposid etkisini sinerjistik olarak artırmıştır.

Zhang ve arkadaşlarının 2017’de yaptığı bir çalışmada etoposid ilacının *BRCA1* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin gözlemlenmesi için *in situ* nick-translasyon apoptoz testi gerçekleştirilmiştir (Zhang ve ark., 2017). Ancak etoposidin uygun dozlarda mutasyona uğramamış *BRCA1* ekspresyonunu artırmasına rağmen yüksek dozda kullanımının fazla *BRCA1* ekspresyonuna neden olduğuna ve sitoplazmik lekelenmeleri sağladığına kanaat getirilmiştir. Duyarlı MDA-MB-231 hücre hattında uygulanan deneyler, tezde kullanılan dozların ideal olduğunu ve ileriye yönelik bir perspektif olarak baktığımızda kullanılan etoposid dozlarının *in vivo* çalışmalar için ideal olabileceğini vurgulamaktadır.

Skubnik ve arkadaşlarının 2021 yılında yürüttüğü başka bir çalışma ise pediatrik kanserde vinkristin ilacının farklı ilaçlarla kombine edilmesine dayalıdır. Bu yürütülen çalışmada vinkristinin yanı sıra doksorubisin, prednizon, siklofosfamid gibi ilaçlarla kombinasyonlar in vivo olarak denenmiş ve vinkristinin kanser hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Skubnik ve ark., 2021). Yine de denenilen kombinasyonlara rağmen ilacın yerine kullanılabilir bir muadili ya da lenfoma da daha etkili farklı bir kombinasyon türünün oluşturulduğu bu çalışma için söylenemez. Vinkristin, meme kanseri araştırmalarında çok fazla kullanılan bir ilaç olmamasıyla beraber MDA-MB-231 ve MDA-MB-231/Sisplatin hücre hattındaki uygulanan ayrı ve kombinasyon dozları bizlere gelecek için bir ön nitelik oluşturmaktadır. Daha çok lenf kanserinde kullanılan bu ilaç, meme kanserinde de önemli etkiler gösterebilmektedir. Bu her iki hücre hattının sitotoksikite analiz sonucunun 100µM 72.saatinde görülebilmektedir.

MDA-MB-231 hücre hattı, üçlü negatif meme kanseri hücrelerini temsil eden bir hücre hattıdır. Bu hücre hattı, östrojen reseptörü (*ER*), progesteron reseptörü (*PR*) ve *HER2* gibi üç önemli belirtecin eksik olduğu bir kanser hücre hattıdır. Bu yüzden bu hücre hattı, bu belirteçlere dayalı tedavilere yanıt vermeyen bir hücre hattıdır.

Ayrıca, tez çalışmasında MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattı da incelenmiştir. Bu hücre hattı, MDA-MB-231 hücre hattına belirli dozlarda sisplatin ilacı verilerek dirençli hale getirilmiştir. Sisplatin, meme kanserinin tedavisinde kullanılan ilaçlardan biridir, ancak bazı durumlarda hücreler bu ilaca direnç geliştirebilir.

Çalışmada etoposid ve vinkristin adlı iki farklı ilaç kullanılmıştır. Etoposid, kliniklerde yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır ve DNA'ya bağlanarak hücreleri apoptoza sürükler. Vinkristin ise mitotik iplikleri hedef alan bir ilaçtır.

Tez çalışmasında yapılan sitotoksikite analizleri sonuçlarına göre, etoposid MDA-MB-231 ve MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattının metastaz yeteneğini azaltmıştır. Etoposid, hücrelerin ekstraselüler matriks yapısını degradasyona uğratarak hücre-hücre ve hücre-doku etkileşimini azaltmıştır.

Bunun yanında, vinkristin ilacının hücrelerin metastaz yeteneğini tamamen engellemediği ancak hücrelerin morfolojisini değiştirdiği gözlemlenmiştir. Vinkristin, hücreleri dairesel hale getirmiş ve bazı hücrelerin buldukları yüzeyden ayrılmasını sağlamıştır.

Etoposid ve vinkristin birlikte hücrelere uygulandığında ise sitotoksik etkinin yüksek olduğu görülmüştür. Bu kombinasyon, ilaçların birbirlerinin etkilerini baskılamadığını göstermektedir.

Migrasyon deneyleri, vinkristin ilacının hücre metastazını tamamen engelleyemediğini ve hücrelerin yaraların kapanması için sağlıklı kanser hücrelerine sahip olduğunu göstermiştir. Etoposid ve vinkristin ilaç kombinasyonu ise yaraların kapanmasını engellemiştir.

İnvazyon deneyleri, etoposid ve vinkristin ilaç kombinasyonunun, ayrı ayrı ilaç uygulanmalarına nazaran degradasyonda daha etkili olduğunu göstermiştir. Bu kombinasyon, hücrelerin apoptoza yönlendirilmesini sağlamıştır.

RT-PCR sonuçlarına bakıldığında, ilaçların birlikte verilmesi *VEGF-A* geninin aşağı regülasyonunu sağlamıştır. Ancak sisplatin dirençli hücre hatlarında ilaçların etki mekanizmaları değiştiği görülmektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması etoposid ve vinkristin ilaçlarının meme kanseri hücre hatları üzerindeki etkilerini ortaya koymaktadır. Özetlemek gerekirse, bu tez çalışması MDA-MB-231 ve MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hatlarında etoposid ve vinkristin ilaçlarının ayrı ayrı ve kombinasyon halinde kullanılmasının sitotoksik, metastatik ve morfolojik sonuçlarını araştırmıştır.

Sonuçlara göre, MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hattında direnç kazanan hücrelerin ilaca daha az yanıt verdiği ve metastaz yeteneklerinin devam ettiği gözlemlenmiştir.

İlaç kombinasyonları sitotoksite analizi için olumlu sonuçlar vermiştir. Etoposid ve vinkristin kombinasyonu, hücre ölümünü artırmış ve metastazı engellemiştir. Bununla birlikte, ilaçların birbirlerinin etkisini baskılamadığı ve sinerjistik bir etki gösterdiği görülmüştür.

Ayrıca, gen ekspresyon analizleri sonucunda ilaçların *VEGF-A* geninin ifadesi üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. İlaç kombinasyonu, *VEGF-A* geninin aşağı regülasyonunu sağlamış ve tümör anjiyogenezini etkilemiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması etoposid ve vinkristin ilaçlarının ayrı ayrı ve birlikte verildiğinde MDA-MB-231 ve MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hatlarında meme kanseri hücrelerine etkilerini incelemiştir. Elde edilen bulgular, bu ilaçların birlikte potansiyel olarak meme kanseri tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak, daha fazla çalışma yapılması ve klinik deneylerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışmasına ön bir nitelik kazandıran bir çalışma ise Thomas ve arkadaşları tarafından 1994 yılında etoposid ve vinkristin ilaçlarının kombinasyon halinde *in vivo* uygulanmasına dayanmaktadır (Thomas ve ark., 1994). Vinkristin ve etoposidin birbirine sinerjistik olduğunu belirten çalışma önce radyasyon sonra ise kemoterapi alınmasının ardından 3 haftalık ara ile hasta bireylere uygulanmıştır. Faz II noktasına kadar gelen bu çalışmada hastalarda bulantı ve kusma gibi ilaç yan etkilerinin gelişmesi, tedavi süresince ilaç kombinasyonunun olumlu yönde meme kanserine etki etmesine rağmen hastalara uygulanan dozların ağır olması sebebiyle nörolojik toksisite sorunu ortaya çıkmıştır. Ancak buradaki çalışmanın en büyük sorunu *in vitro* olarak hücreler belirlenmeden ve o dönemin şartlarına göre teknolojinin zayıf kalmasıyla ilaçların direkt hastalara uygulanmasındaki sıkıntıdan kaynaklanmaktadır. Hücrelerin gen dizilimi, ekspresyon düzeyi ve hangi tip meme kanseri ile çalışıldığı tam olarak bilinmeden çalışmanın yürütülmesi faz II aşamasında durmasına sebep olmuştur.

Günümüz teknolojisinin sürekli gelişmesi ve laboratuvar çalışmalarının büyük bir sıklığa kavuşmasıyla bu tez, 1994 yılında Thomas ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmadan daha nitelikli olarak hangi hücre hattı üzerinde hangi ilaç kombinasyon dozunun daha etkili olacağını ve hücre morfolojisini, sitotoksitesini, proliferasyonunu literatüre sunmaktadır. Yürütülen tezin önceden gerçekleştirilen çalışmalardan farklı olarak MDA-MB-231/Sisplatin dirençli hücre hatları üzerinde denenmesi, ilaç kombinasyonunun sinerjistik olduğunun hücrelerde yarattığı etkinin gözlemlenmesi ve duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hatlarının her ikisinde de aynı anda çalışılmasından kaynaklı özgün bir nitelik kazandırmaktadır. Bu tez bu kapsamda *in vivo* çalışmalar için bir öncül olma ve farklı kombinasyon tedavilerinin oluşturulmasına yeni bir perspektif sunmaktadır.

6. KAYNAKÇA

Upadhyay A. (2020). Cancer: An unknown territory; rethinking before going ahead. *Genes & diseases*, 8(5), 655–661.

National Institutes of Health (US); Biological Sciences Curriculum Study. NIH Curriculum Supplement Series [Internet]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); 2007. Understanding Cancer.

Torre, L. A., Islami, F., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2017). Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 26(4), 444–457.

JoEllen Welsh, Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer, *Animal Models for the Study of Human Disease*, 2013, Pages 997-1018

Reyhanoglu G, Tadi P. Etoposid. [Updated 2022 Jul 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-.

Below J, M Das J. Vinkristin. [Updated 2022 Jul 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan.

Hausman D. M. (2019). What Is Cancer?. *Perspectives in biology and medicine*, 62(4), 778–784.

Mercadante AA, Kasi A. Genetics, Cancer Cell Cycle Phases. [Updated 2022 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-.

<https://gco.iarc.fr/today/>

Skuse A. Constructions of Cancer in Early Modern England: Ravenous Natures [Internet]. London (UK): Palgrave Macmillan; 2015. Chapter 1, What Was Cancer? Definition, Diagnosis and Cause.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 24.2, Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes

Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*, 5(2), 77–106.

Zhang, X., Hofmann, S., Harbeck, N., Jeschke, U., & Sixou, S. (2017). Impact of Etoposid on BRCA1 Expression in Various Breast Cancer Cell Lines. *Drugs in R&D*, 17(4), 569–583.

Yu, X., Xu, T., Su, B., Zhou, J., Xu, B., Zhang, Y., Zhu, Y., Jiang, N., & He, Z. (2023). The novel role of etoposide in inhibiting the migration and proliferation of small cell lung cancer and breast cancer via targeting Daam1. *Biochemical pharmacology*, 210, 115468.

Park, M., Kim, D., Ko, S., Kim, A., Mo, K., & Yoon, H. (2022). Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *International journal of molecular sciences*, 23(12), 6806.

Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 28.

Orrantia-Borunda E, Acuña-Aguilar LE, Ramírez-Valdespino CA. Nanomaterials for Breast Cancer. In: Mayrovitz HN, editor. *Breast Cancer* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022 Aug 6. Chapter 10.

Smolarz, B., Nowak, A. Z., & Romanowicz, H. (2022). Breast Cancer- Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers*, 14(10), 2569.

Tufail, M., Cui, J., & Wu, C. (2022). Breast cancer: molecular mechanisms of underlying resistance and therapeutic approaches. *American journal of cancer research*, 12(7), 2920–2949.

Casaubon JT, Kashyap S, Regan JP. BRCA 1 and 2. [Updated 2020 Sep 23]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-.

Mehrgou, A., & Akouchekian, M. (2016). The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*, 30, 369.

Maani EV, Maani CV. Radiation Therapy. [Updated 2022 Oct 24]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-.

Kurt, B., & Kapucu, S. (2018). The effect of relaxation exercises on symptom severity in patients with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy: An open label non-randomized controlled clinical trial. *European Journal of Integrative Medicine*, 22, 54-61.

Nurgali, K., Jagoe, R. T., & Abalo, R. (2018). Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae?. *Frontiers in pharmacology*, 9, 245.

Ramirez, L. Y., Huestis, S. E., Yap, T. Y., Zyzanski, S., Drotar, D., & Kodish, E. (2009). Potential chemotherapy side effects: what do oncologists tell parents?. *Pediatric blood & cancer*, 52(4), 497–502.

Ertem, G., Kalkım, A., Bulut, S., & Sevil, Ü. (2009). Radyoterapi alan hastaların evde bakım gereksinimleri ve yaşam kaliteleri.

Akdemir, N., & Birol, L. (2004). İç Hastalıkları ve Hemşirelik Bakımı, Genişletilmiş 2. Baskı, Sistem Ofset, Ankara, 194-199.

Alkabban FM, Ferguson T. Breast Cancer. [Updated 2022 Sep 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-.

Martin TA, Ye L, Sanders AJ, et al. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013.

Luo, A., Xu, Y., Li, S., Bao, J., Lü, J., Ding, N., Zhao, Q., Fu, Y., Liu, F., Cho, W. C., Wei, X., Wang, H., & Yu, Z. (2020). Cancer stem cell property and gene signature in bone-metastatic Breast Cancer cells. *International journal of biological sciences*, 16(14), 2580–2594.

Montecucco, A., Zanetta, F., & Biamonti, G. (2015). Molecular mechanisms of etoposid. *EXCLI journal*, 14, 95–108.

Baldwin, E. L., & Osheroff, N. (2005). Etoposid, topoisomerase II and cancer. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents*, 5(4), 363–372.

Mohammadgholi, A., Rabbani-Chadegani, A., & Fallah, S. (2013). Mechanism of the interaction of plant alkaloid vincristine with DNA and chromatin: spectroscopic study. *DNA and cell biology*, 32(5), 228–235.

Škubník, J., Pavlíčková, V. S., Ruml, T., & Rimpelová, S. (2021). Vinkristin in Combination Therapy of Cancer: Emerging Trends in Clinics. *Biology*, 10(9), 849.

Zhou X, Xu Z, Li A, Zhang Z, Xu S. Double-sides sticking mechanism of vinblastine interacting with α,β -tubulin to get activity against cancer cells. *J Biomol Struct Dyn*. 2019 Sep;37(15):4080-4091.

Kwist, K., Bridges, W. C., & Burg, K. J. (2016). The effect of cell passage number on osteogenic and adipogenic characteristics of D1 cells. *Cytotechnology*, 68(4), 1661–1667.

Freshney, R.I., 1987, *Culture Of Animal Cells: A Manual Of Basic Technique*, Wiley Blackwell, New York, Isbn-10: 9780470528129.

Strober W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology*, 111, A3.B.1–A3.B.3.

Serap Y., *Hücre Kültürü Güz Dönemi Lisans Ders Notları Slayt 11* (2019), Sayfa (6).

Riss T, Niles A, Moravec R, et al. Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. 2019 May 1. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-.

Wells, A., Grahovac, J., Wheeler, S., Ma, B., & Lauffenburger, D. (2013). Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis. *Trends in pharmacological sciences*, 34(5), 283–289.

Barcia J. J. (2007). The Giemsa stain: its history and applications. *International journal of surgical pathology*, 15(3), 292–296.

Lv, D., Hu, Z., Lu, L., Lu, H., & Xu, X. (2017). Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncology letters*, 14(6), 6999–7010.

Samadani, A. A., Nikbakhsh, N., Fattahi, S., Pourbagher, R., Aghajanzadeh, S., Mousavi Kani, N., Abedian, Z., & Akhavan-Niaki, H. (2015). RNA Extraction from Animal and Human's Cancerous Tissues: Does Tissue Matter?. *International journal of molecular and cellular medicine*, 4(1), 54–59.

Kuang, J., Yan, X., Genders, A. J., Granata, C., & Bishop, D. J. (2018). An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PloS one*, 13(5), e0196438.

Stalder, G., Suffiotti, M., Segot, A., Noto, A., Pantaleo, G., Spertini, O., & Obeid, M. (2023). Response-adjusted regimen combining ruxolitinib, etoposid and dexamethasone (adRED) in adult patients with acute myeloid leukemia-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis: a single-center pilot trial. *Haematologica*, 108(1), 234–239.

Wawruszak, A., Luszczki, J. J., Grabarska, A., Gumbarewicz, E., Dmoszynska-Graniczka, M., Polberg, K., & Stepulak, A. (2015). Assessment of Interactions between Cisplatin and Two Histone Deacetylase Inhibitors in MCF7, T47D and MDA-MB-231

Human Breast Cancer Cell Lines - An Isobolographic Analysis. *PloS one*, 10(11), e0143013.

Arora RD, Menezes RG. Vinca Alkaloid Toxicity. [Updated 2022 Sep 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-.

Koushki, M., Khedri, A., Aberomand, M., Akbari Baghbani, K., & Mohammadzadeh, G. (2021). Synergistic anti-cancer effects of silibinin-etoposid combination against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Iranian journal of basic medical sciences*, 24(9), 1211–1219.

Thomas, G. W., Muss, H. B., Jackson, D. V., McCulloch, J., Ramseur, W., McFarland, J., Hoen, H., Pavy, M., & Heath, R. (1994). Vinkristin with high-dose etoposid in advanced breast cancer: a phase II trial of the Piedmont Oncology Association. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 35(2), 165–168.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı:	Mehmethan YILDIRIM
Uyruğu:	T.C.
Orcid Numarası:	0009-0005-3263-6892

EĞİTİM BİLGİLERİ	
Lisans	
Üniversite:	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Fakülte:	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü:	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı:	2021
Yüksek Lisans	
Üniversite:	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Fakülte:	Fen Bilimleri Enstitüsü
Bölümü:	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı:	2023

Tezden Üretilen Makaleler ve Bildiriler
Uluslararası Konferans ve Sempozyumlarda Sunulan Bildiriler “MDA-MB-231 Hücre Hattında Vinkristin ve Etoposid Sitotoksik Etkisinin Araştırılması”, 15.Uluslararası Ejons Matematik-Mühendislik-Fen ve Sağlık Bilimleri Kongresi, 2023.
Yayınlanan Makale, Kitap Bölümleri ve Bildiriler
Yayınlanan Kitap Bölümleri Yalcin, S., Yıldırım, M., & Kamil, N. İ. K. (2022). Cytotoxicity and Biocompatibility of Biobased Materials. In <i>Biobased Materials: Recent Developments and Industrial Applications</i> (pp. 17-34). Singapore: Springer Nature Singapore. Yıldırım, M., & Yalcin, S. (2022). Effect of bionanocomposites on human health. In <i>Bionanocomposites for Food Packaging Applications</i> (pp. 479-498). Woodhead Publishing. Uluslararası Konferans ve Sempozyumda Sunulan Bildiriler “Sisplatin Dirençli Ve Duyarlı Meme Kanseri Hücre Hatlarında Sodyum Azid’in Sitotoksik, Metastatik Ve Katalaz Enzim Aktivitesi Seviyesindeki Değişikliklerin Karşılaştırmalı Olarak Araştırılması”,Usbilim 1. Sağlık, Farmakoloji ve Veterinerlik Kongresi, 2021. “MDA-MB-231 Hücre Hattında Vinkristin ve Etoposid Sitotoksik Etkisinin Araştırılması”, 15.Uluslararası Ejons Matematik-Mühendislik-Fen ve Sağlık Bilimleri Kongresi, 2023.