T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DOKSORUBİSİN VE FLAVOPİRİDOL KOMBİNASYONUNUN MEME KANSER HÜCRELERİNDE FOXM1/RAS/MAPK VE NFkB SİNYAL YOLAĞINA ETKİSİ

Hazırlayan

İrem METİN

Danışman

Prof. Dr. Zuhal HAMURCU

Yüksek Lisans Tezi

AĞUSTOS 2023

KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DOKSORUBİSİN VE FLAVOPİRİDOL KOMBİNASYONUNUN MEME KANSER HÜCRELERİNDE FOXM1/RAS/MAPK VE NFkB SİNYAL YOLAĞINA ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan

İrem METİN

Danışman

Prof. Dr. Zuhal HAMURCU

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2022-11882 PROJE KODU kodlu proje ile desteklenmiştir.

AĞUSTOS 2023

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı : İrem METİN

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

"**Doksorubisin ve Flavopiridol kombinasyonun meme kanser hücrelerinde FOXM1/RAS/MAPK ve NFkB sinyal yolağına etkisi**" adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
İrem METİN

Danışman
Prof. Dr. Zuhal HAMURCU

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Zuhal HAMURCU

Prof. Dr. Zuhal HAMURCU danışmanlığında **İrem METİN** tarafından hazırlanan "**Doksorubisin ve Flavopiridol kombinasyonun meme kanser hücrelerinde FOXM1/RAS/MAPK ve NFkB sinyal yolağına etkisi**" adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

08/08/2023

JÜRİ **İmza**

Danışman : Prof. Dr. Zuhal HAMURCU

Üye : Prof. Dr. Elif Funda ŞENER

Üye : Doç. Dr. Mümin Alper ERDOĞAN

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ……...… tarih ve ……. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

……. /……../ ……

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans hayatım süresince bilgi ve deneyimleriyle bana yön veren, tezimin her aşamasında önerilerini ve yardımlarını esirgemeyerek danışmanlığımı yapan, akademik görüşlerimin temellerini oluşturan sevgili hocam, Prof. Dr. Zuhal HAMURCU'ya,

Çok değerli ekip arkadaşlarıma ve yardım elini hiç çekmeyen, sevgili ekip arkadaşım, Ar. Gör. Venhar ÇINAR'a,

İyi ve kötü günlerimde her zaman yanımda olan, mutluluğu ve üzüntüyü birlikte paylaştığım çok sevgili dostlarım, Merve BAŞAR, Zehra İBİLOĞLU, Emre TUĞHAN ve Ayten BİÇER'e,

Çalışmamı yürüttüğüm Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Enstitüsü'ndeki değerli hocalarıma ve çalışanlara,

11882 Kodlu projemde destekleri için Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Hayatımın her alanında ve her anında beni destekleyen, bana inanıp güvenen ve verdikleri emeklerle beni bugünlere hazırlayan aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İrem METİN

DOKSORUBİSİN VE FLAVOPİRİDOL KOMBİNASYONUNUN MEME KANSER HÜCRELERİNDE FOXM1/RAS/MAPK VE NFkB SİNYAL YOLAĞINA ETKİSİ

İrem METİN

Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2023

Danışman: Prof. Dr. Zuhal HAMURCU

ÖZET

Meme kanseri, tüm kadın kanser vakalarının %30'unu ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %15'ini oluşturan dünya çapında önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Doksorubisin (DOX), çeşitli kanserler için antikanser ajanı olarak yaygın olarak kullanılan bir antrasiklindir. Ancak, kanser hücrelerinde DOX'a karşı ilaç direnci geliştiği ve kardiyotoksisiteye neden olduğu için özellikle meme kanser hastalarının tedavisinde DOX kullanımında zorlanılmaktadır. Bu nedenle, DOX'un yan etkilerini azaltmak için yeni stratejilere, araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Doğal bileşiklerden olan Flavonoidler, düşük sistemik toksisitesi ve geniş anti-karsinojenik aktiviteleri nedeniyle meme kanser hücrelerinde aşırı oranda ifade olan FOXM1'e bağlı DOX direnci geliştiği ve DNA hasarından korunmak ve DNA tamir genlerinin ekpresyonu düzenlemek için NFkB'nin FOXM1 ile etkileşime girdiği, NFkB1 baskılandığında DOX direncinin üstesinden gelinebileceği öne sürülmüştür.

Bu bilgiler ışığında önerilen tez projesinde flavopiridol ve DOX kombinasyonunun agresif meme kanser hücrelerinin kanserojenik özelliklerine ve DOX'a karşı geliştirilen dirençte etkili olan FOXM1/RAS/MAPK and NFkB sinyal yolağına olası etkisinin araştırılması amaçlandı. Bulgularımıza göre DOX ve flavopiridolün ayrı ayrı etkilerine göre kombinasyonlarının 24 saatte artan konsantrasyonlara bağlı olarak kanser hücrelerinin kanserojenik özelliklerini azalttığı ve DOX ve flavopiridolün ayrı ayrı etkisine göre kombinasyonlarının FOXM1, MAPK, RAS, NFkB'nin protein ekspresyonlarını baskıladığı bulundu.

Sonuçlarımız, literatürde ilk kez flavopiridol ve DOX kombinasyonunun, DOX'un yan etkilerini azaltmak ve etkinliğini artırmak için yeni ve etkili bir alternatif tedavi stratejisi olarak kullanılabileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler; DOX; flavopiridol; FOXM1; MAPK; NFkB; PARP1; RAS; TNBC.

EFFECT OF DOXORUBICIN AND FLAVOPIRIDOL COMBINATION ON FOXM1/RAS/MAPK AND NFkB SIGNAL PATHWAY IN BREAST CANCER CELLS

İrem METİN

Erciyes University, Institute of Genome and Stem Cell

Department of Molecular Biology and Genetics

Master Thesis, July 2023

Supervisor: Prof.Zuhal HAMURCU

ABSTRACT

Breast cancer is an important health problem worldwide, accounting for 30% of all female cancer cases and 15% of cancer-related deaths in women. Doxorubicin (DOX) is an anthracycline that is widely used as an anticancer agent for various cancers. However, it is difficult to use DOX in the treatment of breast cancer patients, since drug resistance develops in cancer cells and causes cardiotoxicity. Therefore, new strategies and research are needed to reduce the side effects of DOX. Flavonoids, which are natural compounds, due to their low systemic toxicity and broad anti-carcinogenic activities, DOX resistance develops due to overexpression of FOXM1 in breast cancer cells and NFkB interacts with FOXM1 to protect from DNA damage and regulate the expression of DNA repair genes, when NFkB1 is suppressed. It has been suggested that DOX resistance can be overcome.

In the light of this information, in the proposed thesis project, it was aimed to investigate the possible effects of the combination of flavopiridol and DOX on the carcinogenic properties of aggressive breast cancer cells and the FOXM1/RAS/MAPK and NFkB signaling pathway, which is effective in the resistance developed against DOX. According to our findings, it was found that the combinations of DOX and flavopiridol, according to their separate effects, decreased the carcinogenic properties of cancer cells depending on the increasing concentrations in 24 hours, and their combinations suppressed the protein expressions of FOXM1, MAPK, RAS, NFkB according to the effects of DOX and flavopiridol separately.

Our results showed for the first time in the literature that the combination of flavopiridol and DOX can be used as a new and effective alternative treatment strategy to reduce the side effects of DOX and increase its efficacy.

Keywords; DOX; flavopiridol; FOXM1; MAPK; NFkB; PARP1; RAS; TNBC,

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI ii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vi
İÇİNDEKİLER vii
KISALTMALAR ve SİMGELER x
TABLOLAR LİSTESİ xi
ŞEKİLLER LİSTESİ xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1.KANSER 4
2.2.MEME KANSERİ 5
2.3. MEME KANSERİ MOLEKÜLER SINIFLANDIRILMASI 7
2.4. MEME KANSERİ RİSK FAKTÖRLERİ 8
2.4.1. Genetik 8
2.4.2. Cinsiyet 9
2.4.3. Yaş 9
2.4.4. Hormonal Durum 9
2.4.5. Çevresel Faktörler 10
2.4.6. Yaşam Tarzı 10
2.5. MEME KANSERİ TANI VE TEDAVİ YÖNTEMLERİ 10
2.5.1. Hormonal Tedavi 11
2.5.2. Kemoterapi 12
2.5.3. Radyoterapi 12

2.5.4. Cerrahi Tedavi 12
2.6. FORKHEAD BOX (FOX)TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ 12
2.7. Ras Sarkoma (RAS) Onkogen Ailesi 18
2.8. Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz (MAPK) 18
2.9. Nükleer Faktör Kappa B (NFkB) 19
2.10. Poli ADP Riboz Polimeraz (PARP) 20
2.11. DOKSORUBİSİN 20
2.12. FLAVONOİD 22
2.12.1. FLAVOPİRİDOL 23
3. GEREÇ VE YÖNTEM 24
3.1. GEREÇLER 24
3.1.1.Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri 24
3.1.2.Kullanılan Kitler ve Sarf Malzemeler 25
3.2.YÖNTEM 26
3.2.1.Kullanılan Hücre Hattı 26
3.2.2.Hücre Kültürü 26
3.2.2.1.Hücre Sayımı 27
3.2.3. Kimyasalların Hazırlanması 27
3.2.3.1.Doksorubisin Solüsyonu 28
3.2.3.2.Flavopiridol Solüsyonu 28
3.2.4.Hücre Canlılık Analizi 28
3.2.5. Koloni Analizi 29
3.2.6. Apoptoz Analizi 29
3.2.7. Hücre Döngüsü Analizi 30
3.2.8. Western Blot Analizi 30
3.2.9.İstatistiksel Analiz 32

4.BULGULAR 33

4.1 DOX , flavopiridol ve kombinasyonun MDA-MB-231 ve BT-549 kanseri hücrelerinin canlılığına/çoğalmasına etkisi 33

4.2. DOX, flavopiridolün ve kombinasyonun MDA-MB-231 ve BT-549 kanseri hücrelerinin koloni oluşumuna etkisi 36

4.3. DOX, flavopiridolün ve kombinasyonun MDA-MB-231 ve BT-549 kanseri hücrelerinin hücre döngüsü evrelerine etkisi 40

4.4. DOX, flavopiridolün ve kombinasyonun MDA-MB-231 ve BT-549 kanseri hücrelerinde apoptoza etkisi 42

4.5. DOX, flavopiridolün ve kombinasyonun MDA-MB-231 ve BT-549 kanseri hücrelerinde FOXM1/MAPK/RAS/NFkB sinyal yolağına etkisi 44

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 48

6. KAYNAKLAR 54

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR ve SİMGELER

BC: Meme kanseri

BRCA1: Meme kanseri duyarlılık geni 1

BRCA2: Meme kanseri duyarlılık geni 2

CDK: Siklin bağımlı kinaz

EMT: Epidermal mezenkimal geçiş

ER: Östrojen reseptörü

FOX: Forkhead box transkripsiyon faktörü

HER2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü

MET: Mezenkimal epidermal geçiş

MKC: Meme koruyucu cerrahi

PR : Progesteron reseptörü

TCGA: Kanser genom atlas programı

TNBC: Üçlü reseptör negatif meme kanseri

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Kimyasal/çözücü miktarları 28

Tablo 2. Primer antikorlar..... 32

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kanserin Mikroçevresi ve Özellikleri 4

Şekil 2. Meme Kanseri Sınıflandırılması 7

Şekil 3. Meme Kanseri Alt Tipleri 8

Şekil 4. Forkhead Box Transkripsiyon Faktörü Ailesi 13

Şekil 5. FOXM1'ın Hücre Döngüsündeki Rolü 15

Şekil 6. FOXM1 Geninin Genomik Yapısı 15

Şekil 7. FOXM1 yolağı 17

Şekil 8. TNBC sinyalleri 19

Şekil 9. Doksorubisinin kimyasal formülü 21

Şekil 10. Flavopiridolün kimyasal formülü 23

Şekil 11. 1-10 µM konsantrasyonlarda 24 saat DOX uygulanan MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde hücre canlılık oranı.. 34

Şekil 12. 100-1000 nM konsantrasyonlarda 24 saat flavopiridol uygulanan MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde hücre canlılık oranı. 34

Şekil 13. 100-500 nM konsantrasyonlarda 48 saat flavopiridol uygulanan MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde hücre canlılık oranı. 35

Şekil 14. MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde 10 µM DOX, 500 nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonun hücre canlılığına oranı.. 36

Şekil 15. MDA-MB-231 hücresinin 25-500nM artan konsantrasyonlarda DOX, 50-600nM artan konsantrasyonlarda flavopiridol ve kombinasyon uygulaması sonucu koloni sayısı. 38

Şekil 16. BT-549 hücresinin 25-500nM artan konsantrasyonlarda DOX, 50-600nM artan konsantrasyonlarda flavopiridol ve kombinasyon uygulaması sonucu koloni sayısı. 39

Şekil 17. MDA-MB-231 hücrelerinin 10µM DOX, 500nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamelesi sonucu hücre döngüsü oranı. 41

Şekil 18. BT-549 hücrelerinin 10μM DOX, 500nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamelesi sonucu hücre döngüsü oranı. 42

Şekil 19. MDA-MB-231 hücrelerinin 10μM DOX, 500nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamelesi sonucu total apoptoz oranı. 43

Şekil 20. BT-549 hücrelerinin 10μM DOX, 500nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamelesi sonucu total apoptoz oranı. 44

Şekil 21. 10μM DOX, 500 nM Flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde protein ekspresyon seviyeleri. 45

Şekil 22. 10μM DOX, 500 nM Flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamele edilen BT-549 hücrelerinde protein ekspresyon seviyeleri.. 47

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, meme hücrelerinde başlayan ve anormal bir şekilde kontrolsüz büyüyen kötü huylu tümörlerdir (Narayan ve ark., 2020; Hamurcu ve ark., 2016; Nurdinov ve ark., 2021). Meme kanseri, tüm kadın kanser vakalarının %30'unu ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %15'ini oluşturan dünya çapında önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır (Ferlay ve ark., 2018). Meme kanserinin en agresif tipini temsil eden üçlü negatif meme kanseri (TNBC), genel olarak bilinen üç reseptörün (progesteron reseptörü (PR), östrojen reseptörü (ER) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2))'nün varlığına veya yokluğuna göre sınıflandırılır (Won ve ark., 2020; Pareja ve ark., 2018; Dass ve ark., 2021). TNBC, son derece yüksek ilaç direnci, hızlı progresyonu, kötü prognozu ve net terapötik hedeflerin olmaması ile karakterize edilir (Shen ve ark., 2020). SEER veri tabanına göre, 2020 yılında tüm yeni kanser vakalarının %15.9'unu temsil eden yaklaşık 276.480 yeni meme kanseri vakasının teşhis edildiği tahmin edilmektedir. Aynı zamanda, 42.170 kadının 2020'de hastalığa yenik düştüğü ve kansere bağlı tüm ölümlerin %7'sini temsil ettiği tahmin edilmektedir (Wu ve ark., 2021).

Doksorubisin (DOX), çeşitli tümörler için antikanser ajanı olarak yaygın olarak kullanılan bir antrasiklindir. Tümör hücrelerinde mitoz bölünmeyi önleyen DNA hasarına neden olarak DNA replikasyonunu engelleyen topoisomerase II inhibitörüdür. Bununla birlikte kapsamlı klinik kullanımına rağmen, DOX'in anti-kanser moleküler mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır (Khalili-Tanha ve ark., 2021). Ayrıca, tümör hücrelerinde DOX'a karşı direncin gelişmesi tedaviyi zorlaştırmaktadır. Sitotoksisitesinden dolayı DOX'un, direncin üstesinden gelmek için dozunu artırmanın imkansız olduğu vurgulanmıştır (Mirzaei ve ark., 2021). Dolayısıyla, metastatik meme kanser hastalarının tedavisinde kullanılmasına rağmen,

ilaç direnci ve kardiyotoksisiteye neden olduğu için DOX kullanımında zorlanılmaktadır.

Antrasiklinler, özellikle DOX, uzun zamandan beri kanser tedavisinin temel dayanağı olmuştur. DOX hidroklorür (HCl) lipozomal enjeksiyonu, klinik onay alan ilk lipozomal kapsüllü antikanser ilacıdır ve solid tümörler, transplante edilebilir lösemiler ve lenfomalar dahil olmak üzere bir dizi maligniteye karşı aktiviteye sahiptir. DOX, interkalasyon yoluyla DNA ile etkileşime girer, böylece makromoleküler biyosentezi inhibe eder. DOX, replikasyon için DNA zincirini kırdıktan sonra topoizomeraz II kompleksini stabilize eder, DNA çift sarmalının yeniden kapatılmasını önler ve böylece replikasyon sürecini durdurur. DOX HCl'nin bir başka mekanizması, DNA ve hücre zarı hasarını indükleyen serbest radikaller üretme yeteneğidir (Rivankar ve Sangeeta, 2014).

Flavopiridol, hücre döngüsünü G1-S veya G2-M aşamasında durdurma ve çoklu siklin bağımılı kinaz (CDK)'ları inhibe ederek antiproliferatif etkilere aracılık etme aktivitesi ile bilinen bir CDK inhibitörü olarak kabul edilmiştir (Shao ve ark., 2016; Wang ve ark., 2017). Flavopiridol apoptoz ailesinin ve B hücre lenfoma-ekstra büyük (Bcl-XL) gibi antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu azaltarak ve proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2017). Flavopiridolün, insan küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu hücrelerinde (Keith ve ark., 1997), kolon kanserinde (Motwani ve ark., 2001), gastrointestinal kanserde (Jung ve ark., 2001) ve meme kanserinde (Wall ve ark., 2003; Motwani ve ark., 1999) apoptozu indüklediği gösterilen paklitaksel, docetaxel, gemsitabin ve DOX gibi kemoterapilerin etkinliğini güçlendirdiği bildirilmiştir.

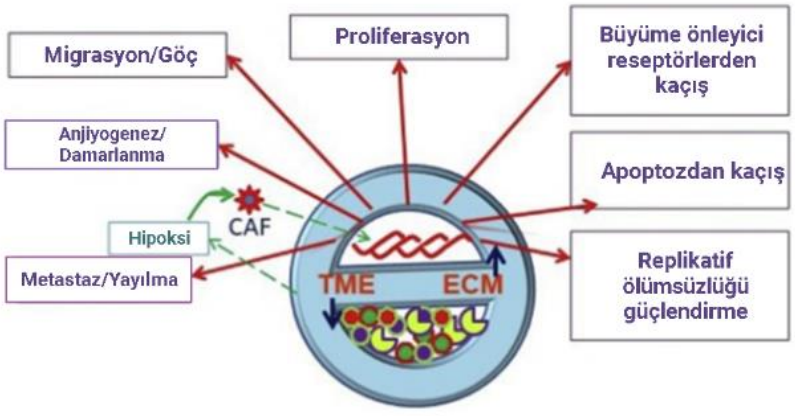
Son yıllarda yapılan çalışmalar, Forkhead Box-M1 (FOXM1) transkripsiyon faktörünün solid tümörlerde aşırı eksprese edilen bir onkogen olduğunu göstermiştir. FOXM1'ın ayrıca bazı meme kanser hücre hatlarında, meme epitel hücrelerine kıyasla daha fazla eksprese olduğu ve proliferasyon, invazyon, migrasyon, metastaz ve kemoterapiye direnç gibi birçok etkisi olduğu gösterilmiştir. Hatta, meme kanser hücrelerinde aşırı oranda ifade olan FOXM1'e bağlı DOX direnci geliştiği ve DNA hasarından korunmak ve DNA tamir genlerinin ekpresyonunu düzenlemek için

NFkB'nin FOXM1 ile etkileşime girdiği, NFkB baskılandığında DOX direncinin üstesinden gelinebileceği öne sürülmüştür (Park ve ark., 2012). Bu bilgiler ışığında önerilen tez projesinde flavopiridol ve DOX kombinasyonunun agresif meme kanser hücrelerinin proliferasyon, koloni oluşumu, hücre döngüsü, apoptoz özelliklerine ve DOX'a karşı geliştirilen dirençte etkili olan FOXM1/RAS/MAPK and NFkB sinyal yolağına olası etkisinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.KANSER

Kanser, normal dokudan daha sık ve kontrolsüz bir şekilde çoğalan, invaziv ve metastatik özelliklere sahip bir hücre kolonisini ifade eder (Şekil 1). Genel olarak, kanser gelişiminin nedeni, hücre döngüsünü düzenleyen bir veya daha fazla proteindeki genetik bir kusurdur. Bazı durumlarda, kusurlu gen kalıtsaldır. Diğer bazı durumlarda, çevresel kanserojenlere yanıt olarak mutasyonlar meydana gelir. Genel olarak hem kalıtsal hem de çevresel faktörler bir arada bulunur ve kanserin gelişmesi için mutasyonların birikmesi gerekir. Oksidatif stres veya UV radyasyonu gibi çevresel faktörlerden etkilendiğinde hücrenin DNA'sı zarar görür, onarım mekanizmaları devreye girer ve hasarı onarmaya çalışırlar. Onarım mekanizmaları hasarı yeterince onaramaz ise hücre ölüm sinyalleri devreye girer. Ancak bu mekanizmalar bozulursa mutasyona uğramış hücreler çoğalabilir ve hatta zamanla mutasyonların birikmesiyle tümör oluşturur (Vaghari-Tabari ve ark., 2021).



Şekil 1. Kanserin Mikroçevresi ve Özellikleri (Deepak ve ark., 2020)

Genel olarak kanserlerde, çoğalmanın uyarılması ve ölümsüzlük gibi farklı etkilere neden olan genetik ve epigenetik değişiklikler meydana gelir. Bu etkilerin ortaya çıkmasına çeşitli sinyal yolakları aracılık etmektedir. AKT/PI3K, RAS-ERK, mTORC ve Wnt/B-katenin bu bağlamda anahtar yollardır. Tipik olarak kanserlerde mutasyona uğrayan önemli sayıda gen, bu sinyal yollarının farklı bileşenlerini kodlar. Bu sinyal yolları, büyüme faktörleri gibi farklı ligandlar tarafından fizyolojik koşullar altında aktive edilir. Kanserli hücrelerde meydana gelebilecek gen mutasyonları nedeniyle büyüme faktörlerinin yokluğunda bu sinyal yolları aktif olabilir. Bu nedenle kanserli hücreler kontrolsüz bir şekilde büyüyüp çoğalabilmektedir (Vaghari-Tabari ve ark., 2021).

Lokal ve metastatik olmayan kanserlerde cerrahi ve radyoterapi birincil tedavi olarak kullanılırken, günümüzde metastatik kanserlerde anti-kanser ilaçlar (kemoterapi, hormon ve biyolojik tedaviler) tercih edilmektedir (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde, 2015). Buna rağmen, kanser dünya çapında önde gelen ölüm nedenidir. Dünya çapında yaklaşık 7,6 milyon ölümden sorumlu olup, bunun 2030 yılına kadar 13,1 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir. Kanser tedavisindeki ilerlemelere rağmen, halihazırda kullanılan tedavi modülleri etkisiz kalmaktadır (Rahmani ve ark., 2022).

2.2.MEME KANSERİ

Meme dokusu, süt üretiminde yer alan bezler olan lobüller, lobülleri meme ucuna bağlayan kanallar, bağ dokusu, yağ dokusu ve lenfatik dokudan oluşur. Meme kanseri, memenin herhangi bir bileşeninde düzensiz bir hücre büyümesi olduğunda ortaya çıkar, ancak bu en yaygın olarak lobüllerde görülür (Winters ve ark., 2017).

Meme kanserlerinin çoğu invaziv tipi kapsar. Bu maligniteler, kanalların ve bezlerin ötesine geçerek çevre dokulara ve lenf düğümlerine yayılmıştır. Şu ana kadar, histolojik olarak farklı 21 meme kanseri ve dört farklı moleküler varyasyon tanımlanmşıtır. Her alt tip, genel sunumları ve gerekli tedavi türü bakımından farklılık gösterir. Meme kanseri hücreleri, tümör hücrelerinin epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) ve tersine mezenkimal-epitelyal geçişi (MET) indükleme yeteneği ile ilişkili çok dinamik bir özellik kazanır. Hücreler fenotiplerini değiştirerek yığından

kaçabilir, kardiyovasküler sisteme girebilir ve lenf düğümlerine ve kemikler, karaciğer veya beyin gibi uzak organlara metastaz yapabilir. Meme kanseri hücrelerinin metastaz yapma yeteneği, tedavi başarısızlığının ve hasta ölümlerinin ana nedenidir (Winters ve ark., 2017; Judasz ve ark., 2022).

Malignite, germinal veya somatik hücrelerde düzensiz ve/veya kalıtsal genetik mutasyonların sonucu olarak kabul edilmektedir. Benzer şekilde meme kanseri, spesifik genlerde mutasyonların birikmesiyle sonuçlanan hem genetik hem de çevresel faktörlerden kaynaklanır. Genel olarak, meme kanseri riski yaşla birlikte artar; bununla birlikte, bazı genetik olmayan faktörler başlangıç yaşında geniş bir varyasyona neden olabilir. Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserdir ve kadın kanserlerinin %30'unu oluşturur (Karim ve ark., 2023). Küresel Kanser Gözlemevi kayıt defterine göre, 2018'de 18,08 milyon yeni kanser vakası teşhis edildi ve bunlar arasında meme kanseri 2,09 milyon vaka ile en sık üç kanser arasında yer almaktadır. Meme kanseri, yaşa göre standardize edilmiş en yüksek frekansa (100.000'de 46,3) ulaşır (Mattiuzzi ve Lippi, 2019).

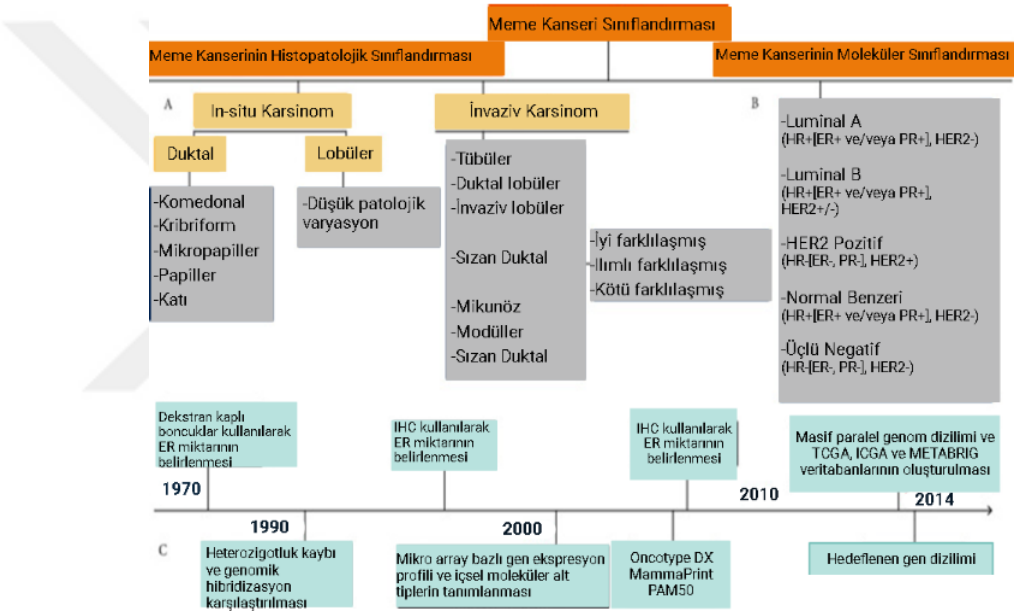
Küresel olarak meme kanseri, dört kanser vakasından birinden ve kadınlarda altı kanser ölümünden birinden sorumludur. GLOBOCAN 2018 verilerinin analizine göre 40 yaşına kadar meme kanserine yakalanma riski ortalama % 0,44'tür. Kıtalar arasında, 40 yaşından önce meme kanserine yakalanma riskinin ortalama kümülatif riski yaklaşık iki kat değişiklik göstermiştir; en yüksek Okyanusya (% 0,69), ardından Avrupa (% 0,63), Amerika (% 0,53), Afrika (% 0,49) ve en düşük Asya'da (% 0,38) görülmektedir (Zhu ve ark., 2023).

Mevcut verilere göre, insidans oranları Avustralya, Yeni Zelanda, Avrupa'nın çoğu ve Kuzey Amerika'da en yüksek, Güney Amerika ve Doğu Avrupa'da orta, Asya ve Afrika'nın çoğunda en düşük seviyededir. Teşhis 40 yaşından önce nadirdir (olasılık <% 1), bundan sonra insidans oranları yaklaşık 70 yaşına kadar artar, sonra azalmaya başlar (Houghton ve Hankinson, 2021).

Birinci derece akrabalarında meme kanseri öyküsü olan kadınlarda da meme kanseri gelişme riski yüksektir. İlk olarak 1990'ların başında tanımlanan BRCA germ hattı mutasyonlarının varlığı, bir kadını hem meme hem de yumurtalık kanseri riskine

sokar. Ancak teşhis edilen meme kanserlerinin %10'dan azının BRCA1 veya 2'deki mutasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir . Bu genler, otozomal dominant bir şekilde kalıtılır ve DNA uyumsuzluk onarımında önemli olan tümör baskılayıcı genler olarak işlev görür. BRCA1, 17q21 kromozomu ve BRCA2 üzerinde 13q12-13 kromozomunda bulunur (Rojas ve Stuckey, 2016).

Histolojik alt tipler dışında, gen ekspresyon profili, meme kanserini farklı moleküler alt tipler, yani reseptör pozitif (Luminal A, Luminal B, Normal benzeri ve İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 pozitif (HER-2) ve üçlü reseptör negatif (TNBC) olarak sınıflandırmıştır (Şekil 2) (Kashyap ve ark., 2022).

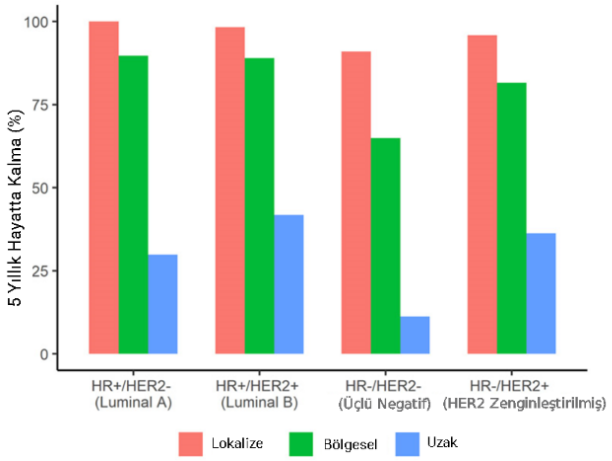


Şekil 2. Meme Kanseri Sınıflandırılması (Kashyap ve ark., 2022)

2.3. MEME KANSERİ MOLEKÜLER SINIFLANDIRILMASI

Meme kanseri östrojen reseptörleri (ER) ve progesteron reseptörleri (PR) ve İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 pozitif (HER2) onkogeninin ekspresyonuna dayalı olarak farklı alt tiplerde tanımlanmıştır (Şekil 3). Genel olarak, ER pozitif tümörler, ER negatif tümörlerden daha yaygındır. Ayrıca, ER pozitif tümörler, ER negatif tümörlerin aksine daha küçük ve düşük dereceli ve lenf nodu negatiftir. Böylece, iki ER/PR pozitif (Luminal A ve Luminal B) alt grup bulunmaktadır. Luminal B alt grupta PR pozitif veya negatif olabilir. Ayrıca ER negatif HER2 tip

meme kanseri, bazal benzeri meme kanseri ve TNBC alt tipleri bulunmaktadır. (Tao ve ark., 2015).



Şekil 3. Meme Kanseri Alt Tipleri (Houghton ve Hankinson, 2021)

ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ (TNBC)

Meme kanserlerinin yaklaşık %15'i bu kategoriye girer. TNBC insidansı genellikle genç kadınlarda, Afrikalı-Amerikalı kadınlarda ve mutasyona uğramış BRCA1 hastalarında daha yüksektir (Tao ve ark., 2015). TNBC'ler, invaziv meme kanserlerinin %10-20'sini oluşturur ve diğer meme kanseri tiplerine kıyasla son derece proliferatif tümör hücreleri ile biyolojik ve klinik olarak daha agresif kanserlerdir ve daha kötü bir prognoz ve çok sınırlı tedavi seçenekleri ile orta/yüksek dereceli kanserler olarak kabul edilir (Karim ve ark., 2023).

2.4. MEME KANSERİ RİSK FAKTÖRLERİ

2.4.1. Genetik

Tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık dörtte biri aile öyküsü ile ilişkilidir. Annesi veya kız kardeşi meme kanseri olan kadınlar bu hastalığa eğilimlidir. Birleşik Krallık'ta 113.000'den fazla kadın üzerinde yapılan bir kohort çalışması, birinci derece akrabalarında meme kanseri olan kadınların, akrabalarında meme kanseri olmayan kadınlara göre bu hastalığı geliştirme riskinin 1,75 kat daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca, iki veya daha fazla birinci derece akrabasında meme

kanseri olan kadınlarda risk 2,5 kat veya daha fazla olmaktadır. Meme kanserine kalıtsal yatkınlık kısmen BRCA1 *ve* BRCA2 gibi meme kanseri ile ilgili genlerin mutasyonlarına atfedilir (Sun ve ark., 2017).

2.4.2. Cinsiyet

Tüm meme kanserlerinin % 1'den azı erkeklerde görülür. Bununla birlikte, erkeklerde meme kanseri, teşhis anında kadınlardan daha ileri olma eğiliminde olan nadir bir hastalıktır. Erkeklerin ortalama tanı yaşı yaklaşık 67'dir. Bir erkeğin meme kanseri riskini artıran önemli faktörler şunlardır: ileri yaş, BRCA2/BRCA1 mutasyonları, artmış östrojen seviyeleri, Klinefelter sendromu, ailede meme kanseri öyküsü ve radyasyona maruz kalma (Łukasiewicz ve ark., 2021).

2.4.3. Yaş

Cinsiyetin yanı sıra yaşlanma, meme kanseri için en önemli risk faktörlerinden biridir, çünkü meme kanseri insidansı artan yaşla yakından ilişkilidir. 2016'da Amerika'daki tüm meme kanserine bağlı ölümlerin yaklaşık % 99,3'ü ve % 71,2'si sırasıyla 40 ve 60 yaş üstü kadınlarda bildirilmiştir. Bu nedenle 40 yaş ve üzerindeki kadınlarda önceden mamografi taraması yaptırmak gerekir (Sun ve ark., 2017). Birçok çalışma, meme kanseri teşhisi sırasında genç yaşın olumsuz bir risk faktörü oluşturduğunu ve genç kadınların daha ileri evrelerde daha büyük tümörlerle ve daha sık olarak lenf nodu pozitif olarak ortaya çıktığını göstermiştir (Tao ve ark., 2015).

2.4.4. Hormonal Durum

Kadın cinsiyeti, öncelikle artmış hormonal stimülasyon nedeniyle meme kanseri riskinin artmasıyla ilişkili ana faktörlerden birini oluşturur. Önemsiz östrojen seviyeleri sergileyen erkeklerin aksine, kadınların meme hücreleri hormonlara (özellikle östrojen ve progesteron) ve dengelerindeki herhangi bir bozulmaya karşı çok hassastır. Dolaşımdaki östrojenler ve androjenler, meme kanseri riskinin artmasıyla pozitif olarak ilişkilidir. Cinsiyet hormonlarının endojen düzeylerinin fizyolojik düzeylerindeki değişimler, menopoz öncesi ve menopoz sonrası kadınlarda daha yüksek meme kanseri riskine neden olur; bu gözlemler Endojen Hormonlar ve Meme Kanseri İşbirliği Grubu tarafından da desteklenmiştir (Łukasiewicz ve ark., 2021).

2.4.5. Çevresel Faktörler

Kimyasallara kronik maruz kalma, prokarsinojenik olayların indüklenmesiyle birlikte epigenetik değişiklikleri indükleyen tümör mikroçevresini etkileyerek meme karsinogenezini teşvik edebilir. Ayrıca meme kanseri için potansiyel risk faktörleri oluşturabilecek bir diğer faktör ilaç kullanımıdır. Geceleri yapay ışık (ALAN) son zamanlarda meme kanseri riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Muhtemel neden, bozulmuş bir melatonin ritmi ve müteakip epigenetik değişiklikler olabilir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalara göre, ALAN'a daha fazla maruz kalma, ALAN'a daha az maruz kalan bireylerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek meme kanseri riski ile ilişkilidir (Łukasiewicz ve ark., 2021).

2.4.6. Yaşam Tarzı

Aşırı alkol tüketimi ve çok fazla diyet yağı alımı gibi modern yaşam tarzları meme kanseri riskini artırabilir. Alkol tüketimi, kandaki östrojenle ilişkili hormonların seviyesini yükseltebilir ve östrojen reseptör yollarını tetikleyebilir. 53 epidemiyolojik araştırmaya dayanan bir meta-analiz, günde 35-44 gram alkol alımının meme kanseri riskini %32 artırabildiğini ve her gün ilave her 10 gram alkol için progesteron (RR)'de %7.1 artış olduğunu göstermiştir. Modern batı diyeti çok fazla yağ içerir ve aşırı yağ alımı, özellikle doymuş yağ, meme kanseri hastalarında mortalite (RR=1.3) ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Sigara içme ve meme kanseri riski arasındaki ilişki tartışmalı olsa da, emzirmeyen kadınların meme sıvısında sigara dumanından kaynaklanan mutajenler tespit edilmiştir. Hem sigara hem de içki içen kadınlarda meme kanseri riski de yüksektir (RR=1.54). Şimdiye kadar biriken kanıtlar, özellikle erken yaşta sigara içmenin meme kanseri oluşumunda daha yüksek risk taşıdığını göstermektedir (Sun ve ark., 2017).

2.5. MEME KANSERİ TANI VE TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Meme kanseri genellikle ya taramayla ya da teşhis muayenesini gerektiren bir semptomla (örneğin, ağrı ya da ele gelen bir kitle) teşhis edilir. Sağlıklı kadınların taranması, daha küçük, daha düşük metastaz olasılığına sahip, meme koruyucu ve sınırlı aksiller cerrahiye daha uygun ve kemoterapi gerektirme olasılığı daha düşük olan tümörlerin saptanması ile ilişkilidir. Meme kanserine özgü mortaliteyi azalttığı

kanıtlanmış tek tarama yöntemi mamografidir. Tarama mamografisi, meme kanseri ölümlerinde genel olarak %19'luk bir azalmaya yol açar. Yüksek riskli hastalar için mamografiyi diğer görüntüleme yöntemleriyle desteklemek, mamografik olarak gizli kanserlerin ek olarak saptanmasına yol açar. Mamografiye ek olarak Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) kullanımı, mamografiye ek olarak ultrason kullanımına (%52) göre malignite için daha yüksek bir duyarlılığa sahiptir (%92,7) (McDonald ve ark., 2016).

2.5.1. Hormonal Tedavi

Östrojen veya progesteron pozitif meme kanseri olan hastalar, aromataz inhibitörü gibi endokrin tedavisi almalıdır. Osteoporoz veya aromataz inhibitörü intoleransı riskinin artmasıyla ilgili endişe varsa, tamoksifen reçete edilebilir. Yakın zamana kadar, tüm menopoz öncesi hastalar için tamoksifen önerildi. Bununla birlikte, randomize 3 kollu SOFT çalışmasının sonuçları, yumurtalık baskılanması artı eksemestan'ın tamoksifenden daha üstün olduğunu, ancak yalnızca kemoterapi alan hastalarda olduğunu ileri sürdü. Kemoterapi, tedavi eden hekimin takdirine bağlı olarak uygulandığından, nüks riski en yüksek olan hastalarda (pozitif lenf düğümleri, büyük primer tümörler veya HER2-pozitif hastalık) yumurtalık supresyonu ve eksemestan yararı gözlendi. Kemoterapi almayan premenopozal hastalar için tek başına tamoksifen kabul edilebilir. Şaşırtıcı olmayan bir şekilde, tek başına tamoksifen, yalnızca ilk 2 yıl için olmasına rağmen, yumurtalık supresyonu artı eksemestandan daha iyi tolere edilir. Endokrin tedavisi en az 5 yıl önerilir; bununla birlikte, randomize ATLAS çalışmasının sonuçları, meme kanseri ölümlerinde 5 yerine 10 yıllık tamoksifen ile %3 ek iyileşme gösterdiği bulunmuştur (McDonald ve ark., 2016).

Çok az destekleyici veriye rağmen aromataz inhibitörleri, BIG 1-98 çalışmasının sonuçlarına göre lobüler kanserler için de tercih edilen seçenektir. Aromataz inhibitörleri ile standart endokrin tedavi süresi, özellikle evre I hastalık için 5 yıldır. 10 yıla kadar uzatılan adjuvan tedavinin rolü birkaç çalışmada araştırılmıştır ve veriler, endokrin tedavisine devam etmenin yüksek risk altındaki hastalarda (düğüm pozitif, yüksek genomik skor) nüks riskini azalttığını göstermektedir. ER-pozitif hastalığı olan hastalar 10 yıl sonra bile nüks riski altındadır ve adjuvan tedaviyi

uzatma kararı, toksisiteye ve bozulmuş yaşam kalitesine karşı potansiyel faydaları dikkate almalı ve dengelemelidir.

Yüksek veya çok yüksek risk altındaki hastalarda endokrin tedaviye ek olarak CDK4 ve CDK6 inhibitörleri (palbociclib, abemaciclib ve ribociclib) şu anda birkaç faz-3 çalışmasında değerlendirilmektedir (Loibl ve ark., 2021).

2.5.2. Kemoterapi

Kesin cerrahi sonrası adjuvan kemoterapi genellikle nüks riski yüksek olan hastalarda önerilir. Klinikopatolojik özellikler kemoterapi endikasyonları olabilir: Yüksek riskli hastalığı olan hastalar için sitotoksik tedavi olarak hem antrasiklin hem de taksan kullanılmaktadır (McDonald ve ark., 2016).

Neoadjuvan paklitaksel ve karboplatine anti-PD-1 antikoru pembrolizumabın ve ardından DOX-siklofosfamidin eklenmesi, patolojik tam yanıt oranını %64'e kadar artırdığı görülmüştür (Loibl ve ark., 2021).

2.5.3. Radyoterapi

Prospektif randomize çalışmalar, meme kanserinden uzun vadeli mortalite ve genel hasta sağkalımının, meme koruyucu cerrahi artı radyasyon tedavisi ve mastektomi için karşılaştırılabilir olduğunu doğrulamıştır. Radyasyonun ayrıca in situ duktal karsinom tedavisinde kanıtlanmış bir rolü vardır; İyileştirilmiş hasta seçimi ve cerrahi ve radyasyon teknikleri ile %90-95 oranında uzun süreli lokal kontrol sağlanmıştır (McDonald ve ark., 2016).

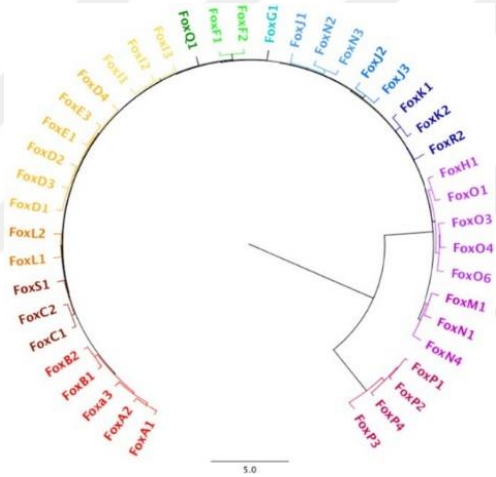
2.5.4. Cerrahi Tedavi

Bu , meme kanseri vücudun daha ileri bölgelerine yayılmamış bireyler için en önde gelen tedavi stratejisidir (Akram ve ark., 2017).

2.6. FORKHEAD BOX (FOX)TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ

Forkhead *(* fkh) geni orijinal olarak *Drosophila melanogaster'*da gerçekleştirilen bir rastgele mutajenez taramasında tanımlandı. Çalışmalar, forkhead geninin normal bağırsak gelişimi için gerekli olduğunu ve bunun yokluğunun, ön bağırsağın bir baş yapısına homeotik dönüşümünden kaynaklanan karakteristik bir 'çatallı kafa'

görünümü ile sonuçlandığını gösterdi. Bu keşiften kısa bir süre sonra, mayalardan insanlara kadar birçok organizmada Forkhead Box (FOX) genleri olarak adlandırılan bir dizi ilgili gen tanımlandı. Drosophila Fkh proteini, 'çatal başlı kutu' olarak adlandırılan, ~ 100 kalıntı uzunluğunda kanatlı sarmal bir DNA bağlama alanı ile karakterize edilir. Tüm FOX proteinleri, bu ayırt edici DNA bağlama alanını paylaşır, ancak farklı özelliklere ve işlevlere sahiptir. FOX familyası, insanlarda 50 gen ve farelerde 44 gen tarafından kodlanır; bunlar, forkhead alanlarının homoloji derecesine göre FOXA'dan FOXS'a kadar 19 alt aileye sınıflandırılmıştır (Şekil 4) (Herman ve ark., 2021; Galson ve Kaestner., 2016). FOX genleri, çok çeşitli biyolojik işlevleri kontrol eder ve hem gelişim sırasında hem de yetişkin yaşamında geniş ölçüde ifade edilir (Galson ve Kaestner, 2016).



Şekil 4. Forkhead Box Transkripsiyon Faktörü Ailesi (Galson ve Kaestner, 2016)

Bu ailenin üyeleri, hücre büyümesi, farklılaşması ve embriyojenezin düzenlenmesinde yer alırlar. Bu proteinlerin rollerinden dolayı fonksiyonundaki bozukluklar, yumurtalık, meme ve prostat kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde, kanserin başlaması, ilerlemesi ve kemodirenç ile ilişkilidir (Galson ve Kaestner, 2016).

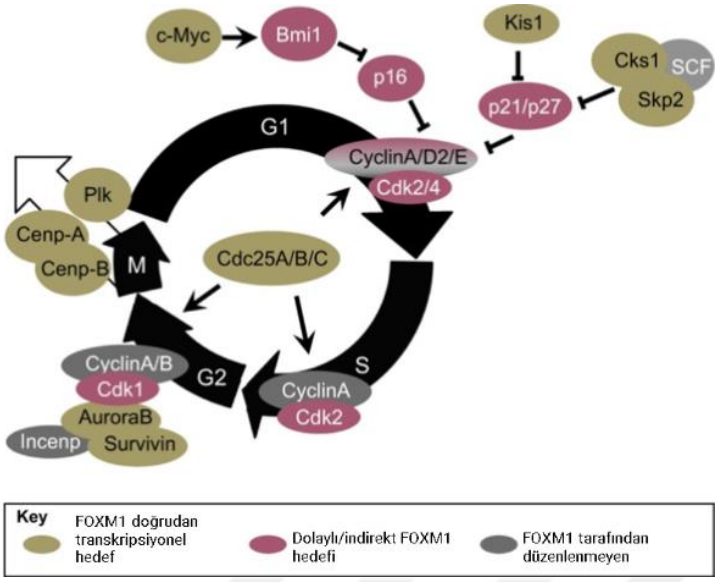
FOX ailesi üyelerinin birçok kanserde yukarı veya aşağı doğru düzenlendiği gösterilmiştir. FOXP1'in, hücre tipine bağlı olarak bir tümör promotörü ve bir onkogen olduğu öne sürülmüştür. FOXA1, birçok östrojene duyarlı genin ekspresyonu için gerekli olan öncü bir faktördür. Nakshatri ve Badve, FOXA1 ekspresyonunun sürdürülmesinin, ER-alfa-pozitif meme kanserlerini östrojene

bağımlı kalmaya zorlayabileceğini ve anti-östrojenlere yanıtlarını artırabileceğini ileri sürmektedir. FOXM1, çoğu karsinomda yüksek oranda eksprese edilen, ancak normal hücrelerde düşük miktarlarda eksprese edilen bir onkogendir. FOXM1'in yukarı regülasyonu, geniş bir kanser yelpazesinde rapor edilmiştir. *İn vitro* çalışmalar, artan ekspresyonunun, kanser hücrelerinin invazyonuna ve anjiyogenezine yol açabileceğini göstermiştir (Rajagopal ve ark., 2018).

Forkhead Box M (FOXM1)

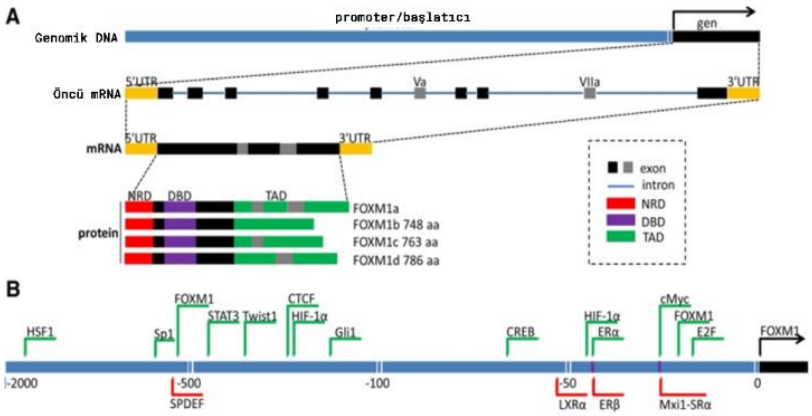
Bir onkofetal transkripsiyon faktörü olan Forkhead Box M1 (FOXM1), forkhead protein ailesinin üyelerinden biridir ve normal hücre bölünmesi için gereklidir ve silinmesi embriyonik olarak öldürücüdür (Rajagopal ve ark., 2018). İnsan FOXM1 proteini ilk olarak bir servikal kanser hücre dizisi olan HeLa'da tanımlandı. 12p13.33 kromozomal bandında yer alan FOX1 geni alternatif uç birleştirme ile karakterize edilen on eksonu kapsar. FOXM1 üç iyi tanımlanmış alana sahiptir: N-terminali otorepresör alanı, C-terminali *trans*-aktivasyon alanı ve yüksek düzeyde korunmuş DNA bağlayıcı Forkhead kutusu alanıdır. Hücresel süreçlerin çoğuna yakından dahil olmaları nedeniyle, germ hattı mutasyonu veya bu transkripsiyonel düzenleyicilerin çıkarılması, genellikle insanda doğuştan gelen bozukluklar ve hastalıklarla bağlantılıdır (Nandi ve ark., 2018).

FOXM1, hücre döngüsünü yönlendirmedeki rolüyle geniş çapta tanınmaktadır (Şekil 5). Doğrudan transkripsiyonel hedefleri hem G1/S ve G2/M geçişlerinde hem de karyokinez ve sitokinez sırasında işlev görür. Buna göre, FOXM1 ifadesi çoğunlukla aktif olarak çoğalan hücrelerde mevcutiken farklılaşmış dokularda bulunmaz (Galson ve Kaestner, 2016).



Şekil 5. FOXM1'ın Hücre Döngüsündeki Rolü (Galson ve Kaestner, 2016).

Bugüne kadar tanımlanmış dört insan FOXM1 izoformu vardır (Şekil 6). FOXM1a, hem Va hem de VIIa ekzonlarını içerir ve işlem aktivitesinden yoksundur, oysa üçünün geri kalanı, FOXM1b (ne ekzon Va ne de VIIa içerir), FOXM1c (VIIa içermez) ve FOXM1d (Va içermez) transkripsiyonel olarak aktiftir. FOXM1 proteini, korunmuş bir çatal başlı DNA bağlama alanı (DBD), bir N-terminal baskılayıcı alan (NRD) ve bir C-terminal işlem alanı (TAD) içerir. Murin FOXM1 ek varyantları, insan FOXM1 ile aynı DNA bağlama özgüllüğünü sergiler ve 5'-A-C/T-AAA-C/ T-AA-3' konsensüs sekansı ile DNA bağlama bölgelerine bağlanır (Liao ve ark., 2018).



Şekil 6. FOXM1 Geninin Genomik Yapısı (Liao ve ark., 2018).

FOXM1, oldukça proliferatif olan tümör hücrelerinin yanı sıra birincil olarak progenitör ve rejenere dokularda da saptanır. FOXM1'in artan ekspresyonu, yumurtalık kanseri, meme kanseri, prostat kanseri, hepatom, anjiyosarkom, kolorektal kanser, melanom, akciğer kanseri ve mide kanseri gibi çeşitli insan kanserlerinde gözlenir. Ayrıca yakın tarihli bir meta-analiz, yüksek FOXM1 ekspresyonunun çoğu katı tümörde kötü prognozla ilişkili olduğunu ortaya çıkardı (Liao ve ark., 2018).

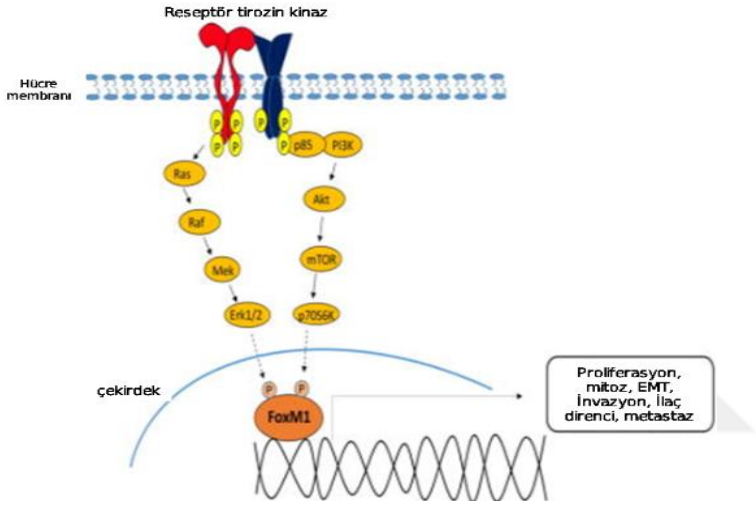
İki FOX faktörü, FOXM1 ve FOXO, ilaç direnciyle yakından bağlantılıdır ve aynı zamanda EMT'nin aracılarıdır. FOXM1'in baskılanması, kanser hücrelerinin proliferatif ve istilacı yeteneklerini engeller ve aşırı ekspresyonu, EMT indüksiyonu ile bağlantılıdır. İyi karakterize edilmiş bir EMT-indükleyici transkripsiyon faktörü olan *Slug* promotöründe birkaç FOXM1 bağlanma bölgesi tanımlanmıştır.

FOXM1 ve FOXO3, gen promotörlerinde aynı bağlanma bölgeleri için rekabet eder ve FOXO3, FOXM1 ekspresyonunu negatif olarak düzenleyebilir. FOXM1 yukarı regüle edildiğinde veya FOXO3 aşağı regüle edildiğinde, ilaç akışı, DNA onarımı ve hücre sağkalımı ile ilgili genlerin ekspresyonu etkilenir. FOXM1 transkripsiyonu, reaktif oksijen türlerindeki (ROS) bir artışla aktive edilir ve ROS ile FOXM1 ifadesi arasında bir geri besleme döngüsü oluşturur. Bu, hücre döngüsü geçiş noktalarının FOXM1 tarafından düzenlenmesine ve DNA hasarına yanıt genlerinin aşırı ekspresyonu yoluyla direncin artmasına ve DNA'ya zarar veren ajanlara karşı direncin gelişmesine yol açar. Bu kazanılmış direnç, FOXM1 tarafından indüklenen kanser kök hücreleri genişlemesine bağlı olabilir. FOXM1, dirençli kanser kök hücrelerin sayısını artırarak, ilaçları hücreden etkili bir şekilde dışarı pompalayarak ve tümör baskılayıcı olarak görev yapan genlerin ekspresyonunu aşağı doğru düzenleyerek ilaç direnci için mükemmel bir eksen oluşturur (Castaneda ve ark., 2022).

FOXM1'in fosforilasyonunu indükleyen yukarı akış kinaz sinyal yolları, transkripsiyon faktörü fonksiyonunu ve kanser hücrelerinde müteakip biyolojik etkilerini doğrudan düzenler (Şekil 7). MEK-ERK1/2, FOXM1'ın fosforilasyonunu indükler ve bazı HER2-pozitif tümörlerde ve TNBC'lerde hastalığın ilerlemesi ve mortalite ile bağlantılı olarak yapısal olarak aktive edilir. Aktif MEK sinyali,

FOXM1 fosforilasyonu, nükleer yeniden lokalizasyon ve artan transkripsiyon faktörü fonksiyonu yoluyla HER2 hedefli ajanlara karşı direnci artırır (O'Regan ve Nahta, 2018).

Ayrıca biriken kanıtlar, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin (FOXM1 dahil), nükleer faktör κB (NFkB), dönüştürücü büyüme faktörü-β (TGF-β), Notch, hipoksi ile indüklenebilir faktör gibi çeşitli sinyal yolları yoluyla EMT'nin ilerlemesini etkilediğini ortaya koymuştur (Zhang ve ark., 2021).



Şekil 7. FOXM1 yolağı (O'Regan ve Nahta, 2018)

Çok sayıda çalışma, FOXM1'in üçlü negatif meme kanseri hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli insan kanserlerinde aşırı eksprese edildiğini göstermiştir. FOXM1, meme kanserinde anjiyogenez, istila ve apoptoz ve tümör oluşumuna direnç dahil olmak üzere onkojenik süreçleri teşvik eder. 500 insan göğüs tümörünün kapsamlı bir moleküler analizini takiben, Kanser Genom Atlası (TCGA) ağı tarafından hazırlanan dönüm noktası niteliğindeki bir makale, FOXM1'in TNBC'nin en önemli moleküler sürücülerinden biri olduğunu gösterdi. Pan-kanser analizleri, FOXM1 ekspresyonunun meme kanserinde oldukça yüksek olduğunu ve ekspresyonunun onkojenik olaylara katkıda bulunabileceğini göstermiştir (Hamurcu ve ark., 2021).

2.7. Ras Sarkoma (RAS) Onkogen Ailesi

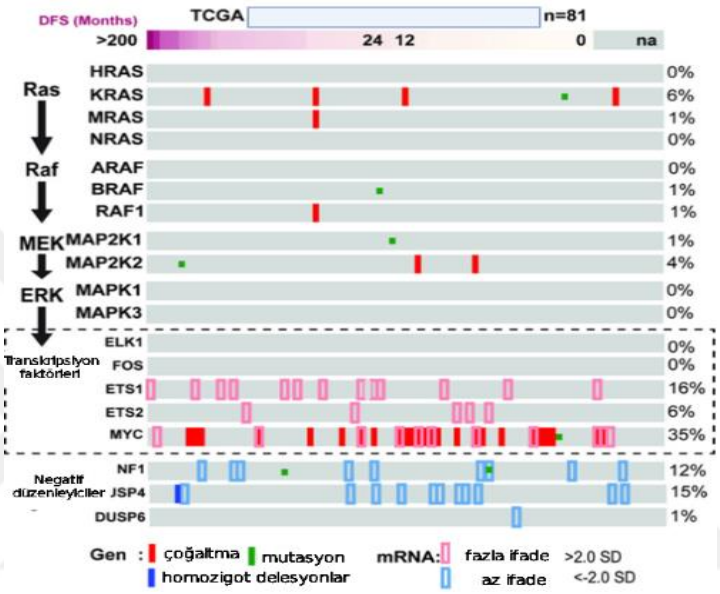
Ras sarkoma (RAS) gen ailesinde üç üye vardır: sıRASıyla 11 (11p15), 12 (12p12) ve 1 (1p22) kromozomunda yer alan H-RAS, K-RAS ve N-RAS. Bu genler tarafından kodlanan proteinler son derece homologtur ve küçük guanozin trifosfat (GTP) bağlayıcı protein (G proteini) üst ailesine aittirler. RAS genlerinin onkojenik aktivasyonuna genellikle tek nokta mutasyonu neden olur. GAP aracılı modülasyona karşı RAS tepkisini bozar ve RAS'ı ve aşağı akış yollarını kalıcı olarak aktif bir durumda kilitler (Galie, 2019; Sun ve ark, 2017). Nokta mutasyonları genellikle bu üç insan RAS geninin aşırı ekspresyonu ile ilişkilidir. RAS proteinlerinin mutasyonları meme kanserinde seyrek olmasına rağmen (<%5), RAS sinyal iletim yolundaki anormallik hem iyi huylu hem de kötü huylu meme dokularında gözlenir. H-RAS, meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu, metastazı teşvik etmek ve apoptozu inhibe etmek için B lenfoma moloney murin lösemi virüsü yerleştirme bölgesi-1 (BMI1) ile işbirliği yapabilir. H-RAS aşırı ekspresyonu, hem birincil hem de ilerlemiş meme kanseri hastalarında saptanır, bu da kötü bir prognoza işaret eder (Sun ve ark., 2017).

2.8. Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz (MAPK)

Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yollarından biri olan hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) kaskadı, proliferasyon, farklılaşma, göç, hayatta kalma ve apoptoz gibi anahtar hücresel süreçlerin merkezinde yer alan bir sinyal iletim modülüdür. Bunun deregülasyonu sıklıkla kanser gelişiminde rol oynar. MAPK basamakları, MAPK kinaz kinaz (MAPKKK veya MAP3K), MAPK kinaz (MAPKK veya MAP2K) ve MAPK jenerik terimleri altında bilinen, birbirini sırayla fosforile eden ve böylece aktive eden üç kinazdan oluşan bir çekirdek birim tarafından oluşturulur. En az altı farklı MAPK kademesi tanımlanmıştır (Rocca ve ark., 2022).

RAS'tan yayılan sinyaller, FOS, MYC, ETS-1, ETS-2 ve ELK-1 dahil olmak üzere aşağı akış transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonu yönlendirdiği Raf, MEK ve ERK1/2 (MAPK1/3 olarak da bilinir) aracılığıyla çekirdeğe aktarılır. Diğer epitelyal kanserlerin tam tersine, RAS/MAPK yolundaki aktive edici mutasyonlar meme kanserinde oldukça seyrek olaylardır. Buna rağmen, özellikle RAS/MAPK aktivitesi,

EGFR ve HER2 gibi Reseptör tirozin kinaz (RTK)'ların aşırı ekspresyonu dahil olmak üzere diğer mekanizmalar aracılığıyla anormal şekilde uyarılabilir . Anormal RAS fonksiyonunun birincil çıktısı olan yüksek ERK1/2 aktivitesi (fosforilasyon), birincil meme tümörlerine göre metastatik bölgelerde gözlenmiştir ve TNBC'de daha yaygındır (Giltnane ve Balko, 2014) (Şekil 8).



Şekil 8. TNBC sinyalleri (Giltnane ve Balko, 2014).

2.9. Nükleer Faktör Kappa B (NFkB)

Uyarılabilir transkripsiyon faktörlerinin Nükleer Faktör Kappa ß (NFkB) ailesi, tümü bir N-terminal Rel homoloji alanını (RHD) paylaşan, p50, p52, p65 (RelA), RelB ve c-Rel dahil olmak üzere beş üyeden oluşur. RHD bir nükleer lokalizasyon sekansı içerir ve sekansa özgü DNA bağlanmasından, dimerizasyondan ve IkB inhibe edici proteinlerde bulunan ankirin tekrar motifleriyle etkileşimden sorumludur (Khomgthong ve ark., 2019).

NFkB, enflamasyon ve kanserde doğrudan etkileri olan çok sayıda yolu düzenleyen bir proinflamatuar transkripsiyon faktörüdür. Çeşitli in vitro, klinik öncesi ve klinik çalışmalar, NFkB ve NFkB'ye bağımlı gen ekspresyonlarının enflamasyon, kanser ilerlemesi, metastaz ve ilaç direncinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Giderek artan sayıda literatür, NFkB yolağının aktivasyonunun meme kanserinin

tümörijenezinde yer aldığını ve hormondan bağımsız olarak ortamla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Son on yılda, birkaç fitokimyasal ve analoglarının bu kaskadın üyelerini hedefleyerek NFkB sinyali üzerinde önemli inhibitör etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Rajagopal ve ark., 2018).

2.10. Poli ADP Riboz Polimeraz (PARP)

Poli ADP Riboz Polimeraz (PARP) protein ailesi, (PARP1 ve PARP2), DNA hasarı onarımı ve programlanmış hücre ölümü dahil olmak üzere bir dizi kritik hücresel süreçte yer alır. DNA hasarı ile aktive edildiğinde, bu proteinler, DNA'yı onarmak için asıl işi yapan diğer proteinleri aktifleştirir. PARP proteinlerinin ana işlevi, DNA'daki tek sarmal kopmalarını veya çift sarmal kopmalarını tespit etmek, DNA onarım makinelerini işe almak ve DNA onarımı sırasında replikasyon çatallarını stabilize etmektir. Memeli hücrelerinde PARP ailesinin üyeleri olarak en az 17 farklı protein tanımlanmıştır; bununla birlikte, yalnızca PARP-1, PARP-2 ve PARP-3'ün DNA onarımında işlev gördüğü bilinmektedir. PARP'ın inhibisyonu, kanser hücrelerindeki DNA hasar yanıtı kusurlarından yararlanan, kanser tedavisi için yakın zamanda geliştirilmiş bir stratejidir (Arun ve ark., 2015; Oh ve ark., 2021).

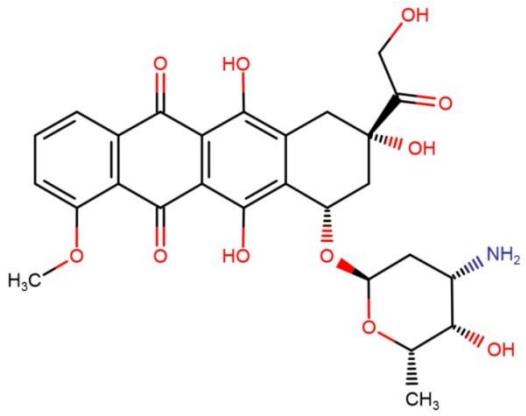
Apoptozun, kaspaz ailesi, B hücresi lösemi/lenfoma 2 (Bcl-2) ailesi, PARP ailesi, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler dahil olmak üzere çeşitli anahtar apoptotik genler tarafından sıkı bir şekilde düzenlendiğine inanılmaktadır. Aktif PARP-1 ve PARilasyon, hücre ölümüyle ilgili olanlar da dahil olmak üzere çeşitli hücresel mekanizmaları düzenler. PARilasyon ve PARP-1'in, nekroz (nekroptoz), partanatos, otofaji ve apoptoz dahil olmak üzere birkaç hücre ölümü alt programına aracılık ettiğini öne sürülmüştür (Liu ve ark., 2017).

2.11. DOKSORUBİSİN

Doksorubisin (DOX), 1967'de *Streptomyces peucetius caesius* kolonilerinden izole edilen bir antitümör antrasiklin antibiyotiktir. DOX, en çok kullanılan antitümör antrasiklinlerden biridir ve çok çeşitli neoplastik hastalıklara karşı düşük dozlarda bile oldukça aktiftir. DOX ile kanserli hayvan modellerinde gerçekleştirilen ilk in vivo çalışmalar, neoplastik proliferasyonun inhibisyonunu ve hayvan sağkalımının

arttığını göstermiştir. DOX yüksek bir terapötik indekse sahip olmasına rağmen, kardiyotoksisite nedenidir (Rivankar ve Sangeeta, 2014).

DOX, DNA baz çiftleri arasına girerek ve DNA sarmalını çözerek hareket eder, bu da DNA sentezinin inhibisyonuna ve DNA toposiomeraz II'nin normal DNA kırma ve yeniden mühürleme etkisine neden olur. Bu eylemler, hızla bölünen hücrelerin apoptozuna yol açar (Şekil 9) (Bethesda, 2012).



Şekil 9. Doksorubisinin kimyasal formülü (Bethesda, 2012)

DOX, hem yetişkin hem de çocukluk çağı kanserlerini tedavi eden ve katı tümörleri ve hematolojik maligniteleri kapsayan geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir. Sıklıkla akut lösemi, meme kanseri ve çocukluk katı tümörleri, Hodgkin ve Hodgkin olmayan lenfomalar, ve yumuşak doku sarkomlarını tedavi etmek için kullanılır. Ne yazık ki DOX oldukça etkili olmasına rağmen kanser hücrelerine karşı seçici değildir ve toksisite nedeniyle kullanımı önemli ölçüde sınırlıdır. Bu toksisite genellikle kalbi, beyni, karaciğeri ,böbrekleri etkiler. Ayrıca, bağışıklık sistemini bozar, hastanın enfeksiyona yatkınlığını artırır ve iyileşme yeteneğini zayıflatır (Meredith ve Dass, 2016).

DOX'in önemli yan etkisi olarak gösterilen kardiyotoksisitenin DOX'a bağlı patogenezinin altında yatan çeşitli moleküler mekanizmalar öne sürülmüştür; oksidatif stres, topoizomeraz II inhibisyonu, mitokondriyal disfonksiyon, $Ca2^{+}$ homeostaz düzensizliği, hücre içi demir birikimi, ardından gelen hücre ölümü (apoptoz ve nekroz), otofaji ve miyofibriler düzensizlik ve kayıp gibi mekanizmalardır (Syahputra ve ark., 2022).

Ayrıca, DOX, hem sitozolik hem de mitokondride iyi bilinen güçlü bir ROS üretecidir. Enzimatik bir yolağa giren DOX, tersinir bir oksidasyon sürecinden geçer ve süperoksit radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin üretimine yol açan nikotinamid adenin dinükleotit fosfat hidrojen (NADPH) redüktazlar enzimi tarafından katalize edilen bir ara madde olarak bir semikinon formu üretir. Enzimatik olmayan yöntemde DOX, Ferrik iyona (Fe^{+3}) bir elektron verir ve Ferrous (Fe^{+2})-DOX kompleksinin oluşumuyla sonuçlanır. Oluşan kompleks oksijen ile indirgenmeye uğrar ve hidrojen peroksit ve süperoksit gibi ROS üretir, bu da oksidatif strese neden olur. Üretilen ROS, hem kanser hem de normal hücrelerde membran hasarına, DNA hasarına, lipid peroksidasyonuna neden olur ve apoptotik yolları aktive eder ROS etkileri, kardiyomiyositlerin apoptozisine yol açar. (Prasanna ve ark.,2020; Syahputra ve ark., 2022).

DOX'in ayrıca ROS üretimi yoluyla NFkB'yi aktive ettiği gösterilmiştir ve bu, FasL, c-Myc ve p53 dahil olmak üzere çeşitli pro-apoptotik genlerin düzenlenmesine yol açar. Ayrıca DOX, NFkB transkripsiyon faktörünü düzenleyen ubikuitin proteazom sistemini aktive edebilir ve NFkB'nin aşırı aktivasyonu, çeşitli tümör tiplerinde gösterilen birçok hücre fonksiyonunda artışa yol açar (Pilco-Ferreto ve ark., 2016).

2.12. FLAVONOİD

Tüm doğal polifenollerin %60'ını temsil eden bir grup olan flavonoidler, çiçek ve yapraklar başta olmak üzere bitkilerin tüm kısımlarında bulunur. Yapılarına göre flavonoidler, antoksantinler (flavonlar ve flavonoller), flavanonlar , flavanoller, izoflavonoidler ve antosiyanidinler dahil olmak üzere farklı alt gruplara ayrılabilir (Madunić ve ark., 2018).

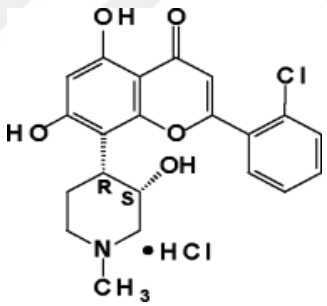
Flavonoidlerin, bağışıklık hücrelerinin ve sonraki kemokinler ve sitokinlerin aktivasyonunu inhibe ettiği ortaya çıktı, bu nedenle doğal bir inhibitör olarak ölçülebilir, doğuştan gelen ve adaptif bir bağışıklık sisteminin aktivasyonunu durdurabilir (Rahmani ve ark., 2022). Flavonoid türevleri, bazı bitkilerde ve baharatlarda anti-inflamatuar, anti-oksidan ve anti-kanser aktiviteleri dahil olmak üzere biyolojik etkiler göstermek için etkili bileşenler olarak bulunur. Bazı diyet flavonoidleri, kinaz aktivite inhibisyonu, apoptoz indüksiyonu ve sinyal

iletim yolaklarının baskılanması gibi özelliklere dayalı olarak olumlu antitümör aktivitelere sahiptir (Shao ve ark., 2016).

2.12.1. FLAVOPİRİDOL

Flavopiridol (NSC649890; (–) *cis* –5,7-dihidroksi-2-(2-klorofenil)-8[4-(3-hidroksi-1-metil)-piperidinil)-4H-1-benzopiran-4-1), başlangıçta Hindistan'a özgü bir Hint ağacı *Dysoxylum binectariferum*'un gövde kabuğundan izole edilmiş, doğal olarak oluşan bir flavon türevinin sentetik analoğudur (Şekil 10). İlk olarak 1980'lerin sonlarında, epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) fosforilasyonunu inhibe eden doğal ürün olarak keşfedildi. 1990'ların ortalarında Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından yapılan 60 insan kanser hücre hattı panelinde, flavopiridolün güçlü bir hücre büyümesi inhibitörü olduğu gösterildi.

Sentetik bir antitümör flavon türevi olan flavopiridolün, siklin bağımlı kinaz (CDK)'lerin inhibisyonu yoluyla G1 veya G2 aşamasında hücre döngüsü ilerlemesini önemli ölçüde engellediği bildirilmektedir (Shao ve ark., 2016; Zeidner ve Karp; Newcomb, 2004).



Şekil 10. Flavopiridolün kimyasal formülü (Zeidner ve Karp, 2015).

Ayrıca, yapılan bir çalışmada, flavopiridolün, fare makrofajı ANA-1 hücrelerinde hücre içi ROS'u artırarak, MAPK yolunu düzenleyerek ve ardından Bcl-2 ifadesini kısıtlayarak hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (Rahmani ve ark.,2022).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Sunulan tez çalışması Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1. GEREÇLER

3.1.1.Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri

− Laminar Akım Kabini (Clean Air)

− CO2'li İnkübatör (Sanyo, MCO-19 A/C (UV))

− Soğutmalı Santrifüj (Beckman Counter, Cat. No. 369436)

− Hassas Terazi (Mrc) − Su Banyosu (Nüve St 30)

− Çalkalayıcı (Heidolph)

− Derin Dondurucu (Uğur, Kod. No. 100703000000)

− Buzdolabı +4 (Siemens, No. KG57NVW20N)

− Invert Mikroskop (Leica)

− Otoklav (Alp, CL-40M)

− Pipet Tabancası (Gilson)

− Mikropipet Seti (Gilson)

− Vorteks (Heidolph)

− Manyetik Karıştırıcı (Heidolph)

− Eliza-Reader (Glomax-Multi)

− Muse Cihazı (Milipore)

−BioRad Western Görüntüleme Cihazı

−Akan Hücre Ölçer Cihazı (Flow Sitometri)

3.1.2.Kullanılan Kitler ve Sarf Malzemeler

− Annexin V Apoptoz Kiti (Milipore MCH100105)

− MTS Reagent Powder (Biovision, 2808-250)

− DCTM Protein Assay Kit (BioRad)

− ReadyPrep Protein Extraction Kit (BioRad)

− Muse cell cycle Reagent (Milipore)

− ECL (BioRad)

− Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) (Gibco)

− Fetal Bovine Serum (FBS) (Capricorn Scientific)

− L-Glutamin (Capricorn Scientific)

− Penisilin/Streptomisin (Capricorn Scientific)

− Tripsin-EDTA (Capricorn Scientific)

− Hücre Kültür Flaskları 25 cm2 (Greiner CellStar)

− Hücre Kültür Flaskları 75 cm2 (Greiner CellStar)

− 6'lı, 96 kuyucuklu Kültür plakaları (Greiner CellStar)

− Serolojik Pipetler 5ml, 10ml, 25ml (Greiner CellStar)

− Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck)

− Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline(DPBS) (Capricorn Scientific)

− Metanol (Merck)

− Tris (Merck-Milipore)

− Non-Fat Dry Milk (BioRad)

− Membran (BioRad)

−Flavopiridol (Sigma-Aldrich)

− Doksorubisin (Sigma-Aldrich)

3.2.YÖNTEM

3.2.1.Kullanılan Hücre Hattı

Daha önceki projelerimizden American Type Culture Collection (ATCC) firmasından ticari olarak satın alınan ve çoğaltılıp azot tankında muhafaza edilen MDA-MB-231 ve BT-549 TNBC hücreleri kullanıldı.

MDA -MB-231 hücre hattı (MD Anderson'da invaziv duktal karsinomlu bir hastanın plevral efüzyonundan izole edilmiştir) yaygın olarak geç evre meme kanserini modellemek için kullanılır. Bu hücre hattı ER, PR ve E-cadherin negatiftir ve mutasyona uğramış p53'ü ifade eder. Hücreler ayrıca büyüme faktörü reseptörü HER2'den de yoksun olduklarından, TNBC için iyi bir model oluştururlar (Welsh, 2013).

BT-549 hücre hattı, 7 bölgesel lenf nodundan 3'üne metastaz yapmış papiller, invaziv bir duktal tümörden izole edilen epitel hücreleridir. Hücreler, 72 yaşında, beyaz, kadın bir meme kanseri hastasından elde edilmiştir. Bu hücre hattı ER, PR ve HER2'den yoksun, TNBC'dir. Mutant p53 ve PTEN homozigot delesyonu taşımaktadır (Chavez ve ark., 2010).

3.2.2.Hücre Kültürü

Besiyerinin Hazırlanması

500 ml olan Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisine, 55 °C'de inaktive edilen 50 ml FBS, 5 ml L-Glutamin ve 5 ml Penisilin/Steptomisin eklenerek hücreler için uygun besiyeri hazırlandı ve +4°C'de muhafaza edildi. MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinin çoğaltılması için kullanıldı.

Hücrelerin Çoğaltılması ve Dondurulması

Tüm hücre kültür çalışmaları steril laminar hava akımlı kabinde yapıldı. -196°C sıvı azot tankından MDA-MB-231 ve BT-549 hücreleri alındı ve su banyosunda 37°C'ye ulaşması sağlanan besiyeri ile yıkanarak 15 ml'lik falkon tüplerde, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldıktan sonra hücreleri barındıran pellet besiyeri ile çözündürülerek, yoğunluğuna göre 75 cm^2 'lik flasklara ekildi. Hücrelerin çoğalma durumu, inverted mikroskop ile incelendi ve hücre yoğunluğu kültür kabının tabanında %80-90'ına ulaştığında pasajlama işlemi yapıldı. 75 cm^2 'lik flasklarda bulunan besiyeri serolojik pipet ile uzaklaştırıldı. Flasklara, 3 ml tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 3 dakika kadar hücrelerin flask tabanından ayrılmaları için 37 °C'lik CO_2'li etüvde bekletildi. Tripsin EDTA solüsyonu üzerine toksisiteyi azaltmak için 6 ml besiyeri eklendi ve flask tabanı serolojik pipet yardımıyla yıkandı, toplanan süspansiyon 15 ml'lik falkon tüplere alınarak santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet çözdürüldü ve medyum içeren yeni flasklara bölünerek ekildi. Hücreler çoğalmaları için uygun olan 37 °C'lik CO_2'li etüvde inkübe edildi.

3.2.2.1.Hücre Sayımı

Yapılan deneylerde deneyin amacına uygun farklı sayılarda hücreler kullanıldı. Hücrelerin besiyeri içerisinde total miktarını hesaplamak için, mililitredeki sayısı thoma lamı kullanılarak belirlendi. Hücre tabanından Tripsin-EDTA ile kaldırılıp santrifüj edilen hücrelerin pelleti besiyeri içinde süspanse hale getirildi. Thoma lamına her iki tarafa hücre süspansiyonu içerisinden 10µl kondu. Mikroskop kullanılarak thoma lamının belirli olan bölgelerinde hücreler sayıldı. Yapılan hücre sayısının ortalaması alınarak '1 ml'deki total hücre miktarı=sayılan bölgelerin ortalaması*10^4 hesaplandı.

3.2.3. Kimyasalların Hazırlanması

Satın alınan Flavopiridol ve DOX üretici frmanın talimatlarına göre Tablo1'de verilen çözücüler kullanılarak hazırlandı.

Tablo 1. Kimyasal/çözücü miktarları

Kimyasal Adı	Kimyasal Moleküler Ağırlığı	Kimyasal Miktarı	Çözücü Miktarı (dH2O)
Doksorubisin	579.98 g/mol	5.7998 mg	1 ml
Flavopiridol	438.30 g/mol	1.0958 mg	25 ml

3.2.3.1.Doksorubisin Solüsyonu

DOX, Tablo1'de belirtilen çözücü ile çözdürülerek homojen bir stok solüsyon haline getirildi. Hazırlanan stok solüsyonu -20°C'de saklandı. Deneylerde kullanlan konsantrasyonlar stok solusyonun FBS(-) ile seyreltilmesiyle hazırlandı.

3.2.3.2.Flavopiridol Solüsyonu

Flavopiridol, Tablo1'de belirtilen çözücü ile çözdürülerek homojen bir stok solüsyon haline getirildi. Hazırlanan stok solüsyonu +4°C'de saklandı. Deneylerdeki kullanımı için uygun konsantrasyonlar stok solusyonunın FBS(-) ile seyreltilmesiyle elde edildi.

3.2.4.Hücre Canlılık Analizi

Hücre canlılık oranını belirlemek için MTS/PMS analizi kullanıldı. MTS (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum) boyası (Promega, Madison, WI), Fenazin metosülfat (PMS) varlığında kültür ortamında çözünen formazan ürününe dönüşür. Böylece sarı olan MTS boyası, mavi-mor renge dönüşür ve 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılabilir.

MTS analizi için MDA-MB-231 ve BT-549 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara 100 µl içinde 1500 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler 100, 200, 300, 500 nM tek başına Flavopiridol, 1, 3, 5, 8, 10 µM tek başına DOX ve 500 nM flavopiridol ve 10µM DOX kombinasyonu (MTS analiz sonuçlarımıza göre hücrelerin yaklaşık %50'sinin öldüğü konsantrasyon) ile 24 saat muamele edildi. Kontrol grubu olarak hiçbir uygulamanın yapılmadığı muamelesiz MDA-MB-231 ve BT-549 hücreleri kullanıldı. Hücrelerin 24 saat olan ilaçla inkübasyon süreleri dolduğunda MTS/PMS solüsyonları taze olarak hazırlandı ve her kuyucuğa 20 µl eklenilerek 37 °C'lik

CO_2'li etüvde boyanması süresi için 2-3 saat bekletildi. Daha sonra, Eliza-Reader cihazında 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.

3.2.5. Koloni Analizi

Koloni oluşumu deneyi, kanser hücrelerinin gösterdiği yaygın bir özellik olan koloni oluşturma eğilimlerinin test edilmesi için kullanılan yöntemlerden biridir.

MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinin sayımı yapıldı ve 6 kuyucuklu plakalara 2000 µl içinde 1500 hücre olacak şekilde ekimi yapıldı. Hücreler inkübasyonlarının 48.saatinde flavopiridol için 50, 100, 300, 500, 600 nM, DOX için 25, 50, 100, 250, 500 µM konsantrasyonlarda ve 10µM DOX ve 500 nM flavopiridol konsantrasyonlarında kombin olarak muamele edildi. Kontrol grubu olarak muamelesiz MDA-MB-231 ve BT-549 hücreleri kullanıldı. İnkübasyon devam ederken her gün mikroskop altında hücrelerin çoğalması incelendi ve kontrol olarak kullanılan hücrelerin çoğaldığı plakanın yüzeyini yaklaşık %85-90 oranında kapladığında (yaklaşık 10-15 gün sonra) deney sonlandırıldı. Hücreler metanol içeren %5'lik kristal viyole ile 5 dakika boyandı ve daha sonra distile su ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakıldı. Kuyucuklar fotoğraflandı ve her bir kuyucuktaki koloniler sayıldı.

3.2.6. Apoptoz Analizi

Apoptoz analizi için Annexin V Apoptosis Detection Kiti kullanılarak flow sitometri cihazında analiz yapıldı. Hücreler 96 kuyucuklu plakaya besiyeri içerisinde 1500 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler 100, 200, 300, 500 nM konsantrasyonlarda flavopiridol, 1, 3, 5, 8, 10 µM konsantrasyonlarda DOX, 500 nM flavopiridol ve 10µM DOX kombinasyonu ile 24 saat muamele edildi. 24 saatlik inkübasyon sonrası hücreler 50 µl Tripsin-EDTA ile 3-4 dakika muamele edildi ve daha sonra hücrelerin üzerine 180 µl medya eklendi ve 400 g'de 5 dakika santrifüj edilerek hücrelerin tabana çökmesi sağlandı. Üst medya uzaklaştırıldıktan sonra 100 µl binding buffer eklendi ve tekrar santrifüj edildi. Süpernatant aspire edildi. Kit içeriğine göre, 20 µl binding buffer, 1 µl Annexin V boyası, 1 µl 7AAD boyaları ile karışım hazırlandı ve her bir örneğe 20 µl karışımdan ilave edildi 15 dakika karanlık ortamda inkübe

edildi. Daha sonra Flow sitometri cihazında ölçüm için 200-300 µl binding buffer eklenerek analiz yapıldı.

3.2.7. Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsü deneyi, G0/G1, S, G2/M fazlarında bulunan hücrelerin sayısını gösteren bir yöntemdir. Bu analiz, ticari olarak satın alınan Milipore Cell Cycle Kiti kullanılarak muse cihazında yapıldı. Her örnek için 25 cm²'lik her bir flaskta 4 ml besiyerinde 550.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler ekildikten sonra 37°C %5 CO_2'li inkübatör inkübe edildi. MTS analizi ile belirlenmiş olan hücrelerin yaklaşık %50'sinin öldüğü konsantrasyonlarda, 10µM DOX ve 500 nM flavopiridol tek başına ve aynı dozlarda kombinasyon olarak 24 saat muamele edildi. Bir örnek muamelesiz olarak bırakıldı. 24 saat sonra hücre kültürü sonlandırıldı ve hücreler toplandı. Toplanan hücreler santrifüj edildi ve her bir örnek için 100.000 hücre epondorf tüpe alındı ve, 300 g'de 5 dakika PBS solüsyonu ile iki defa yıkama yapıldı, santrifüj edildi. Daha sonra hücrelere 200 µl %70'lik etanol eklendi ve -20°C'de bir gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tekrar PBS ile yıkama yapıldı ve her örneğe 200µl Muse cell cycle reagent eklendi ve oda sıcaklığında, karanlık ortamda 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi dolunca Muse cihazında hücre döngüsü analizi yapıldı.

3.2.8. Western Blot Analizi

Western blot deneyi, örneklerde bulunan hedef proteinlerin ekspresyon seviyelerini tayin etmek için kullanılan bir yöntemdir.

Hücreler 25 cm²'lik her bir flaskta 4 ml besiyeri içerisinde 350.000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler ekildikten sonra 37°C %5 CO_2'li bir inkübatörde inkübe edldi. Sonra hücreler, 10µM DOX, 500nM flavopiridol ile tek başına ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyon olarak 24 saat muamele edildi. Bir örnek muamelesiz olarak bırakıldı. İnkübasyon süresi tamamlandığında hücre kültürü sonlandırıldı ve hücreler 2 ml Tripsin-EDTA ile flasktan kaldırılarak toplandı. Toplanan hücreler 15 ml'lik falkonlara alınıp 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve ardından süpernatant aspire edildi. DPBS eklenen pellet 5000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi yapıldı.

Daha sonra hücrelerin parçalanmasını ve proteinlerin izolasyonunu sağlayan 1 birim sodyum florür (NaF), 10 µl proteaz inhibitörü ve 10 µl fosfataz inhibitörü içeren hücre lizis solüsyonu hazırlandı. 80-100 µl lizis solüsyonu hücrelere eklendi ve 13000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek hücrelerden protein izolasyonu sağlandı.

Protein konsantrasyonunu hesaplamak için santrifüj sonrası elde edilen proteinler, 2 µl protein ve 12 µl dH_2O eklenerek dilüsyon işlemi yapıldı. Dilüe edilen proteinler ve protein standartları 96 kuyucuklu plakalara 5 µl olacak şekilde dağıtıldı. Tüm örneklere önce 980 µl Reagent A ve 20 µl Reagent S karışımından 20'şer µl, sonrasında Reagent B'den 175 µl eklenerek 3 dakika çalkalayıcıda karışması sağlandı. Daha sonra, Elisa Reader cihazında 750 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapıldı. Yapılan ölçüme göre her bir örnekten 40 µg protein içerecek şekilde jele yüklemek için hazırlandı.

Sonra, her örnekten 40 µg olacak şekilde yürütme tamponu içerisinde bulunan jelin her bir kuyucuğuna yükleme yapıldı ve elektrikli ortamda 2-3 saat kadar yürütüldü. Bu işlem proteinlerin büyüklüklerine göre ayrışmasını sağladı. Yürütme aşaması bittikten sonra proteinlerin jelden PVDF membrana transferini sağlamak için western blot sandviç yöntemi ile transfer tamponu içerisinde +4°C'lik soğuk odada ve 24 mA akım ile bir gece boyunca tranfer edildi.

Transfer sonrasında membranlar süt tozu ve TBS-T solüsyonu karışımı ile bloklandı ve tekrarlı olarak yıkamaları yapıldı. Protein tayini için hazır hale gelen membranlara, hedeflediğimiz proteinlerin (Tablo2) ekpresyon düzeylerini belirlmek için primer antikorlar ile 16-18 saat süreyle 350 mg süt tozu ve 7 ml TBS-T solüsyonu içerisinde +4°C'lik soğuk odada muamele edildi. Muamele sonrasında tekrarlı olarak TBS-T ile yıkanan membranlar, 1 saat sekonder antikor ile 350 mg süt tozu ve 7 ml TBS-T solüsyonu içerisinde oda sıcaklığından muamele edildi. Tekrar yıkaması yapıldıktan sonra ECL solüsyonu ile ChemiDoc MP görüntüleme cihazında membran üzerindeki bant görüntüleri alındı. Örneklerin yükleme kontrolü için ß-actin proteini kullanıldı. Bant görüntülerinin yoğunluk analizi için Image J programı kullanıldı.

Tablo 2. Primer antikorlar

Primer Antikor	Marka
FOXM1	Cell Signaling (CAT: 5436T)
MAPK(ERK1/2)	Cell Signaling (CAT: 4695T)
k-RAS	Proteintech (CAT: 12063-1-AP)
NfkB	Proteintech (CAT: 13371-1-AP)
Cleaved PARP	Elabscience (CAT: E-AB-22074)
PARP1	Proteintech (CAT: 13371-1-AP)
ß-actin	Proteintech (CAT: 60008-1-Ig)

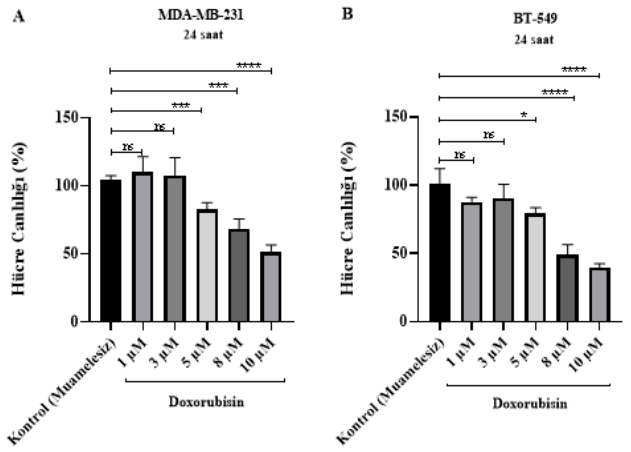
3.2.9.İstatistiksel Analiz

Deneyler sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi Graphpad Prism 8.0 programı ile yapıldı. Verilerin analizleri için Student t testi kullanıldı. P değeri 0.05'in altında olan veri sonuçları istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Deneyler 3 tekrarlı çalışıldı.

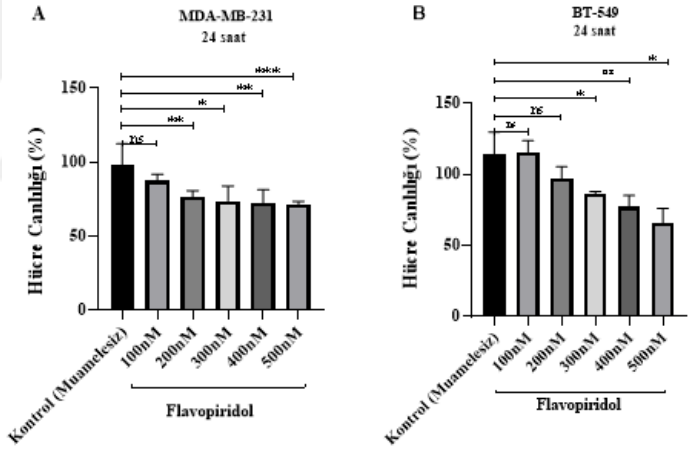
4.BULGULAR

4.1 DOX , flavopiridol ve kombinasyonun MDA-MB-231 ve BT-549 kanseri hücrelerinin canlılığına/çoğalmasına etkisi

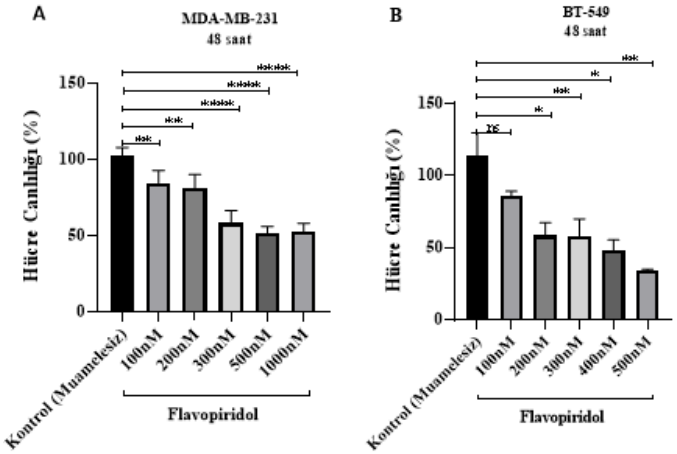
Öncelikle hücrelerin yaklaşık %50'sinin öldüğü doz ve zaman aralığını belirlemek için MDA-MB-231 ve BT-549 hücreleri, DOX için 1, 3, 5, 8, 10 μM ve flavopiridol için 100, 200, 300, 400, 500 nM ile 24 ve 48 saat boyunca muamele edildi. Hücrelerin bir kısmı muamelesiz bırakıldı. Hücrelerin inkübasyon süresi dolduğunda MTS solüsyonu ile boyanan hücreler Elisa cihazında ölçüldü. MTS analizi sonuçlarına göre, MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde, DOX için 24 saat 1-10 μM dozlarda artan doz konsantrasyonuna bağlı olarak kontrol hücrelerine göre hücre canlılığı/proliferasyonunda önemli bir azalma bulundu. Flavopiridol için 24 saat ve 48 saat süren muamele edilen MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre, 100-500 nM dozlarda artan doz konsantrasyonuna bağlı olarak kontrol hücrelerine göre hücre canlılığı/proliferasyonunda azalma bulundu (Şekil 11, 12, 13).



Şekil 11. 1-10 µM konsantrasyonlarda 24 saat DOX uygulanan MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde hücre canlılık oranı. A) MDA-MB-231 hücrelerinde 8 ve 10 µM dozlarda kontrol grubu hücrelerine kıyasla hücre canlılığında yaklaşık %50 oranında azalma bulundu (***p<0.0005; ****p<0.0001). **B)** BT-549 hücrelerinde 24 saat 1-10 µM DOX ile muamele edilen hücrelerde kontrol grubu hücrelerine kıyasla 8 ve 10 µM dozlarda %50 oranda azalma bulundu (*p<0.02; ****p<0.0001).



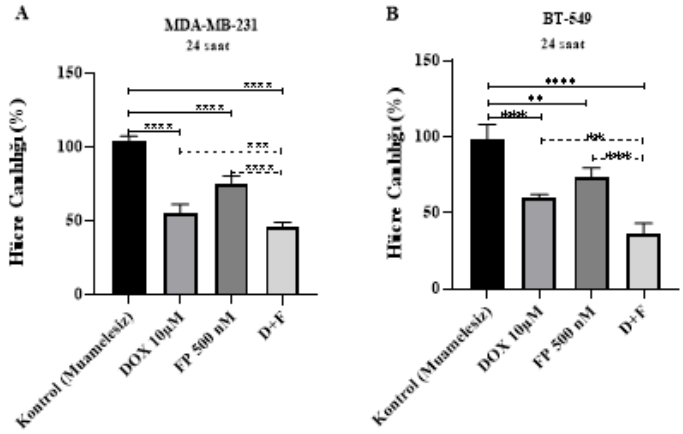
Şekil 12. 100-1000 nM konsantrasyonlarda 24 saat flavopiridol uygulanan MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde hücre canlılık oranı. A) 24 saat flavopiridol ile muamele edilen hücrelerde kontrol hücrelere kıyasla 500 nM dozda IC50 oranına yakın bir azalma bulundu (*p<0.05; **p<0.001; ***p<0.0001). B) 24 saat flavopiridol ile muamele edilen hücrelerde 300 ve 500 nM dozlarda, kontrol hücrelere kıyasla IC50 oranına yakın oranda azalma bulundu (*p<0.05).



Şekil 13. 100-500 nM konsantrasyonlarda 48 saat flavopiridol uygulanan MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde hücre canlılık oranı. A) 48 saat flavopiridol ile muamele edilen hücrelerde 300, 500, 1000 nM dozlarda, kontrol hücrelere kıyasla IC50 oranında azalma bulundu (**p<0.05; ****p<0.0001). B) 48 saat flavopiridol ile muamele edilen hücrelerde 200, 300, 500 nM dozlarda, kontrol hücrelere kıyasla IC50 oranında azalma bulundu (*p<0.05; **p<0.001).

MTS analiz sonuçlarımıza göre 24 saat 10 µM konsantrasyonda DOX uygulanan hücrelerde, her iki hücre hatında %50'ye yakın hücre canlılığı olduğu bulundu. Her iki hücre hattında 24 saat 500 nM flavopiridol uygulanan hücrelerde, hücrelerin yaklaşık olarak %65'e yakın oranda hücre canlılığı olduğu bulundu. Bu yüzden DOX ve flavopiridol ile kombinasyonunun etkisini analiz etmek için 24 saat 10µM DOX ve 24 saat 500nM flavopiridol konsantrasyonları uygun bulundu.

MDA-MB-231 ve BT-549 hücreleri, DOX ve flavopiridol kombinasyonunun hücre canlılığına etkisini incelemek için 10 µM DOX ve 500 nM flavopiridol ile tek başına ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyon olarak 24 saat muamele edildi. Analiz sonuçlarımıza göre, kontrol hücrelerine kıyasla D+F kombinasyonun tek başına DOX ve tek başına flavopiridol uygulanan hücrelere göre hücre canlılığının önemli oranda azaldığı bulundu (Şekil 15). Ayrıca sonuçlarımız, D+F kombinasyonunun her iki hücre hattında da tek başına DOX ve flavopiridol kullanımına göre daha etkili olduğu bulundu (Şekil 15).

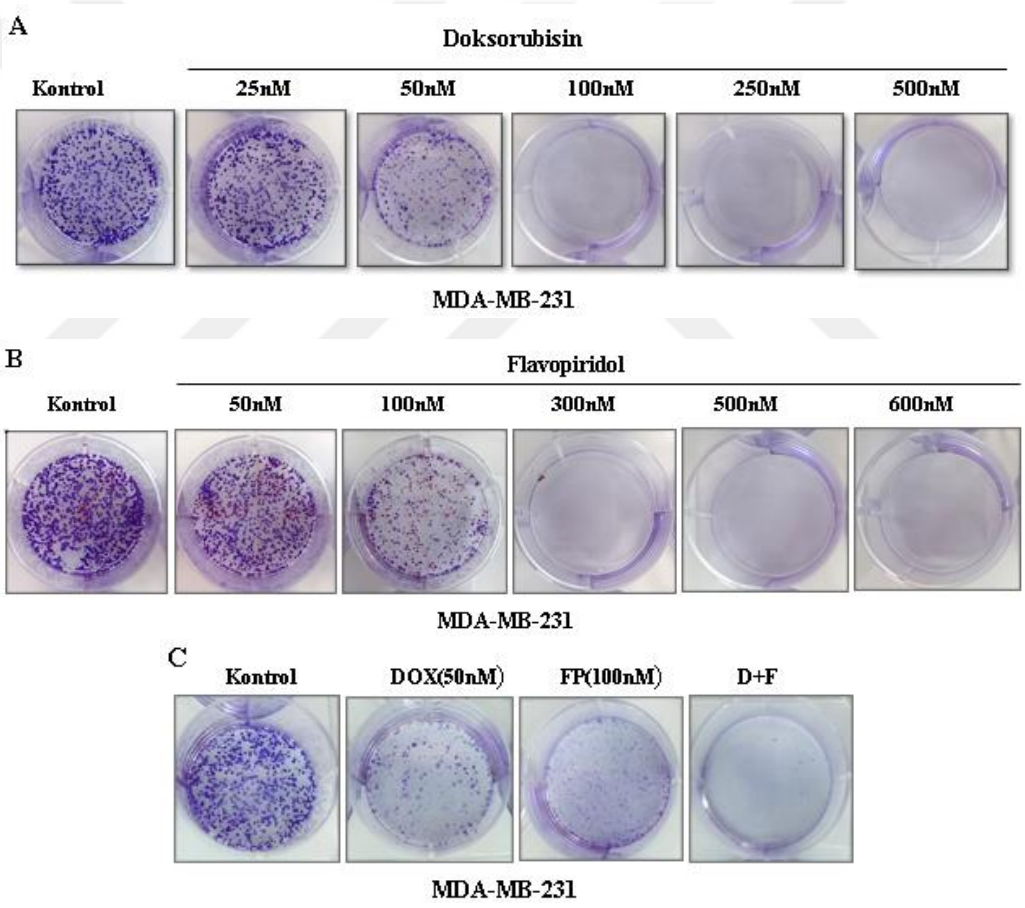


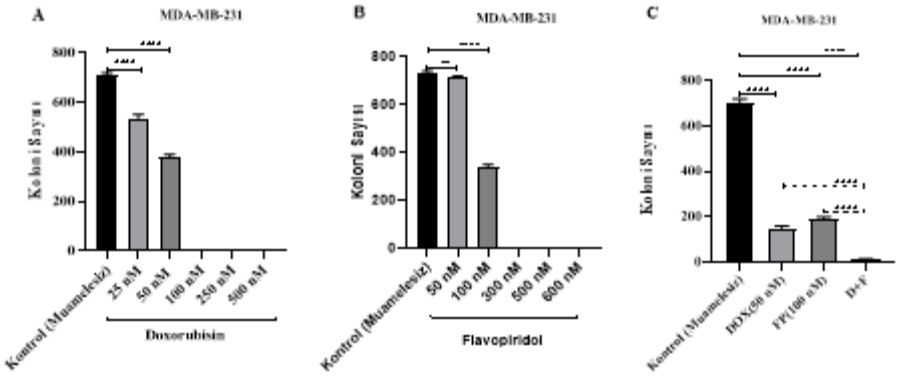
Şekil 14. MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde 10 µM DOX, 500 nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonun hücre canlılığına oranı. A) MDA-MB-231hücrelerinde 10 µM DOX, 500 nM Flavopiridol ve 10 µM DOX+500 nM Flavopiridol kombinasyonu ile 24 saat muamelesi sonucu, kontrole kıyasla %45-75 oranlarında azalma bulundu (****p<0.0001). D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde, 10 µM DOX ve 500 nM flavopiridole kıyasla hücre proliferasyonunda azalma bulundu (***p<0.009; ****p<0.0001). (B) BT-549 hücrelerinde 10 µM DOX, 500 nM flavopiridol ve 10 µM DOX+500 nM Flavopiridol kombinasyonu ile 24 saat muamele edilen hücrelerde kontrole kıyasla hücre proliferasyonunda %35-75 oranında azalma bulundu (**p<0.05; ***p<0.005; ****p<0.0001). D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde, 10 µM DOX ve 500nM flavopiridol uygulanan hücrelere göre hücre proliferasyonunda azalma bulundu (**p<0.005; ***p<0.003). (FP:Flavopiridol, D+F: DOX ve Flavopiridol kombinasyonu).

4.2. DOX, flavopiridolün ve kombinasyonun MDA-MB-231 ve BT-549 kanseri hücrelerinin koloni oluşumuna etkisi

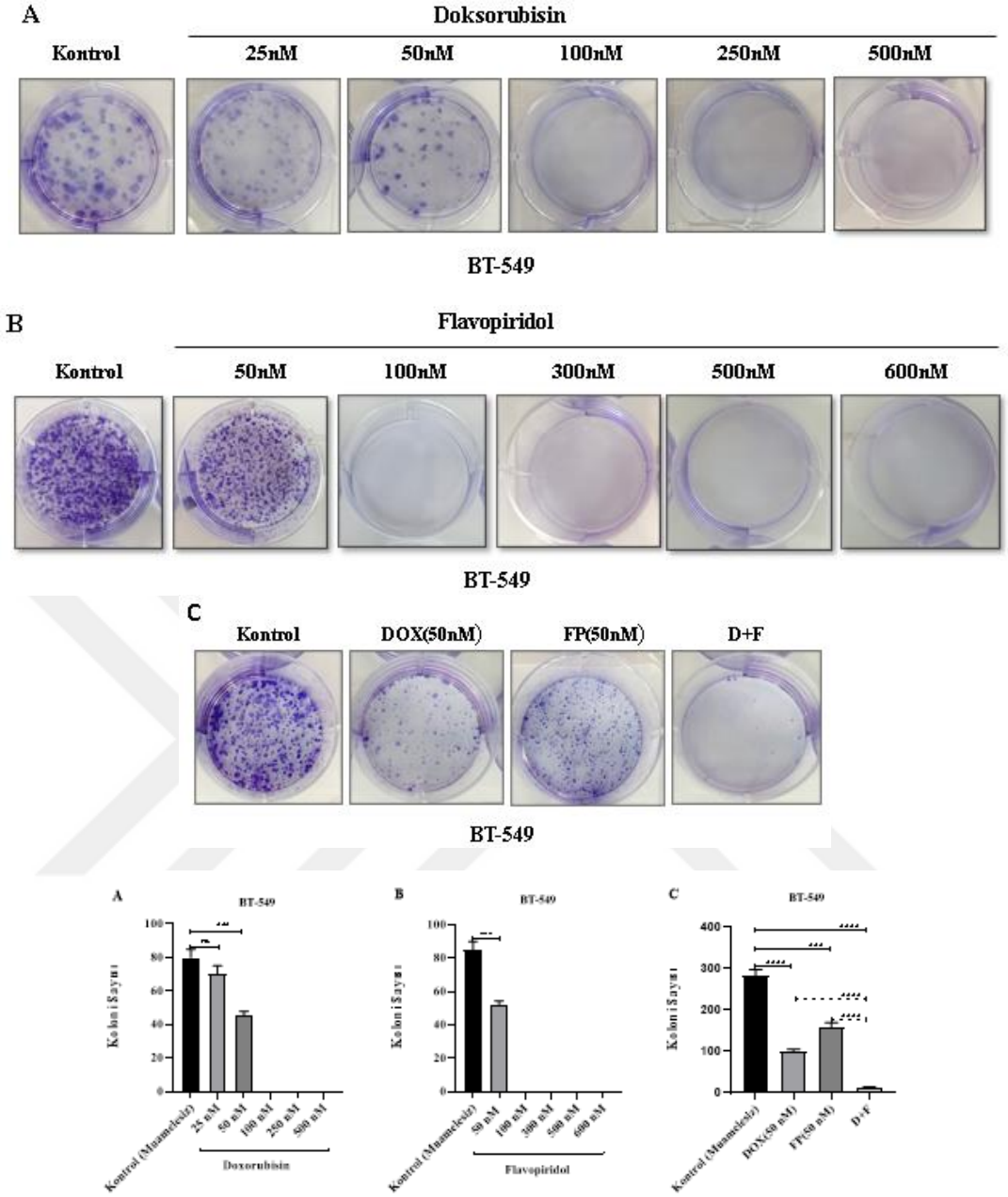
MDA-MB-231 ve BT-549 hücreleri 2 ml medyum içeren 6 kuyucuklu plakaların herbir kuyucuğuna 1500 hücre olacak şekilde ekildi ve DOX için 25, 50, 100, 250, 500 nM konsantrasyonlarda, flavopiridol için 50, 100, 300, 500, 600 nM konsantrasyonlarda muamele edildi. Muamelesiz kontrol hücreleri kuyucuğun tabanını yaklaşık %85-90 oranında doldurduğunda kültür sonlandırıldı. Daha sonra DOX ve flavopiridol maddelerinin kontrole kıyasla %50 azalma görülen dozları ile kombin muamelesi yapıldı. MDA-MB-231 hücreleri için uygun bulunan dozlarda, 50nM DOX ve 100nM flavopiridol, tek başına ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyon olarak muamele edildi. BT-549 hücreleri için uygun bulunan dozlarda, 25nM DOX ve 50nM flavopiridol, tek başına ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyon olarak muamele edildi. MDA-MB-231 hücrelerinde 50nM DOX

uygulanan ve 100nM flavopiridol uygulanan hücrelerde yaklaşık %50 oranında koloni oluşumunda azalma bulundu. %50 oranında azalma gösteren konsantrasyonlar sonrasında artan konsantrasyonlarda koloni oluşumu bulunmadı. BT-549 hücrelerinde 50nM DOX ve 50nM Flavopiridol uygulanan hücrelerde yaklaşık %50 oranında koloni oluşumunda azalma bulundu. %50 oranında azalma gösteren konsantrasyonlar sonrasında artan konsantrasyonlarda koloni oluşumu bulunmadı. Her iki hücre hattında da D+F kombinasyon uygulamasında, kontrol, 10 µM DOX ve 500 nM flavopiridol uygulamasına kıyasla koloni oluşumunda azalma bulundu (Şekil 15, 16).





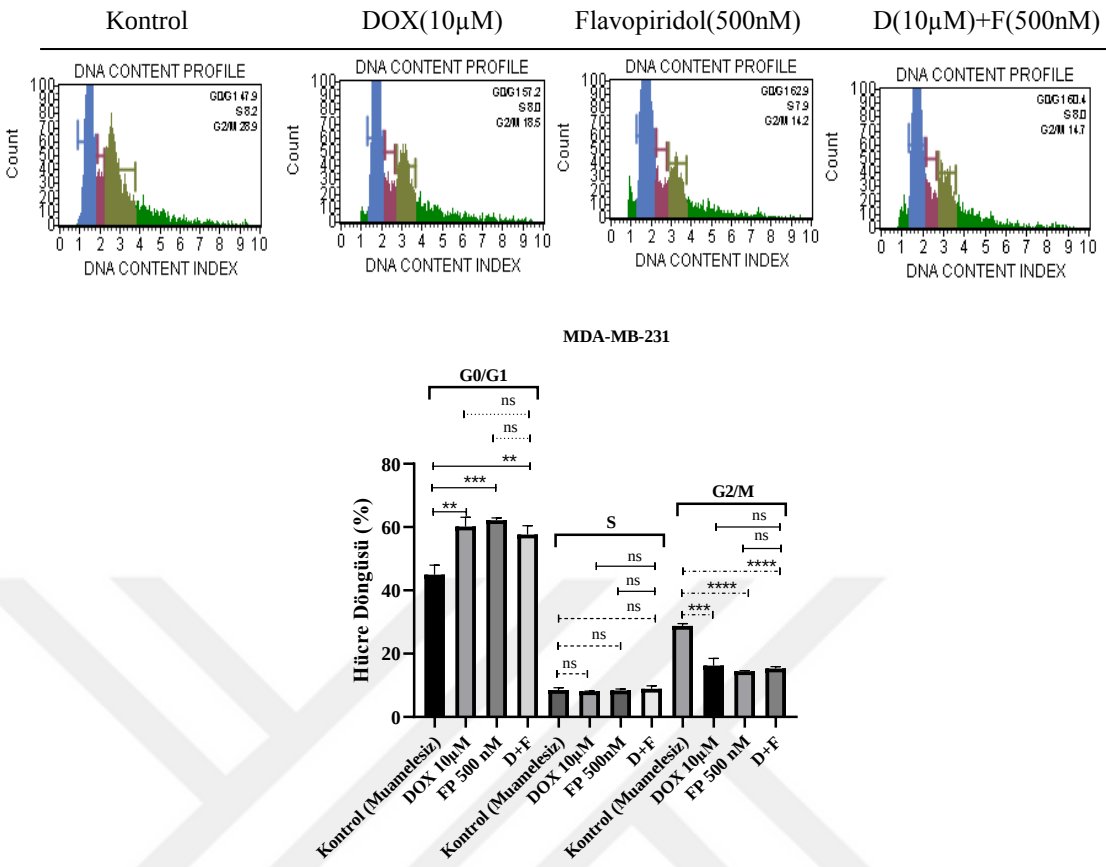
Şekil 15. MDA-MB-231 hücresinin 25-500nM artan konsantrasyonlarda DOX, 50-600nM artan konsantrasyonlarda flavopiridol ve kombinasyon uygulaması sonucu koloni sayısı. A) MDA-MB-231 hücresi 25-500 nM artan konsantrasyonlarda DOX muamelesi sonucu koloni oluşumunda, muamelesiz kolonilere kıyasla tüm dozlarda azalma bulundu (****p<0.0001). B) MDA-MB-231 hücresi 50-600 nM artan konsantrasyonlarda flavopiridol muamelesi, muamelesiz hücrelere kıyasla tüm dozlarda koloni oluşumunda sayısında azalma bulundu (**p<0.05; ****p<0.0001). C) MDA-MB-231 hücrelerinde 10µM DOX, 500nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonlarının 24 saat muamelesi sonucu kontrole kıyasla koloni oluşumunda azalma bulundu (****p<0.0001). D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde 10µM DOX ve 500nM flavopiridol uygulanan hücrelere kıyasla koloni oluşumunda azalma bulundu (****p<0.0001). (FP:Flavopiridol, D+F: DOX ve Flavopiridol kombinasyonu).



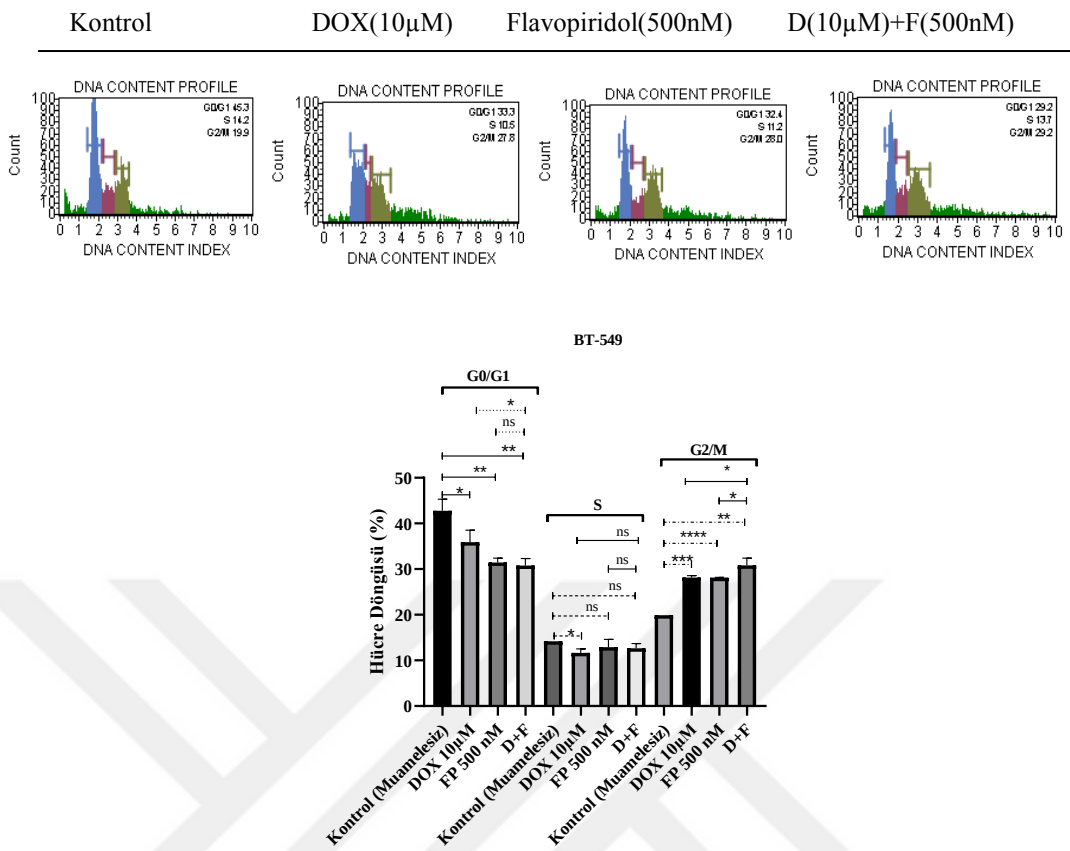
Şekil 16. BT-549 hücresinin 25-500nM artan konsantrasyonlarda DOX, 50-600nM artan konsantrasyonlarda flavopiridol ve kombinasyon uygulaması sonucu koloni sayısı. A) BT-549 hücresi 25-500 nM konsantrasyonlarda DOX ile muamele edildi ve muamelesiz kolonilere kıyasla 50 nM ve sonrasındaki dozlarda azalma görüldü (ns:non-significant; ***p<0.0005). B) BT-549 hücresi 50-600 nM konsantrasyonlarda flavopiridol ile muamelesi sonucu tüm dozlarda azalma görüldü (***p<0.0005). C) BT-549 hücrelerinde 10µM DOX, 500nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonlarının 24 saat muamelesi sonucu kontrole kıyasla koloni oluşumunda azalma bulundu (***p<0.0003; ****p<0.0001). D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde 10µM DOX ve 500nM flavopiridol uygulanan hücrelere kıyasla koloni oluşumunda azalma bulundu (****p<0.0001). (FP:Flavopiridol, D+F: DOX ve Flavopiridol kombinasyonu).

4.3. DOX, flavopiridolün ve kombinasyonun MDA-MB-231 ve BT-549 kanseri hücrelerinin hücre döngüsü evrelerine etkisi

MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinin DOX ve flavopiridol maddelerinin ayrı ayrı ve kombin olarak muamelesi sonucu hücre döngüsü analizleri yapıldı. 25cm²'lik flasklara yaklaşık 550.000 hücre ekildi, 24 saat süreyle 10 μM DOX ve 500 nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile 24 saat muamele edildi. İnkübasyon sonrası toplanan hücreler sayıldı, kit içeriğine uygun şekilde boyandı ve eşit sayıdaki örnekler Muse cihazında ölçüm yapıldı. MDA-MB-231 hücre hattında kontrol hücrelere kıyasla, 10 μM DOX ve 500 nM Flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombin uygulanan hücrelerin, G0/G1 fazında yaklaşık %15 oranında daha fazla tutulduğu bulundu. Kombinasyon uygulamasına kıyasla DOX ve flavopiridol uygulanan hücrelerde fark bulunmadı. BT-549 hücrelerinde kontrol hücrelere kıyasla, 10 μM DOX ve 500 nM Flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonu uygulanan hücrelerin, G0/G1 ve G2/M evrelerinde yaklaşık %10 oranında daha fazla tutulduğu bulundu. Ayrıca kombinasyon olarak uygulanan hücrelerin DOX ve flavopiridole kıyasla G2/M evresinde tutulmasında anlamlı bir artış olduğu bulundu (Şekil 17, 18).



Şekil 17. MDA-MB-231 hücrelerinin 10µM DOX, 500nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamelesi sonucu hücre döngüsü oranı. MDA-MB-231 hücreleri 10 µM DOX, 500 nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamelesi sonucu muamelesiz hücrelere göre G0/G1 evresinde artış bulundu (**p<0.05; ***<0.0006), S evresinde değişim olmadı ve G2/M evresinde azalma bulundu (***p<0.0001; ****p<0.0001). D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde DOX ve flavopiridole göre G0/G1, S ve G2/M evrelerinde anlamlı bir fark bulunmadı. (FP:Flavopiridol, D+F: DOX ve Flavopiridol kombinasyonu).

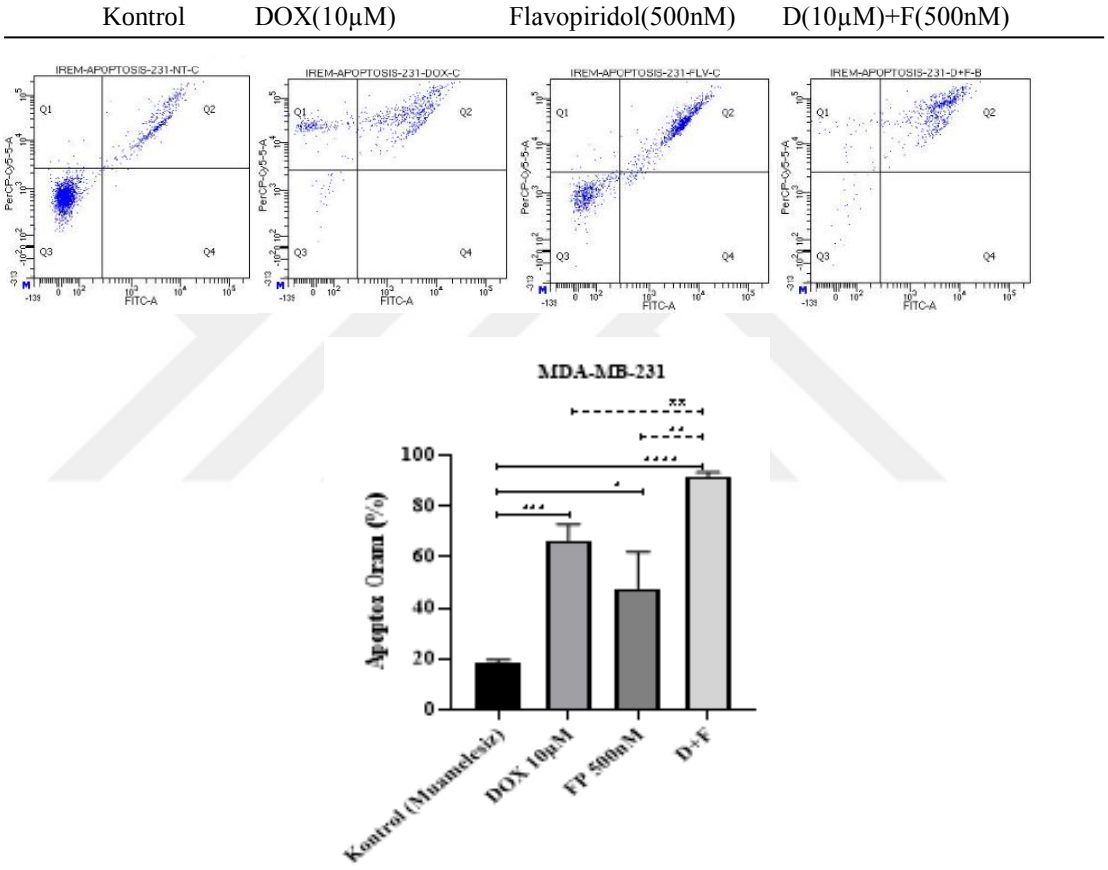


Şekil 18. BT-549 hücrelerinin 10µM DOX, 500nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamelesi sonucu hücre döngüsü oranı. BT-549 hücreleri 10 µM DOX, 500 nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamelesi sonucu muamelesiz hücrelere göre G0/G1 evresinde azalma bulundu (*p<0.05; **<0.003), S evresinde değişim olmadı ve G2/M evresinde artış bulundu (**p<0.003; ***p<0.0001; ****p<0.0001). D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde DOX'e kıyasla G0/G1evresinde azalma bulundu, flavopiridole kıyasla anlamlı bir fark bulunmadı (*p<0.05). D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde G2/M evresinde DOX ve flavopiridole kıyasla anlamlı bir artış bulundu (*p<0.05). (FP:Flavopiridol, D+F: DOX ve Flavopiridol kombinasyonu).

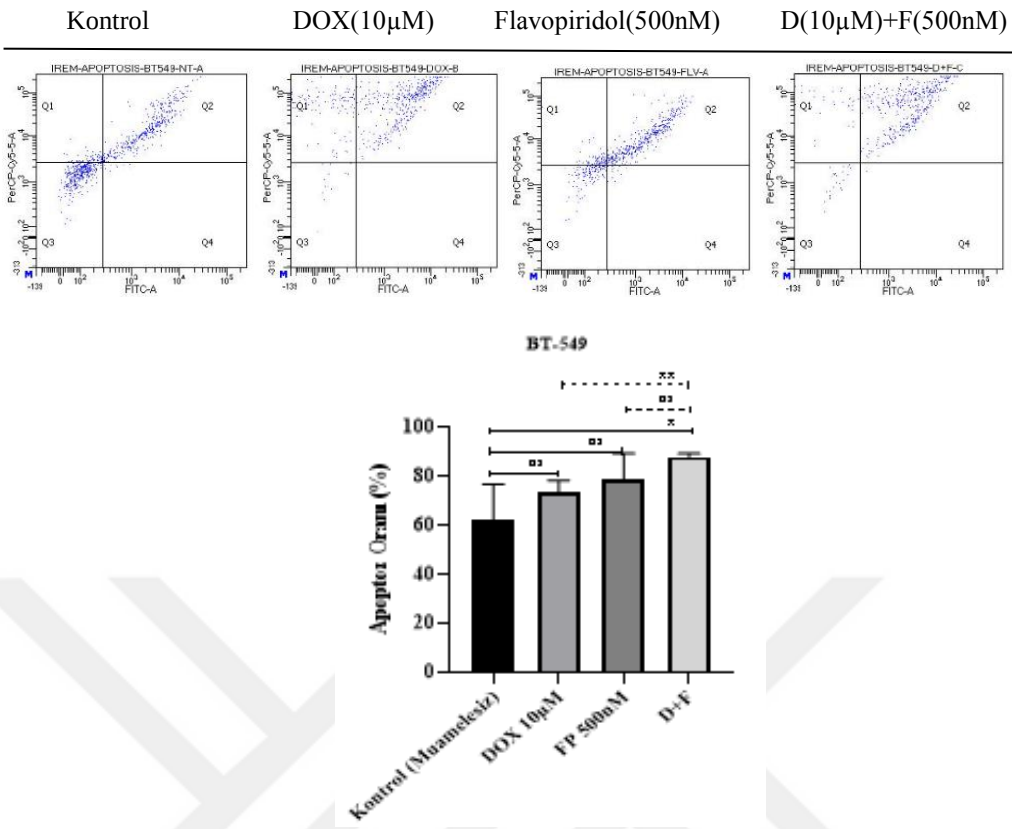
4.4. DOX, flavopiridolün ve kombinasyonun MDA-MB-231 ve BT-549 kanseri hücrelerinde apoptoza etkisi

MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinin DOX ve flavopiridol maddelerinin tek başına ve kombinasyon olarak muamelesi sonucu erken ve geç apoptoz (total apoptoz) oranlarının analizleri yapıldı. Bunun için, 96 kuyucuklu plakalara ekilen ve 24 saat 10 µM DOX, 500 nM flavopiridol ile ve aynı konsantrasyonlarda DOX ve flavopiridol kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerde Annexin V kiti

kullanılarak flow sitometride ölçüm yapıldı. MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol hücrelere kıyasla, 10 µM DOX, 500 nM flavopiridol ile ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyon uygulaması sonucu apoptoz oranında artış bulundu. Ayrıca D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde DOX ve flavopiridole kıyasla apoptozun arttığı bulundu. Bu artış kontrol hücrelere göre D+F kombinasyonunda %90 oranında bulundu. BT-549 hücrelerinde kontrol hücrelere göre DOX ve flavopiridolde apoptoz oranında anlamlı bir fark bulunmadı. Kontrol hücrelere kıyasla D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde yaklaşık %25 oranında apoptozda artış bulundu (Şekil 19, 20).



Şekil 19. MDA-MB-231 hücrelerinin 10µM DOX, 500nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamelesi sonucu total apoptoz oranı. MDA-MB-231 hücreleri 10 µM DOX, 500 nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamelesi sonucu muamelesiz hücrelere kıyasla total apoptoz oranında artış bulundu (*p<0.05; ***p<0.001; ****p<0.0001). D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde, DOX ve flavopiridole göre apoptoz oranında anlamlı bir artış bulundu (**p<0.01). (FP:Flavopiridol, D+F: DOX ve Flavopiridol kombinasyonu).

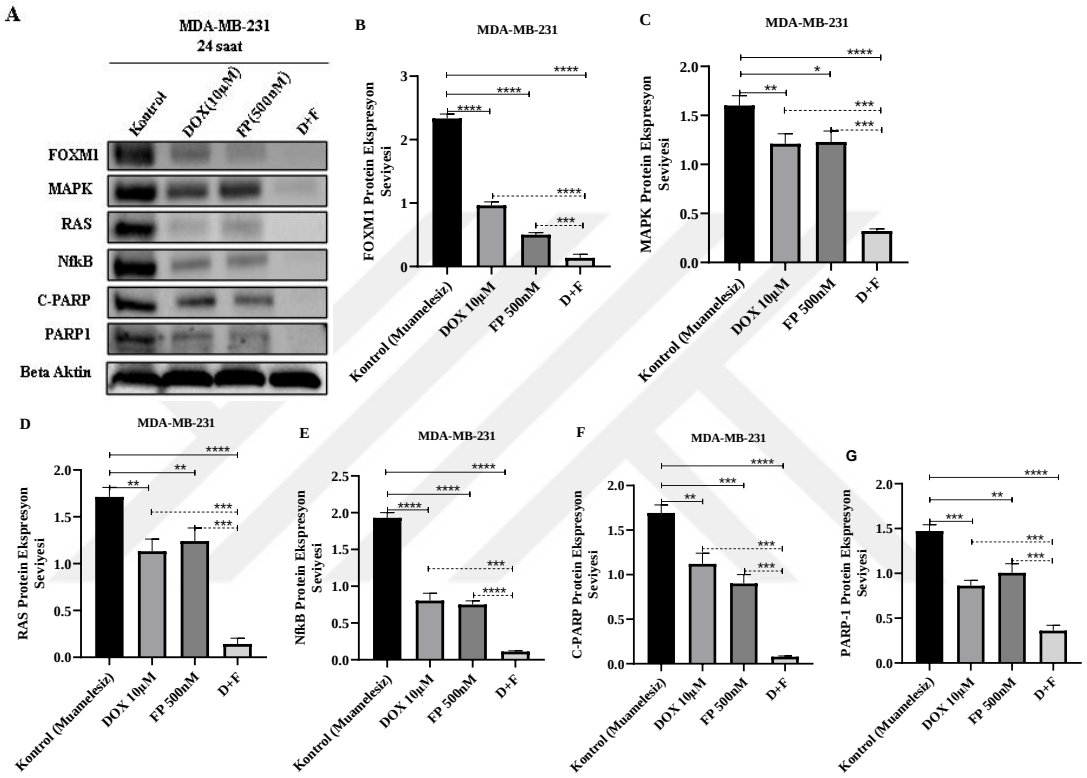


Şekil 20. BT-549 hücrelerinin 10µM DOX, 500nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamelesi sonucu total apoptoz oranı. BT-549 hücreleri 10 µM DOX, 500 nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamelesi sonucu muamelesiz hücrelere kıyasla D+F kombinasyonunda apoptoz oranında artış görüldü (*p<0.05). Kombinasyon uygulanan hücrelere kıyasla 10µM DOX ve 500nM flavopiridol örneklerinde DOX için azalma bulundu, flavopiridolde bir fark bulunmadı (**p<0.007). (FP:Flavopiridol, D+F: DOX ve Flavopiridol kombinasyonu).

4.5. DOX, flavopiridolün ve kombinasyonun MDA-MB-231 ve BT-549 kanseri hücrelerinde FOXM1/MAPK/RAS/NFkB sinyal yolağına etkisi

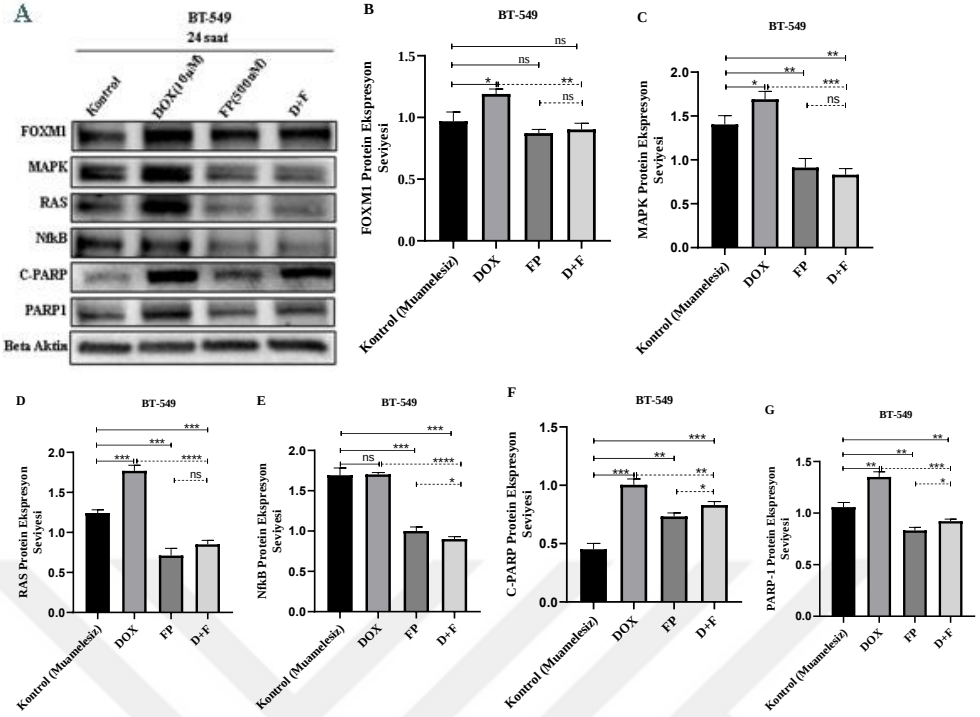
MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde 10 µM DOX, 500 nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonu ile muamelesi sonucu FOXM1/MAPK/RAS/NFkB sinyal yolağı proteinlerinin ekspresyon seviyeleri analiz edildi. MDA-MB-231 hücrelerinde, kontrol hücrelere kıyasla DOX, flavopiridol ve D+F kombinasyonlarında, FOXM1, MAPK, RAS ve NFkB onkogen proteinlerde ve ayrıca C-PARP ve PARP1'de azalma bulundu. D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde, DOX ve flavopiridole kıyasla FOXM1, MAPK, RAS ve NFkB onkogen proteinlerin ekspresyonlarında %70-90 oranlarında azalma bulundu. DOX ve

flavopiridolün tek başına uygulandığı hücrelere kıyasla D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde C-PARP ve PARP1 protein ekspresyon seviyelerinde azalma ile sonuçlandı. BT-549 hücrelerinde, kontrol hücrelere kıyasla DOX, flavopiridol ve kombinasyonlarında, FOXM1 ve NFkB protein ekspresyonlarında azalma bulundu. Ayrıca D+F kombinasyonundaki azalma her iki protein ekspreyon seviyesinde de DOX ve flavopiridole kıyasla daha belirgin olarak bulundu (Şekil 21, 22).



Şekil 21. 10µM DOX, 500 nM Flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde protein ekspresyon seviyeleri. **A)** 10 µM DOX ve 500 nM Flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin protein seviyelerinin western blot görüntüleri. **B)** MDA-MB-231 hücrelerinde 10 µM DOX, 500 nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonlarında FOXM1 proteini ekspresyon seviyesinlerinde ciddi oranda azalma görüldü (****p<0.0001). D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde, 10µM DOX ve 500nM flavopiridol örneklerine kıyasla azalma bulundu (***p<0.0006; ****p<0.0001). **C)** MDA-MB-231 hücrelerinde 10 µM DOX, 500 nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonlarında MAPK(ERK1/2) proteini ekspresyon seviyesinde azalma görüldü (*p<0.05; **P<0.05; ****P<0.0001). D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde, 10µM DOX ve 500nM flavopiridol örneklerine kıyasla azalma bulundu (*p<0.02; ****p<0.0001). **D)** MDA-MB-231 hücrelerinde 10 µM DOX, 500 nM flavopiridol ve kombinasyonlarında RAS proteini ekspresyon seviyelerinde azalma görüldü (**p<0.05; ****p<0.0001). D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde, 10µM DOX ve 500nM flavopiridol örneklerine kıyasla azalma bulundu

(***p<0.0002; ****p<0.0001). **E)** MDA-MB-231 hücrelerinde 10 μM DOX, 500 nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonlarında NfkB protein ekspresyonunda ciddi oranda azalma görüldü (****p<0.0001). D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde, 10μM DOX ve 500nM flavopiridol örneklerine kıyasla azalma bulundu (***p<0.0003; ****p<0.0001). **F)** MDA-MB-231 hücrelerinde 10 μM DOX, 500 nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonlarında C-PARP proteininde anlamlı bir azalma görüldü (**p<0.005;***p<0.0005; ****p<0.0001). D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde, 10μM DOX ve 500nM flavopiridol örneklerine kıyasla azalma bulundu (****p<0.0001). **G)** MDA-MB-231 hücrelerinde 10 μM DOX, 500 nM flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonlarında PARP1 protein ekspreyon seviyelerinde azalma görüldü (**p<0.005; ***p<0.0005; ****p<0.0001). D+F kombinasyonu uygulanan hücrelerde, 10μM DOX ve 500nM flavopiridol örneklerine kıyasla DOX'de (***p<0.0005) ve flavopiridolde (***p<0.0007) azalma bulundu. (FP:Flavopiridol, D+F: DOX ve Flavopiridol kombinasyonu).



Şekil 22. 10µM DOX, 500 nM Flavopiridol ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamele edilen BT-549 hücrelerinde protein ekspresyon seviyeleri. **A)** 10 µM DOX ve 500 nM flavopiridol ile muamele edilen BT-549 hücrelerinin protein seviyelerinin western blot görüntüleri. **B)** BT-549 hücrelerinde flavopiridol ve DOX ile aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamelesi sonucu FOXM1 protein ekspresyonunda anlamlı bir fark bulunmadı. Kombinasyon uygulamasında DOX'a kıyasla azalma bulundu, flavopiridole kıyasla bir fark bulunmadı (**p<0.0015). **C)** BT-549 hücrelerinde DOX, flavopiridol ve kombinasyon muamelesi sonucu MAPK protein ekspesyon seviyelerinde DOX'de artış, flavopiridol ve kombinasyonda azalma görüldü (*p<0.05; **p<0.005). Kombinasyon uygulamasında DOX'a kıyasla azalma bulundu, flavopiridole kıyasla bir fark bulunmadı (***p<0.0002). **D)** BT-549 hücrelerinde DOX, flavopiridol ve kombinasyon muamelesi sonucu RAS protein ekspresyon seviyelerinde DOX'de anlamlı bir artış ve flavopiridol ve kombinasyonda anlamlı bir azalma görüldü (***p<0.005). Kombinasyon uygulamasında DOX'a kıyasla azalma bulundu, flavopiridole kıyasla bir fark bulunmadı (****p<0.0001). **E)** BT-549 hücrelerinde DOX, flavopiridol ve kombinasyon muamelesi sonucu NfkB protein ekspresyon seviyelerinde DOX'de anlamlı bir değişiklik olmadı, flavopiridol ve kombindasyonda anlamlı bir azalma görüldü (***p<0.0005). Kombinasyon uygulamasında DOX ve flavopiridole kıyasla anlamlı bir azalma bulundu (*p<0.4; ****p<0.0001). **F)** BT-549 hücrelerinde DOX, flavopiridol ve kombinasyon muamelesi sonucu C-PARP protein ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişiklik bulunmadı (**p<0.005; ***p<0.0005). Kombinasyon uygulamasında DOX'a kıyasla azalma bulundu, flavopiridole kıyasla artış bulundu (*p<0.2; **p<0.004). **G)** BT-549 hücrelerinde DOX, flavopiridol ve kombinasyon muamelesi sonucu PARP-1 ekspresyon seviyelerinde DOX'de artış, flavopiridol ve kombinasyonda anlamlı bir azalma görüldü (**p<0.005). Kombinasyon uygulamasında DOX'a kıyasla azalma bulundu, flavopiridole kıyasla artış bulundu (*<0.2; ***p<0.0002). (FP:Flavopiridol, D+F: DOX ve Flavopiridol kombinasyonu).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri, dünya çapında kanser ölümlerinin önemli bir nedenidir ve kadınlarda en sık görülen kanserdir. TNBC, östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve HER2 reseptörünün ekspresyonunun yokluğu ile karakterizedir. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %15'ini oluşturan TNBC, endokrin tedaviye ve moleküler hedefe yönelik tedaviye duyarlı değildir (Thomas ve ark., 2021; Wu ve ark., 2021).Bu yüzden, son derece yüksek ilaç direnci, hızlı ve kötü prognozu ve net terapötik hedeflerin olmamasından dolayı bugüne kadar FDA (ABD Gıda ve İlaç Dairesi) ve EMA (Avrupa İlaç Ajansı) tarafından TNBC'li hastalar için güvenilir bir tedavi henüz onaylanmamıştır (Sabit ve ark., 2020). Diğer taraftan tümör hücrelerinde kemoterapiye karşı ilaç direnci gelişir ve üstelik kemoterapi tümörlü olmayan sağlık hücreler için de toksik etki gösterir ve hastayı riske atan birçok olumsuz yan etkilere yol açar. Bu nedenle, metastatik meme kanser hastalarının tedavisinde kemoteröpatiklerin kullanımında da zorlanılmakta ve bu zorlukların üstesinden gelmek için alternatif daha güvenli ve etkin yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine acil ihtiyaç duyulmaktadır (Yuan ve ark., 2016; Wang ve ark., 2021; de Sousa Cunha ve ark., 2019; Shen ve ark., 2020).

DOX, çeşitli tümörler için antikanser ajanı olarak yaygın olarak kullanılan bir antrasiklindir. Tümör hücrelerinde DNA hasarına neden olarak DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu engeller ve mitoz bölünmeyi önler. Ancak klinikte yaygın kullanılmasına rağmen, toksik olup normal dokulara da zarar verir, bu nedenle tedavi sırasında ve sonrasında hastaların yaşam kalitesini olumsuz yönde etkiler. Ayrıca, tümör hücrelerinde DOX'a karşı direncin gelişmesi tedaviyi zorlaştırmaktadır. Sitotoksisitesinden dolayı DOX'un direncin üstesinden gelmek için DOX dozunu

artırmanın imkansız olduğu vurgulanmıştır. Dolayısıyla, metastatik meme kanser hastalarının tedavisinde kullanılmasına rağmen, ilaç direnci ve kardiyotoksisiteye neden olduğu için DOX kullanımında zorlanılmaktadır. Bu nedenle, DOX yan etkilerini ve ayrıca direncini azaltmak için yeni stratejilere ve araştırmalara ihtiyaç vardır.

Doğal ürünler daha güvenli, daha ulaşılabilir, daha ucuz ve daha düşük toksik etkilere sahip bileşiklerdir. Bu nedenle, kanser hastalarının tedavisi için günümüzde birçok araştırma, mevcut kemoterapi ilaçların yerine daha az yan etkisi olan doğal bileşiklerle kullanılmasına odaklanmıştır. (Ezzati ve ark., 2020; Kumar ve ark., 2019; Madamsetty ve ark., 2022). Doğal bileşiklerden olan Flavonoidlerin kullanımı tümör hücreleri için, kemoterapötik ilaçlara karşı duyarlılığı arttıran, kemorezistans insidansını geciktiren ve proliferatif sinyal yolaklarını baskılayan anti-karsinojenik aktiviteleri nedeniyle ilgi çekici bir yaklaşım haline gelmiştir. Yarı sentetik bir Flavonoid olan Flavopiridol klinik araştırmalarda test edilen ilk CDK inhibitörü olarak tanımlanmış (Bisol ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2021) ve kanser hücreleri için antiproliferatif özelliğinin yanı sıra çoklu antitümör etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

İnsan meme kanseri hücrelerinde, Flavopiridol apoptoz ailesinin ve B hücre lenfoma-ekstra büyük (Bcl-XL) gibi antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu azaltarak ve proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2017). Flavopiridolün, insan küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu hücrelerinde (Keith ve ark., 1997), kolon kanserinde (Motwani ve ark., 2001), gastrointestinal kanserde (Jung ve ark., 2001) ve meme kanserinde (Wall ve ark., 2003; Motwani ve ark., 1999) apoptozu indüklediği gösterilen paklitaksel, docetaxel, gemsitabin ve DOX gibi kemoterapilerin etkinliğini güçlendirgi bildirilmiştir. Hatta, preklinik araştırmalarda, flavopiridolün, osteosarkom DOX'in etkilerini güçlendirdiği gösterilmiştir. Osteosarkom hücrelerinde in vitro şartlarda yapılan deneyler, DOX ve flavopiridol kombinasyonlarının, tek ajan DOX'den veya flavopiridolden daha etkili olduğunu ve koloni oluşturma deneylerinde de, tek başına DOX veya flavopiridol ile karşılaştırıldığında, kolonilerin test edilen tüm kombinasyonlarda önemli ölçüde azaldığını ortaya koymuştur (Luke ve ark., 2012). Meme kanser hücre hattı olan MCF- 7 hücreleri ile yapılan bir çalışmada da,

flavonoidlerin mevcut tedavilerin etkinliğini arttırdığına dair veriler elde edilmiştir (Seo ve ark., 2017). In vivo hepatoselüler karsinom (HCC) modelinde DOX ve flavopiridol kombinasyonunun sinerjistik bir anti-tümör etkisine sahip olduğu gösterilmiştir. Flavopiridolün, NDRG1 ekspresyonunun baskılanması yoluyla apoptozu indükleyerek ve hücre proliferasyonunu azaltarak DOX'e dirençli HCC hücrelerine etkili bir adjuvan tedavi olabileceğini göstermişlerdir. (Luke ve ark., 2012). Flavopiridol ve ardından DOX tedavisinin, diğer sıralı tedavilere kıyasla Rb-negatif ksenograft modellerinde tümör büyüme kontrolü ve hayatta kalma avantajı sağladığı gösterilmiştir (Budak Alpdogan ve ark., 2009). Kwak ve ark., 2015 yılında DOX ve flavopiridolün kombinasyon tedavisinin bir in vivo HCC fare modelinde sinerjik bir anti-tümör etkisine sahip olduğunu, artan apoptoz ve HCC tümör hücrelerinin proliferasyonunun azaldığını göstermiştir. Bu verilerden dolayı çalışmamızda DOX'in etkiliğini artırmak ve yan etkilerini azaltmak için DOX ve flavopiridol kombinasyon kullanımının TNBC hücrelerinin kanserojenik özelliklerini baskılmak için etkili olabileceği düşünüldü ve flavopiridol ve DOX kombinasyonunun hücrelerin proliferasyonuna, koloni oluşumuna ve apopitoz oranına etkisi araştırıldı.

Sunulan çalışmada, 24 saat boyunca 500 nM flavopiridol ve 10 μM DOX kombinasyonun uygulandığı iki farklı TNBC hücrelerinde hem kontrol hücrelerine göre hemde DOX ve flavopiridolün ayrı ayrı uygulandığı hücrelere göre, hücre canlılığının azaldığı, apoptoz oranın arttığı, MDA-MB-231 için 50 nM DOX, 100 nM Flavopiridol konsantrasyonda ve BT-549 için 50 nM DOX ve 50 nM Flavopiridol konsantrasyonlarında koloni oluşumunun önemli oranda baskılandığı bulundu. Bu verilerimiz doğal bileşik olan flavopiridolün DOX ile birlikte kullanımının DOX'un etkinliğini artırdığını gösterdi.

DOX klinikte kapsamlı olarak kullanılmasına rağmen, DOX'in anti-kanser moleküler mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır (Khalili-Tanha ve ark., 2021). DOX direnci ile çeşitli genetik mutasyonlar ve epigenetik mekanizmalar ile ilişkilendirilmiştir. Bunlar arasında, ABCB1 (Gottesman ve ark., 2002), ABCBG2 (Patel ve ark., 1981) ve MRP1 (Kubiliute vd., 2021) gibi ABC taşıyıcı aile üyelerindeki mutasyonların yanı sıra p53 (Khalili-Tanha ve ark., 2021) gibi DNA

onarım faktörleri DOX direncinin başlıca nedenleri olarak kabul edilir. Ayrıca, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü (STAT3), Wnt, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (Akt), rapamisinin memeli hedefi (mTOR) gibi tümör teşvik edici yollakların aktivasyonunun (Sumarpo ve ark., 2020; Ai ve ark., 2008; Gao ve ark., 2020), fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) ve Bax gibi tümör baskılayıcı yolakların inhibisyonunun DOX'a karşı direnci tetiklediği gösterilmiştir (Shati A.A., 2020; Yu ve ark., 2020). Kemorezistansta epigenetik değişimlerinde rolü olduğuna dair kanıtlar da vardır (Calcabrini ve ark., 2020; Jamialahmadi ve ark., 2021). Buna ragmen, yeni moleküler yolakların tanımlanmasının ve hedeflenmesinin, DOX direncinin üstesinden gelmeyi mümkün kılabileceği rapor edilmektedir (Li ve ark., 2020; Li ve ark., 2020).

Forkhead Box-M1 (FOXM1) proteini, hücre döngüsünün ilerlemesinde ve hücre çoğalmasında önemli bir fonksiyona sahip olan bir transkripsiyon faktörüdür. FOXM1, solid tümörlerde, aşırı eksprese edilen onkogenlerden biri olarak tanımlanır (Hamurcu ve ark., 2016; Hamurcu ve ark., 2017; 2019; 2021). Bizim tarafımızdan daha önce yapılan çalışmalarda da FOXM1'in çeşitli meme kanser hücre hatlarında normal epitel hücrelerine göre daha fazla ifade edildiği bulunmuştur (Hamurcu ve ark., 2016). Yapılan birçok çalışmada FOXM1'in sadece kanserin başlamasında değil, aynı zamanda proliferasyon, invazyon, migrasyon, anjiogenezis, metastaz ve kemoterapiye direnç dahil olmak üzere tümorogenezisin birçok basamağında rol aldığı gösterilmiştir (Hamurcu ve ark., 2016; Hamurcu ve ark., 2017; 2019, 2021; Sabave ark., 2016). Ayrıca bizim daha önceki çalışmalarımız ilk kez agresif meme kanser hücrelerinde FOXM1'in, otofajiyi düzenlediği, onkojenik yolaklar olarak bilinen FOXM1/Beclin-1/LC3/ otofaji, FOXM1/eEF2K ve FOXM1/İntegrin β1 aksını düzenleyerek metabolik stres, hipoksi ve besin yoksunluğu altında tümör büyümesinin ilerlemesine katkıda bulunduğunu ispatlamıştır (Hamurcu ve ark., 2016; Hamurcu ve ark., 2017; 2019). Diğer araştırmacılar tarafından da FOXM1'in RAS/ MAPK ve NFkB gibi birçok hücre içi sinyal yolağını indüklediği gösterilmiştir (Lee ve ark., 2016; Saba ve ark., 2016; Miyashita ve ark.,2015). Ayrıca, FOXM1'in apopitozu baskıladığı, DNA tamirinde de görev alan genlerin ekspresyonunu artırdığı ve anti-kanser ajanlara karşı hücrelerin direnç kazanmasına yol açtığı bulunmuştur (Wang ve ark., 2017; Ghandhariyoun ve ark., 2020; Saba ve ark.,2016). Bunlara

ilaveten, FOXM1'in, meme kanseri hücrelerinin DOX'a karşı dirençte anahtar rol oynadığı, FOXM1'in inhibisyonunun meme ve diğer kanser hücrelerinde DOX'a karşı duyarlılığı önemli oranda artırdığı gösterilmiştir (Ghandhariyoun ve ark., 2020; Roh ve ark., 2018). Hatta, meme kanser hücrelerinde FOXM1'e bağlı DOX direncinde, DNA hasarından korunmak ve DNA tamir genlerinin ekpresyonunu düzenlemek için NFkB'nin FOXM1 ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Park ve ark., 2012; Ghandhariyoun ve ark., 2020). NFkB kemoterapiye dirençte başlıca medyatörlerden biri olarak gösterilmiştir ve NFkB aktivasyonunu inhibe etmek için bir dizi farmakolojik stratejiler geliştirilmiştir. İn vitro ve in vivo deneyler NFkB baskılandığında DOX direncinin üstesinden gelinebileceğini öne sürmüştür (Mi J ve ark., 2008).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda flavopiridol ve DOX kombinasyonunun DOX'a karşı geliştirilen dirençte etkili olan FOXM1, NFkB ve RAS, MAPK sinyal yolağına olası etkisi araştırıldı. Maharjan ve ark., DOX ve artan konsantrasyonlar ile morin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde FOXM1 sinyalini baskıladığını göstermiştir (Maharjan ve ark., 2023). Park ve ark., bir fare ksenograft modelinde meme kanseri hücrelerinde FOXM1 ekspresyonunun baskılanması sonucu hücrelerin DOX'a karşı duyarlı hale geldiklerini göstermiştir (Park ve ark., 2012). Kanserde yüksek oranda eksprese edilen geçici reseptör potansiyel kanalı melastatin 2 (TRPM2) delesyonunun nöroblastoma hücrelerinde DOX ile tedavisi S ve G2/M fazlarında hücre döngüsü ilerlemesini azaltırken aynı zamanda FOXM1 protein ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Hirschler-Laszkiewicz ve ark., 2022). Apelt ve ark., Wilms tümörü'nde kötü prognozla ilişkilendirilen FOXM1'ın preoperatif DOX alan hastalarda ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı bulmuştur (Apelt ve ark., 2016).

Sunulan çalışmada ilk kez flavopiridolün ve DOX'un FOXM1, NFkB ve RAS/MAPK sinyal yolağını baskıladığı bulundu. Flavopiridol ve DOX kombinasyonunun uygulandığı iki farklı TNBC hücrelerinde hem kontrol hücrelerine göre hem de DOX ve flovopiridolün ayrı ayrı uygulandığı hücrelere göre FOXM1, NFkB ve RAS/MAPK sinyal yolağını önemli oranda baskıladığını gösterdi. Ayrıca flavopiridolün ve DOX'un DNA tamir mekanizmasında rol oynayan PARP'ın ekspresyonunun azaldığı bulundu. Flavopiridol ve DOX kombinasyonunun

uygulandığı iki farklı TNBC hücrelerinde hem kontrol hücrelerine göre hem de DOX ve flavopiridolün ayrı ayrı uygulandığı hücrelere göre PARP'ın ekspresyonunun azaldığı bulundu.

Sonuç olarak literatürde ilk kez flavopiridolün FOXM1, NFkB ve RAS/MAPK sinyal yolağını baskılayarak hücrelerin çoğlamasını inhibe ettiğini ve apoptoz oranını artırdığını gösterdi. Ayrıca PARP'ın ekspresyonunu baskılayarak hücrelerin apoptoza girmesine yol açabileceğini, hücrelerin G1 ve G2 evresinde bekletilmesini sağlayarak hücre çoğalmasını baskılayabileceğini ortaya çıkardı. Dolayısıyla flavopiridolün FOXM1, NFkB ve RAS/MAPK sinyal yolağını baskılayarak DOX'un etkinliğini artırabileceğini düşündürdü. Bu yüzden çalışmamızın sonuçları, in vivo şartlarda pre-klink çalışmaların yapılmasına ve bu kombinasyonun TNBC hastalarının tedavisinde kullanılan DOX'un etkinliğini artırmak için yeni alternatif bir yaklaşım olarak değerlendirilmesine öncülük edebileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Ai L, Kim WJ, Demircan B, Dyer LM, Bray KJ, Skehan RR, Massoll NA, Brown KD. The transglutaminase 2 gene (TGM2), a potential molecular marker for chemotherapeutic drug sensitivity, is epigenetically silenced in breast cancer. *Carcinogenesis*, 2008; 29(3):510-8.

Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res*, 2017; 50(1):33.

Apelt N, Hubertus J, Mayr D, Graf N, Furtwängler R, Von Schweinitz D, Kappler R. Association of FOXM1 expression with tumor histology and prognosis in Wilms tumor: Potential for a new prognostic marker. *Oncol Lett*, 2016; 12(4):2854-2859.

Arora R, Yates C, Gary BD, McClellan S, Tan M, Xi Y, Reed E, Piazza GA, Owen LB, Dean-Colomb W. Panepoxydone targets NF-kB and FOXM1 to inhibit proliferation, induce apoptosis and reverse epithelial to mesenchymal transition in breast cancer. *PLoS One*, 2014; 9(6):e98370.

Arun B, Akar U, Gutierrez-Barrera AM, Hortobagyi GN, Ozpolat B. The PARP inhibitor AZD2281 (Olaparib) induces autophagy/mitophagy in BRCA1 and BRCA2 mutant breast cancer cells. *Int J Oncol*, 2015; 47(1):262-8.

Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet], 2012.

Budak-Alpdogan T, Chen B, Warrier A, Medina DJ, Moore D, Bertino JR. Retinoblastoma tumor suppressor gene expression determines the response to

sequential flavopiridol and Doxorubicin treatment in small-cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2009; 15(4):1232-40.

Calcabrini C, Maffei F, Turrini E, Fimognari C. Sulforaphane Potentiates Anticancer Effects of Doxorubicin and Cisplatin and Mitigates Their Toxic Effects. *Front Pharmacol*, 2020; 11:567.

Castaneda M, Hollander PD, Mani SA. Forkhead Box Transcription Factors: Double-Edged Swords in Cancer. *Cancer Res*, 2022; 82(11):2057-2065.

Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. Breast *Breast Dis*, 2010; 32(1-2):35-48.

de Sousa Cunha F, Dos Santos Pereira LN, de Costa E Silva TP, de Sousa Luz RA, Nogueira Mendes A. Development of nanoparticulate systems with action in breast and ovarian cancer: nanotheragnostics. *J Drug Target*, 2019; 27(7):732-741.

Deepak KGK, Vempati R, Nagaraju GP, Dasari VR, S N, Rao DN, Malla RR. Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. *Pharmacol Res*, 2020; 153:104683.

Derakhshan F, Reis-Filho JS. Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. *Annu Rev Pathol*, 2022; 17:181-204.

Ezzati M, Yousefi B, Velaei K, Safa A. A review on anti-cancer properties of Quercetin in breast cancer. *Life Sci*, 2020; 248:117463.

Franco YL, Vaidya TR, Ait-Oudhia S. Anticancer and cardio-protective effects of liposomal Doxorubicin in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 2018; 10:131-141.

Galiè M. RAS as Supporting Actor in Breast Cancer. *Front Oncol*, 2019; 12;9:1199.

Gao H, Ma J, Y Cheng, P Zheng. Exosomal transfer of macrophage-derived miR-223 confers doxorubicin resistance in gastric cancer. *OncoTargets Ther*, 2020; 12169-12179.

Ghandhariyoun N, Jaafari MR, Nikoofal-Sahlabadi S, Taghdisi SM, Moosavian SA. Reducing Doxorubicin resistance in breast cancer by liposomal FOXM1 aptamer: In vitro and in vivo. *Life Sci*, 2020; 262:118520.

Giltnane JM, Balko JM. Rationale for targeting the RAS/MAPK pathway in triple-negative breast cancer. *Discov Med*, 2014; 17(95):275-83.

Golson ML, Kaestner KH. Fox transcription factors: from development to disease. *Development*, 2016; 143(24):4558-4570.

Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med*, 2002; 53():615-27.

Hamurcu Z, Ashour A, Kahraman N, Ozpolat B. FOXM1 regulates expression of eukaryotic elongation factor 2 kinase and promotes proliferation, invasion and tumorgenesis of human triple negative breast cancer cells. *Oncotarget*, 2016; 7(13):16619-35.

Hamurcu Z, Kahraman N, Ashour A, Ozpolat B. FOXM1 transcriptionally regulates expression of integrin β1 in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2017; 163(3):485-493.

Hamurcu Z, Delibaşı N, Nalbantoglu U, Sener EF, Nurdinov N, Tascı B, Taheri S, Özkul Y, Donmez-Altuntas H, Canatan H, Ozpolat B. FOXM1 plays a role in autophagy by transcriptionally regulating Beclin-1 and LC3 genes in human triple-negative breast cancer cells. *J Mol Med (Berl)*, 2019; 97(4):491-508.

Hamurcu Z, Sener EF, Taheri S, Nalbantoglu U, Kokcu ND, Tahtasakal R, Cınar V, Guler A, Ozkul Y, Dönmez-Altuntas H, Ozpolat B. MicroRNA profiling identifies Forkhead box transcription factor M1 (FOXM1) regulated miR-186 and miR-200b alterations in triple negative breast cancer. *Cell Signal*, 2021; 83:109979.

Heiser LM, Sadanandam A, Kuo WL, Benz SC, Goldstein TC, Ng S, Gibb WJ, Wang NJ, Ziyad S, Tong F, Bayani N, Hu Z, Billig JI, Dueregger A, Lewis S, Jakkula L, Korkola JE, Durinck S, Pepin F, Guan Y, Purdom E, Neuvial P, Bengtsson H, Wood KW, Smith PG, Vassilev LT, Hennessy BT, Greshock J,

Bachman KE, Hardwicke MA, Park JW, Marton LJ, Wolf DM, Collisson EA, Neve RM, Mills GB, Speed TP, Feiler HS, Wooster RF, Haussler D, Stuart JM, Gray JW, Spellman PT. Subtype and pathway specific responses to anticancer compounds in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012; 109(8):2724-9.

Herman L, Todeschini AL, Veitia RA. Forkhead Transcription Factors in Health and Disease. *Trends Genet*, 2021; 37(5):460-475.

Hirschler-Laszkiewicz I, Festa F, Huang S, Moldovan GL, Nicolae C, Dhoonmoon A, Bao L, Keefer K, Chen SJ, Wang HG, Cheung JY, Miller BA. The human ion channel TRPM2 modulates cell survival in neuroblastoma through E2F1 and FOXM1. *Sci Rep*, 2022; 12(1):6311.

Houghton SC, Hankinson SE. Cancer Progress and Priorities: Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2021; 30(5):822-844.

Imran M, Aslam Gondal T, Atif M, Shahbaz M, Batool Qaisarani T, Hanif Mughal M, Salehi B, Martorell M, Sharifi-Rad J. Apigenin as an anticancer agent. *Phytother Res*, 2020; 34(8):1812-1828.

Jackson BC, Carpenter C, Nebert DW, Vasiliou V. Update of human and mouse forkhead box (FOX) gene families. *Hum Genomics*, 2010; 4(5):345-52.

Jamialahmadi K, Zahedipour F, Karimi G.J The role of microRNAs on doxorubicin drug resistance in breast cancer. *Pharm Pharmacol*. 2021; 73(8)997-1006.

Judasz E, Lisiak N, Kopczyński P, Taube M, Rubiś B. The Role of Telomerase in Breast Cancer's Response to Therapy. *Int J Mol Sci*, 2022; 23(21):12844.

Jung CP, Motwani MV, Schwartz GK. Flavopiridol increases sensitization to gemcitabine in human gastrointestinal cancer cell lines and correlates with down-regulation of ribonucleotide reductase M2 subunit. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2001; 7(8):2527–36.

Karim AM, Eun Kwon J, Ali T, Jang J, Ullah I, Lee YG, Park DW, Park J, Jeang JW, Kang SC. Triple-negative breast cancer: epidemiology, molecular

mechanisms, and modern vaccine-based treatment strategies. *Biochem Pharmacol*, 2023; 212:115545.

Kashyap D, Pal D, Sharma R, Garg VK, Goel N, Koundal D, Zaguia A, Koundal S, Belay A. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. Biomed Res Int, 2022; 2022:9605439.

Keith C, Bible and Scott H. Kaufmann. Cytotoxic Synergy between Flavopiridol (NSC 649890, L86-8275) and Various Antineoplastic Agents: The Importance of Sequence of Administration. *Cancer Res*, 1997; 15;57(16):3375-80.

Khalili-Tanha G and Moghbeli M. Long non-coding RNAs as the critical regulators of doxorubicin resistance in tumor cells. *Cell Mol Biol Lett*. 2021; 23;26(1):39.

Khongthong P, Roseweir AK, Edwards J. The NF-KB pathway and endocrine therapy resistance in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2019; 26(6):R369-R380.

Kim HS, Lee YS, Kim DK. Doxorubicin exerts cytotoxic effects through cell cycle arrest and Fas-mediated cell death. *Pharmacology*, 2009; 84(5):300-9.

Kubiliute R, Januskeviciene I, Urbanaviciute R, Daniunaite K, Drobniene M, Ostapenko V, Daugelavicius R, Jarmalaite S. Nongenotoxic ABCB1 activator tetraphenylphosphonium can contribute to doxorubicin resistance in MX-1 breast cancer cell line. *Sci Rep*, 2021; 11(1):6556.

Kuete V, Karaosmanoğlu O, Sivas H. Chapter 10 - Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. Medicinal Spices and Vegetables from Africa, 2017; p: 271-297.

Kumar A, Jaitak V. Natural products as multidrug resistance modulators in cancer. *Eur J Med Chem*, 2019; 176:268-291.

Kwak MS, Yu SJ, Yoon JH, Lee SH, Lee SM, Lee JH, Kim YJ, Lee HS, Kim CY. Synergistic anti-tumor efficacy of doxorubicin and flavopiridol in an in vivo hepatocellular carcinoma model. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015; 141(11):2037-45.

Lee JJ, Lee HJ, Son BH, Kim SB, Ahn JH, Ahn SD, Cho EY, Gong G. Expression of FOXM1 and related proteins in breast cancer molecular subtypes. *Int J Exp Pathol*, 2016; 97(2):170-7.

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*, 2011; 121(7):2750-67.

Li L.L, Wei L, Zhang N, Wei W.Y, Hu C, Deng W, Tang Q.Z. Levosimendan protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the PTEN/Akt pathway. *BioMed Res. Int*, 2020; 8593617.

Li Z, Li H, Liu B, Luo J, Qin X, Gong M, Shi B, Wei Y. Inhibition of miR-25 attenuates doxorubicin-induced apoptosis, reactive oxygen species production and DNA damage by targeting PTEN. *Int. J. Med. Sci*, 2020; 1415-1427.

Liao GB, Li XZ, Zeng S, Liu C, Yang SM, Yang L, Hu CJ, Bai JY. Regulation of the master regulator FOXM1 in cancer. *Cell Commun Signal*, 2018; 16(1):57.

Liu J, Yuan Q, Ling X, Tan Q, Liang H, Chen J, Lin L, Xiao Y, Chen W, Liu L, Tang H. PARP-1 may be involved in hydroquinone-induced apoptosis by poly ADP-ribosylation of ZO-2. *Mol Med Rep*, 2017; 16(6):8076-8084.

Loibl S, Poortmans P, Morrow M, Denkert C, Curigliano G. Breast cancer. *Lancet*, 2021; 397(10286):1750-1769.

Łukasiewicz S, Czeczelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers (Basel)*, 2021; 13(17):4287.

Luke JJ, D'Adamo DR, Dickson MA, Keohan ML, Carvajal RD, Maki RG, de Stanchina E, Musi E, Singer S, Schwartz GK. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol potentiates Doxorubicin efficacy in advanced sarcomas: preclinical investigations and results of a phase I dose-escalation clinical trial. *Clin Cancer Res*, 2012; 18(9):2638-47.

Maashi MS, Al-Mualm M, Al-Awsi GRL, Opulencia MJC, Al-Gazally ME, Abdullaev B, Abdelbasset WK, Ansari MJ, Jalil AT, Alsaikhan F, Shalaby MN, Mustafa YF. Apigenin alleviates resistance to Doxorubicin in breast cancer cells by acting on the JAK/STAT signaling pathway. *Mol Biol Rep*, 2022; 49(9):8777-8784.

Madamsetty VS, Tavakol S, Moghassemi S, Dadashzadeh A, Schneible JD, Fatemi I, Shirvani A, Zarrabi A, Azedi F, Dehshahri A, Aghaei Afshar A, Aghaabbasi K, Pardakhty A, Mohammadinejad R, Kesharwani P. Chitosan: A versatile bio-platform for breast cancer theranostics. *J Control Release*, 2022; 341:733-752.

Madunić J, Madunić IV, Gajski G, Popić J, Garaj-Vrhovac V. Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. *Cancer Lett*, 2018; 413:11-22.

Maharjan S, Lee MG, Kim SY, Lee KS, Nam KS. Morin Sensitizes MDA-MB-231 Triple-Negative Breast Cancer Cells to Doxorubicin Cytotoxicity by Suppressing FOXM1 and Attenuating EGFR/STAT3 Signaling Pathways. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023; 16(5):672.

Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *J Epidemiol Glob Health*, 2019; 9(4):217-222.

McDonald ES, Clark AS, Tchou J, Zhang P, Freedman GM. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. *J Nucl Med*, 2016; 57 Suppl 1:9S-16S.

Meredith AM, Dass CR. Increasing role of the cancer chemotherapeutic Doxorubicin in cellular metabolism. *J Pharm Pharmacol*, 2016; 68(6):729-41.

Mi J, Zhang X, Rabbani ZN, Liu Y, Reddy SK, Su Z, Salahuddin FK, Viles K, Giangrande PH, Dewhirst MW, Sullenger BA, Kontos CD, Clary BM. RNA aptamer-targeted inhibition of NF-kappa B suppresses non-small cell lung cancer resistance to doxorubicin. *Mol Ther*, 2008, 16(1):66-73.

Miyashita A., Fukushima S., Nakahara S., Yamashita J., Tokuzumi A., Aoi J., Ichihara A., Kanemaru H., Jinnin M., Ihn H. Investigation of FOXM1 as a Potential New Target for Melanoma. *PLoS One*, 2015; 10(12):e0144241.

Motwani M, Delohery TM, Schwartz GK. Sequential dependent enhancement of caspase activation and apoptosis by flavopiridol on paclitaxel-treated human gastric and breast cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 1999; 5(7):1876–83.

Motwani M, Jung C, Sirotnak FM, She Y, Shah MA, Gonen M, et al. Augmentation of apoptosis and tumor regression by flavopiridol in the presence of CPT-11 in Hct116 colon cancer monolayers and xenografts. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2001; 7(12):4209–19.

Nandi D, Cheema PS, Jaiswal N, Nag A. FOXM1: Repurposing an oncogene as a biomarker. *Semin Cancer Biol*, 2018; 52(Pt 1):74-84.

Newcomb EW. Flavopiridol: pleiotropic biological effects enhance its anti-cancer activity. *Anticancer Drugs*, 2004; 15(5):411-9.

Oh SY, Rahman S, Sparano JA. Perspectives on PARP inhibitors as pharmacotherapeutic strategies for breast cancer. *Expert Opin Pharmacother*, 2021; 22(8):981-1003.

O'Regan RM, Nahta R. Targeting forkhead box M1 transcription factor in breast cancer. *Biochem Pharmacol*, 2018; 154:407-413.

Park YY, Jung SY, Jennings NB, Rodriguez-Aguayo C, Peng G, Lee SR, Kim SB, Kim K, Leem SH, Lin SY, Lopez-Berestein G, Sood AK, Lee JS. FOXM1 mediates DOX resistance in breast cancer by enhancing DNA repair. *Carcinogenesis*, 2012; 33(10):1843-53.

Patel DJ, Kozlowski SA, Rice JA. Hydrogen bonding, overlap geometry, and sequence specificity in anthracycline antitumor antibiotic.DNA complexes in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981; 78(6):3333-7.

Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015; 93:52-79.

Peter S, Alven S, Maseko RB, Aderibigbe BA. Doxorubicin-Based Hybrid Compounds as Potential Anticancer Agents: A Review. *Molecules*, 2022; 27(14):4478.

Pilco-Ferreto N, Calaf GM. Influence of Doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. *Int J Oncol*, 2016; 49(2):753-62.

Prasanna PL, Renu K, Valsala Gopalakrishnan A. New molecular and biochemical insights of Doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life Sci*, 2020; 250:117599.

Rahmani AH, Alsahli MA, Almatroudi A, Almogbel MA, Khan AA, Anwar S, Almatroodi SA. The Potential Role of Apigenin in Cancer Prevention and Treatment. *Molecules*, 2022; 27(18):6051.

Rajagopal C, Lankadasari MB, Aranjani JM, Harikumar KB. Targeting oncogenic transcription factors by polyphenols: A novel approach for cancer therapy. *Pharmacol Res*, 2018; 130:273-291.

Rivankar, Sangeeta . An overview of Doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2014; 10(4):s 853-858.

Rocca A, Braga L, Volpe MC, Maiocchi S, Generali D. The Predictive and Prognostic Role of RAS-RAF-MEK-ERK Pathway Alterations in Breast Cancer: Revision of the Literature and Comparison with the Analysis of Cancer Genomic Datasets. *Cancers (Basel)*, 2022; 14(21):5306.

Roh YG, Mun MH, Jeong MS, Kim WT, Lee SR, Chung JW, Kim SI, Kim TN, Nam JK, Leem SH. Drug resistance of bladder cancer cells through activation of ABCG2 by FOXM1. *BMB Rep*. 2018; 51(2):98-103.

Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol*, 2016; 59(4):651-672.

Saba R, Alsayed A, Zacny JP, Dudek AZ. The Role of Forkhead Box Protein M1 in Breast Cancer Progression and Resistance to Therapy. *Int J Breast Cancer*, 2016; 9768183.

Sabit H, Cevik E, Tombuloglu H, Abdel-Ghany S, Tombuloglu G, Esteller M. Triple Negative Breast Cancer in the Era of miRNA. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2020; 157:103196.

Sangweni NF, Gabuza K, Huisamen B, Mabasa L, van Vuuren D, Johnson R. Molecular insights into the pathophysiology of Doxorubicin-induced cardiotoxicity: a graphical representation. *Arch Toxicol*, 2022; 96(6):1541-1550.

Scherbakov AM, Andreeva OE. Apigenin Inhibits Growth of Breast Cancer Cells: The Role of ERα and HER2/neu. *Acta Naturae*, 2015; 7(3):133-9.

Seo HS, Ku JM, Choi HS, Woo JK, Lee BH, Kim DS, Song HJ, Jang BH, Shin YC, Ko SG. Apigenin overcomes drug resistance by blocking the signal transducer and activator of transcription 3 signaling in breast cancer cells. *Oncol Rep*, 2017; 38(2):715-724.

Shao X, Gao D, Wang Y, Jin F, Wu Q, Liu H. Application of metabolomics to investigate the antitumor mechanism of flavopiridol in MCF-7 breast cancer cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016; 1025:40-7.

Shati A.A. Doxorubicin-induces NFAT/Fas/FasL cardiac apoptosis in rats through activation of calcineurin and P38 MAPK and inhibition of mTOR signalling pathways. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, 2020; 660-676.

Shen M, Pan H, Chen Y, Xu YH, Yang W, Wu Z. A review of current progress in triple-negative breast cancer therapy. *Open Med (Wars)*, 2020; 15(1):1143-1149.

Sumarpo A, Ito K, Saiki Y, Ishizawa K, Wang R, Chen N, Sunamura M, Horii A. Genetic and epigenetic aberrations of ABCB1 synergistically boost the acquisition of taxane resistance in esophageal squamous cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020; 526(3):586-591.

Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP, Zhu HP. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*, 2017; 13(11):1387-1397.

Syahputra RA, Harahap U, Dalimunthe A, Nasution MP, Satria D. The Role of Flavonoids as a Cardioprotective Strategy against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Review. *Molecules*, 2022; 27(4):1320.

Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys*, 2015; 72(2):333-8.

Thomas R, Al-Khadairi G, Decock J. Immune Checkpoint Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer Treatment: Promising Future Prospects. *Front Oncol*. 2021; 25;10:600573.

Vaghari-Tabari M, Ferns GA, Qujeq D, Andevari AN, Sabahi Z, Moein S. Signaling, metabolism, and cancer: An important relationship for therapeutic intervention. *J Cell Physiol*, 2021; 236(8):5512-5532.

Wall NR, O'Connor DS, Plescia J, Pommier Y, Altieri DC. Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer research*. 2003; 63(1):230–5.

Wang S, Wang K, Wang H, Han J, Sun H. Autophagy is essential for flavopiridol-induced cytotoxicity against MCF-7 breast cancer cells. *Mol Med Rep*, 2017; 16(6):9715-9720.

Welsh JE. Chapter 40 - Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer. *Animal Models for the Study of Human Disease*, 2013; Pages 997-1018.

Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017;151:1-32.

Wu Q, Siddharth S, Sharma D. Triple Negative Breast Cancer: A Mountain Yet to Be Scaled Despite the Triumphs. *Cancers*, 2021; 23;13(15):3697.

Yu X, Ruan Y, Huang X, Dou L, Lan M, Cui J, Chen B, Gong H, Wang Q, Yan M, Sun S, Qiu Q, Zhang X, Man Y, Tang W, Li J, Shen T. Dexrazoxane ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting both apoptosis and necroptosis in cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2020; 523(1):140-146.

Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res*, 2020; 22(1):61.

Yuan Y, Cai T, Xia X, Zhang R, Chiba P, Cai Y. Nanoparticle delivery of anticancer drugs overcomes multidrug resistance in breast cancer. *Drug Deliv*, 2016; 23(9):3350-3357.

Zeidner JF, Karp JE. Clinical activity of alvocidib (flavopiridol) in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*, 2015; 39(12):1312-8.

Zhang YL, Ma Y, Zeng YQ, Liu Y, He EP, Liu YT, Qiao FL, Yu R, Wang YS, Wu XY, Leng P. A narrative review of research progress on FOXM1 in breast cancer carcinogenesis and therapeutics. *Ann Transl Med*, 2021; 9(22):1704.

Zhang YW, Shi J, Li YJ, Wei L. Cardiomyocyte death in Doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2009; 57(6):435-45.

Zhu JW, Charkhchi P, Adekunte S, Akbari MR. What Is Known about Breast Cancer in Young Women? *Cancers (Basel)*, 2023; 15(6):1917.

GEN KÖK
Genom ve Kök Hücre Merkezi
Genome and Stem Cell Center

Sayı: 68742022- 903.99.-012 22/02/2022
Konu: Değerlendirme,Onay

Sayın ; Prof.Dr.Zühal HAMURCU

"Doksorubisin Ve Flavopiridol Kombinasyonun Meme Kanser Hücrelerinde FOXM1/Ras/ MAPK ve NFkB Sinyal Yolağına Etkisi" başlıklı proje çalışmanızın Merkezimiz Genom Birimlerinde yapılması tarafımızca uygun bulunmuştur.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Not: Bu projeden çıkan bütün yayınlarınızda projenin Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezinde yapıldığına dair ibarenin kullanılması zorunludur.

Kullanım şekli: "Erciyes University Genome and Stem Cell Center (GENKOK)

Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi
Erciyes Üniversitesi Merkez Kampüsü / 38039 Kayseri / TÜRKİYE Telefon: +90 352 207 66 66 / 13 600 Telefon: +90 352 437 93 15
Faks: +90 352 437 93 16 E-mail: info@genkok.com E-mail: genkok@erciyes.edu.tr Web: www.genkok.com

Doksorubisin ve Flavopiridol kombinasyonunun meme kanser hücrelerinde FOXM1/RAS/MAPK ve NFKB sinyal yolağına etkisi

ORİJİNALLİK RAPORU

%12	%8	%1	%8
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
2	Submitted to Erciyes Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
3	Submitted to KTO Karatay Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
4	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	%1
5	Submitted to Istanbul Aydin University Öğrenci Ödevi	%1
6	Submitted to Ataturk Universitesi Öğrenci Ödevi	%1
7	www.utsakcongress.com İnternet Kaynağı	%1
8	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1

Submitted to Marmara University

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : İrem METİN

Uyruğu : Türkiye (TC)

EĞİTİM

DERECE	KURUM	MEZUNİYET
Lisans	Kastamonu Üniversitesi	4/ 2,82
Lise	Sincan Anadolu İmam-Hatip Lisesi	100/ 56

İŞ DENEYİMLERİ

YIL	KURUM	GÖREV
2017	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İmmünoloji Laboratuvarı	Stajyer
2018	Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü Kök Hücre Laboratuvarı	Stajyer

YABANCI DİL

İngilizce – Orta Seviye

Fransızca – Başlangıç Seviyesi

BİLDİRİ

7th International Erciyes Conference On Scientific Research	-	Flavopiridolün Meme Kanser Hücrelerinde Canlılığa Etkisi
7th International Erciyes Conference On Scientific Research	-	Glioblastoma Hücre Hattı Olan U-87MG Hücrelerinde Timokinonun Hücre Canlılığına Etkisi
7th International Erciyes Conference On Scientific Research	-	Glioblastoma Hücrelerinde Temozolomid ve miR-484 Kombinasyonunun Hücre Proliferasyonuna Etkisi

AKTİVİTELER

İş Güvenliği Eğitimi

Türkiye'de Sığır Yetiştiriciliği Konferansı

Yıldız Teknik Üniversitesi 4.Genetik Günü

Akan Hücre Ölçer Eğitimi

KYS'nin Ar-Ge Katlarına Uyarlanması Eğitimi

Deney Hayvanları ve Uygulama Yöntemleri