



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

EGFR İNHİBİTÖRÜNÜN (AG 1478) TRİPLE NEGATİF VE
LUMİNAL A MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE
ANTİPROLİFERATİF VE ANTİMETASTATİK ETKİLERİ

Nazlıcan İŞLEN

Biyoloji Anabilim Dalı

Radyobiyojoloji Programı

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Mehmet R. TOPÇUL

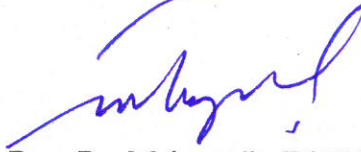
Mehmet R. Topçul

Haziran, 2017

İSTANBUL

Bu çalışma 3.07.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı,
Radyobiyojoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Yrd. Doç. Dr. Mehmet R. TOPÇUL(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



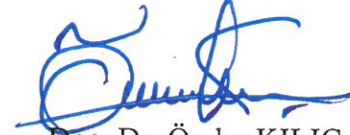
Prof. Dr. Ali KARAGÖZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN
İstanbul Kültür Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Doç. Dr. Murat BELİVERMİŞ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Önder KILIÇ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2016-21025 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışması olarak sunduğum bu çalışma, İstanbul Üniversitesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mehmet R. TOPÇUL danışmanlığında yürütülmüş ve sonuçlanmıştır. Tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübeleriyle beni her konuda destekleyen değerli ve saygıdeğer hocam Yrd. Doç. Dr. Mehmet R. TOPÇUL' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte elinden gelen desteği esirgemeyen, başımın sıkıştığı her konuda yardımcı olan, yön göstericim, tanımaktan mutluluk duyduğum değerli hocam Araş. Gör. Dr. İdil ÇETİN' e,

Tez çalışmam sırasında birçok konuda beni destekleyen ve sorularıma sıklıkla cevap veren, yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşım Tuğçe Nur ERALP' e,

Çalışmalarım sırasında elinden gelen desteği esirgememiş olan Kök Hücre ve Biyomoleküler Teknoloji Laboratuvarı üyesi Göksu GÜNEYDAŞ' a,

Bugünlere gelmemi sağlayan, eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve bütün sıkıntılı anlarımda beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme, eğitim ve kariyer hayatlarını kendime rehber olarak gördüğüm sevgili babam Mustafa İŞLEN ve annem Nesrin İŞLEN' e teşekkür eder, saygı ve sevgilerimi sunarım.

Haziran 2017

Nazlıcan İŞLEN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. MEME YAPISI.....	3
2.2. MEME KANSERİ	4
2.2.1. Luminal A Meme Kanseri.....	7
2.2.2. Luminal B Meme Kanseri.....	8
2.2.3. Bazal Benzeri / Triple Negatif Meme Kanseri.....	8
2.2.4. HER 2 Tip Meme Kanseri	8
2.3. EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ.....	9
2.4. EGFR TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ AG 1478.....	10
2.5. MEME KANSERİ TEDAVİSİ.....	11
3. MALZEME VE YÖNTEM	14
3.1. KULLANILAN HÜCRE SOYU	14
3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ	14
3.3. HÜCRELERİN EKİM İŞLEMİ.....	15
3.4. İNHİBİTÖR KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI.....	15
3.5. İNHİBİTÖR UYGULAMASI	15
3.6. MİTOTİK İNDEKS İÇİN PREPERATLARIN HAZIRLANMASI	16
3.7. HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRELERİ	16
3.7.1. Çoğalma Hızı: Metiltiazol Difenil Tetrazolyum (MTT) Testi.....	16
3.7.2. xCELLigence DP Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) Sistemi ile Hücre İndeksi Değerlerinin Belirlenmesi.....	17

3.7.3. Mitotik İndeks	18
3.7.4. İstatiksel Değerlendirme	18
4. BULGULAR	20
4.1. ÇOĞALMA HIZI	20
4.2. xCELLIGENCE GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ SİSTEMİ İLE HÜCRE İNDEKSİ	27
4.3. MİTOTİK İNDEKS	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	30
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	42



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Meme anatomisi [6].....	3
Şekil 2.2: AG 178 moleküler yapısı	10
Şekil 2.3: Kanser Hücrelerinde Anti-EGFR İlaçların Etki Mekanizmaları [2].	12
Şekil 3.1: xCELLigence DP cihazı ve E-Plate.	17
Şekil 4.1: 24 saat süresince 50 µM, 100 µM ve 150 µM AG 1478 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	22
Şekil 4.2: 24 saat süresince 20 µM, 100 µM ve 150 µM AG 1478 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	22
Şekil 4.3: 24 saat süresince 50µM, 100 µM ve 150 µM AG 1478 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	23
Şekil 4.4: 24 saat süresince 20µM, 100 µM ve 150 µM AG 1478 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	24
Şekil 4.5: 0-72 saat süresince 50µM AG 1478 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	26
Şekil 4.6: 0-72 saat süresince 20 µM AG 1478 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	26
Şekil 4.7: 50 µM, 100 µM ve 150 µM dozlarında AG 1478 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (-- Kontrol, -- 50 µM, -- 100 µM , -- 150 µM).	27
Şekil 4.8: 20 µM, 100 µM ve 150 µM dozlarında AG 1478 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (-- Kontrol, -- 20 µM, -- 100 µM , -- 150 µM).	27
Şekil 4.9: 0-72 saat süresince 50 µM AG 1478 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitotik indeks değerleri (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	29

Şekil 4.10: 0-72 saat süresince 20 µM AG 1478 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitotik indeks değerleri (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).29



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Meme karsinomasının moleküler sınıflandırılması [25].....	7
Tablo 4.1: 24 saat süresince 50µM, 100 µM ve 150µM AG 1478 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01)	21
Tablo 4.2: 24 saat süresince 20 µM, 100 µM ve 150 µM AG 1478 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	21
Tablo 4.3: 0-72 saat süresince 50 µM AG 1478 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	25
Tablo 4.4: 0-72 saat süresince 20 µM AG 1478 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	25
Tablo 4.5: 0-72 saat süresince 50 µM AG 1478 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitotik indeks değerleri (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	28
Tablo 4.6: 0-72 saat süresince 20 µM AG 1478 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitotik indeks değerleri (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	28

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

°C	: Santigrat
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
nm	: Nanometre

Kısaltmalar Açıklama

AMH	: Anti-müllerian hormon
AFC	: Antral folikül sayısı
COS	: Kontrollü yumurtalık uyarımı
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER	: Östrojen reseptörü
ErbB-2	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
FBS	: Fetal dana serumu
HCl	: Hidroklorik asit
HER2	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
MI	: Mitotik indeks
MTT	: 3-[4,5 dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolyum bromid
PR	: Progesteron reseptörü
RNA	: Ribonükleik asit
TKI	: Tirozin kinaz inhibitörleri

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EGFR İNHİBİTÖRÜNÜN (AG 1478) TRİPLE NEGATİF VE LUMİNAL A MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE ANTİPROLİFERATİF VE ANTİMETASTATİK ETKİLERİ

Nazlıcan İŞLEN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Mehmet R. TOPÇUL

Bu çalışmada Triple negatif meme kanseri ve Luminal A meme kanseri hücreleri üzerine EGFR inhibitörü olan AG1478' in etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır. Araştırmamızda Triple negatif meme kanseri modeli olarak MDA-MB-231 ve Luminal A meme kanseri modeli olarak da MCF-7 hücre hatları kullanılmıştır. Deneyleerde hücre kinetiği parametreleri olarak; çoğalma hızı, mitotik indeks ve apoptotik indeks değerlendirilmiştir.

Deneyleerde MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları için deneyleerde başlangıçta AG 1478'in farklı konsantrasyonları uygulanmıştır. IC₅₀ dozu MDA-MB-231 hücreleri için 50 µM, MCF-7 hücreleri için 20 µM olarak belirlenmiştir.

Tüm çalışmalar sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde her iki hücre hattında zamana bağlı olarak çoğalma hızı, hücre indeksi ve mitotik indeks değerlerinde anlamlı bir azalma gözlemlenmektedir.

Haziran 2017, 54. sayfa.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, EGFR, MCF-7, A-MB-231, AG1478

SUMMARY

M.Sc. THESIS

ANTIPROLIFERATIVE AND ANTIMETASTATIC EFFECTS OF EGFR INHIBITOR (AG 1478) ON TRIPLE NEGATIVE AND LUMINAL A BREAST CANCER CELLS

Nazlıcan İŞLEN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Mehmet R. TOPÇUL

In this study, it has been to determine the effects of AG1478 EGFR inhibitor on Triple negative breast cancer and Luminal A breast cancer cells. In our study, MDA-MB-231 cell line was used as a triple negative breast cancer model and MCF-7 cell line was used as a Luminal A breast cancer model. Proliferation rate, mitotic index and apoptotic index were evaluated as cell kinetics parameters in experiments.

For the MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines, different concentrations of AG 1478 were initially applied in the experiments. IC50 was determined to be 50 μ M for MDA-MB-231 cells and 20 μ M for MCF-7 cells.

When the data obtained from all studies are examined, a significant decrease is observed in the rate of proliferation, cell index and mitotic index values depending on time in both cell lines.

June 2017, 54. pages.

Keywords: Breast cancer, EGFR, MCF-7, MDA-MB-231, AG1478

1. GİRİŞ

Vücutun herhangi bir dokusunda hücrelerin anormal şekilde büyüyüp çoğalmasıyla kanser hücreleri, kanser hücrelerinin yoğunlaşmasıyla tümörler meydana gelir. Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi kromozomlarda meydana gelen mutasyonlar sonucunda olur. Hücreler birbirleri ile fiziksel olarak temas ettiklerinde hücreler arası mesaj iletimi olur. Bunun sonucu olarak çoğalmayı, hareketi, büyümeyi durdurabilirler. Oysa kanser hücreleri bu mesajı alamayıp çoğalmaya devam eder. Kanserde genellikle hücre zarı bozuklukları vardır. Bir hücre kanser hücresi haline dönüştüğünde hücre zarı yüzeyindeki karbonhidratlar değişikliğe uğrar. Kanser hücrelerinin buldukları bölgelerden kan ya da lenf damarları yoluyla vücudun başka bölgelerine taşınıp oraya yerleşmelerine metastaz denir. Metastaz bütün bir organı kaplayarak onu iş göremez hale getirebilirler. Ayrıca tümörler yalnızca buldukları doku ve organa zarar vermezler aynı zamanda yakınlarındaki organ ve dokulara da zarar verebilir.

Meme dokusunun hücrelerinde gelişen kanser meme kanseridir. Meme kanseri kadınlarda görülen kanser tipleri arasında birinci sırada yer almaktadır. Meme dokusunun herhangi bir yerinden kaynaklanabilir. En çok görülen tipleri arasında meme kanallarından kaynaklanan duktal kanser ve süt bezlerinden kaynaklanan lobüler kanser vardır.

Epidermal büyüme faktörü, reseptörü olan epidermal büyüme faktörü reseptörüne bağlanarak hücre büyümesi, proliferasyonu ve farklılaşmasını stimüle etmektedir. EGFR aşırı ekspresyonu tümörlere agresif bir fenotip kazandırmaktadır ve birçok solid tümör tipinde sık rastlanmaktadır [1]. Karsinomalarda EGFR'nin önemi göz önüne alındığında, EGFR'ye spesifik inhibisyon çeşitli insan kanserlerinin tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır [2].

Kanser tanı ve tedavisinde uygulanan yöntemler geliştirilmekte ve sağlıklı hücrelere zarar vermeden sadece kanserli hücreleri elimine etmeyi amaçlayan hedefe yönelik terapiler gibi yeni ve önemli yöntemler üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Son

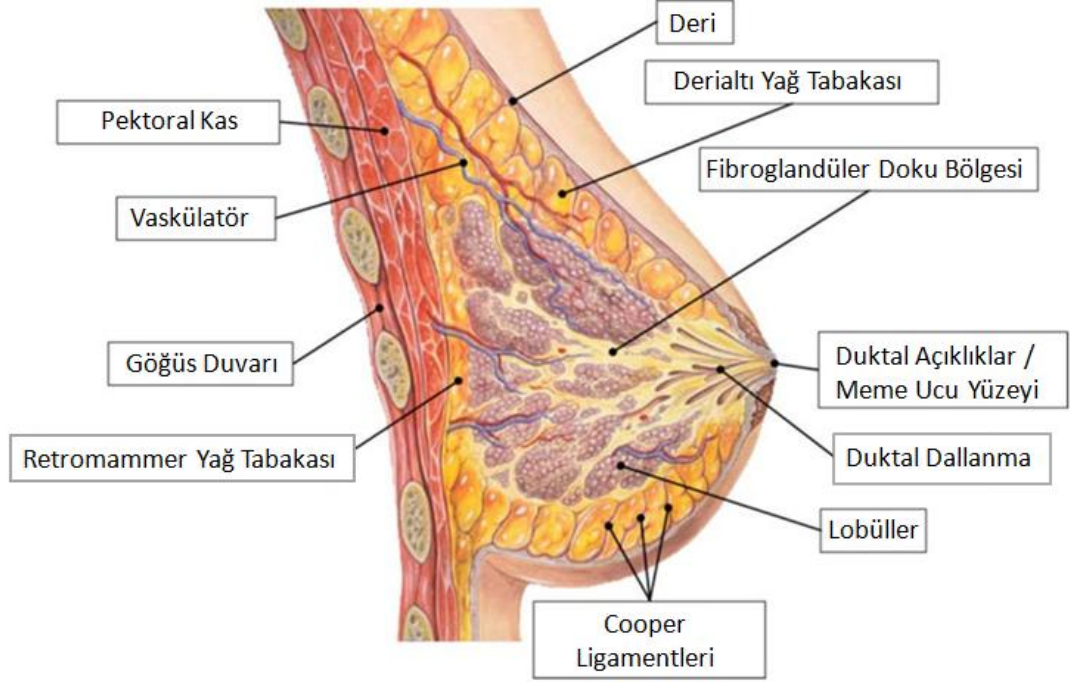
yıllar boyunca, erken tanı ve tedavi edici seçeneklerdeki önemli gelişmeler kanser hastalarında hayatta kalma oranlarının artmasına neden olmuştur. Bununla birlikte kanser tedavileri; hastalık reproduktif yıllarında teşhis edilenlerde infertilite de dâhil olmak üzere birçok potansiyel yan etki ile ilişkilendirilmiştir. Gelişmekte ve yaygınlaşmakta olan oosit ve embriyo kriyoprezervasyonu yöntemleri ile bu yan etkilerin ortadan kaldırılması amaçlanmaktadır [3].

Bu tez çalışmasında; meme kanserinin farklı tipleri üzerinde epidermal büyüme faktörü reseptörü inhibitörü AG 1478 in, hedefe yönelik tedavi edici ajan olarak kullanılarak kanser hücrelerinin hücre kinetiği parametrelerinde meydana getireceği değişikliklerin araştırılması ve bu sayede meme kanseri tedavisine katkı sağlaması amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. MEME YAPISI

Meme, kadınlarda en çok malignite teşhisi konan ve ergenlik, gebelik, emzirme, menopoz sonrası dönemlerde boyut, şekil ve fonksiyonunda büyük değişiklikler olan bilateral bir organdır [4]. Dişi memesi ön torasik duvarda bulunur ve ikinci kaburgadan altıncı kaburgaya kadar uzanır. Memenin yaklaşık üçte ikisi pektoralis majör kası üzerine gelir. Geri kalan kısmı ise serratus anterior kası ve abdominal oblik kasının üst kısmı ile temas eder [5].



Şekil 2.1: Meme anatomisi [6]

İnsan memesi parankimal ve stromal dokulardan oluşur. Parankim dokusu dallanma kanallarını oluşturur ve zamanla salgı kesecikleri oluşumuna yol açar. Stroma esas olarak yağ dokudan oluşur ve parankima için bir ortam sağlar. Memenin bu temel yapısı insan gelişiminin erken embriyonik safhasında oluşur [7].

Duktal sistemin ve asinusun (kesecik) gelişim süreci dallanma morfogenezi olarak adlandırılır. Dallanma morfogenezi fetüste başlar ve erken çocukluk döneminde durur ancak ergenlik çağında hormonal uyarılmanın etkisi ile farklılaşması tetiklenir [7]. Meme bezleri; sentezleme, salgılama ve yeni doğana süt üretme gibi özel işlevleri ile memelilere özgüdür. Bu fonksiyonu göz önüne alındığında, gebelik ve laktasyon döngüsü sırasında bezin mikro ve makro anatomisinde şiddetli değişikliğe neden olan hücresel seviyedeki hormonal etkiler bezin olgun gelişimsel bir duruma erişmesine neden olur [8].

Her memenin ortasında düz kaslar içeren bir meme ucu bulunur. Düz kaslar meme ucunun cinsel uyarılma, soğuk hava veya emzirilen bir bebeğe tepki olarak dik olmasına neden olur. Meme ucu çevresi pigmentli areoladır. Meme içerde süt üretmek üzere özelleşmiş olan meme bezlerini içerir. Meme bezleri yüzlerce küçük süt üreten lobülden oluşur. Her lobülün etrafındaki kontraktıl hücreler sütün serbest bırakılmasını sağlar ve kanallar memeye iletmesini sağlar. Memenin büyük kısmı yağ dokusundan oluşur, bu nedenle meme boyutu süt üretim potansiyelini göstermez. Fibröz bağ dokusu ağı meme bezlerini ve yağ dokusunu destekler [9].

2.2. MEME KANSERİ

Meme kanseri, küresel olarak kadınlarda kansere bağlı mortalitenin en yaygın nedenlerinden biridir. Çeşitli risk faktörleri ve klinik özellikleri olan heterojen bir hastalıktır. Genellikle kadın hastalığı olarak bilinmesine rağmen araştırmalar 1100 erkekte 1 gelişebilir olduğunu göstermektedir [10]. Meme kanseri için güncel terapötik yaklaşımlar arasında ameliyat, radyasyon, kemoterapi, endokrin terapi ve de hedefe yönelik terapi bulunmaktadır [11,12]. Meme kanseri kadınlarda erkeklere oranla 100 kat daha sık görülür. İnsidans oranı 45-50 yaşlarına kadar yaşla birlikte artar. Yaşam boyu östrojene maruz kalma en önemli risk faktörlerinden biridir. Erken menarş, geç menopoz, Batılı yaşam biçimi ile ilişkili daha az sayıda ve geç gebelikler, postmenopozal hormon replasman tedavisi, ksenoestrogenler (östrojen taklit eden bir ksenohormon türü) ve çocuk sahibi olmama östrojene maruz kalma süresini uzatmaktadır [13]. Bunlar dışında yaş, aile öyküsü, oral kontraseptiflerin kullanımı, radyasyona maruz kalma, alkol kullanımı ve iyi huylu meme hastalığı gibi nedenler de meme kanseri risk faktörleri arasındadır [14].

Östrojene uzun süreli maruz kalınması ve proliferasyon sürelerinin uzun döngüleri sonucu mutasyona uğrayabilen hücrelerin sayısı artar ve zamanla tümörleşmeye başlayan hücrelerinin proliferasyonu gerçekleşir. Özellikle gebelik sırasında meme duktal hücrelerinin farklılaşmasına neden olan ve diğer güçlü sinyaller süttten kesildikten sonra alveolar ve duktal hücrelerin yoğun apoptozuna neden olur. Bu sikluslar, tümörleşmeye başlayan hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve dokunun saflaştırılmasında rol alabilir. Bu yüzden erken yaşta çoklu gebelik geçirmenin uzun süreli emzirme dönemleri ile birlikte güçlü bir koruyucu etki yapabildiği düşünülmektedir [15,16].

Bir meme kanseri genomu, tümörün gelişimi boyunca meydana gelen mutajenik aktivitenin kayıdır. Her mutasyon tümörün yapısı konusunda bilgilendirici olabilir. Sürücü mutasyonlar kanser araştırmalarının uzun zamandır odak noktasıdır. Yolcu mutasyonları ise, DNA hasarı ve tümörigenez sırasında etkili olan DNA onarım süreçlerinin biyolojik olarak aydınlatıcıdır [17]. BRCA genleri DNA onarımı, hücre döngüsü kontrolü ve transkripsiyon gibi temel hücresel işlevlerde bulunan büyük proteinleri kodlamaktadır. BRCA genlerindeki germ hattı mutasyonları meme kanseri ile ilişkilidir. İncelenen popülasyonlarda BRCA-1 ve BRCA-2 genleri üzerinde meydana gelen mutasyonların meme kanseri riskinde yüksek bir artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca mutasyonların BRCA-2 geninde görülme oranı BRCA-1 genine göre daha fazladır [18]. Bu genlerdeki mutasyonların etkileri meme kanseri, over kanseri ve prostat kanseri gibi hormonal olarak ilişkili kanserler için spesifiktir. Yapılan çalışmalar BRCA1 geninin ürününün östrojen reseptör sinyalizasyonunda rol oynadığını ve BRCA2 geninin meme epitel hücrelerinin terminal farklılaşması ile ilgili fonksiyonunun olabileceğini göstermektedir [19,20].

Tümör mikroçevresi karsinom hücrelerini barındıran ve kan damarları, immün hücreler, fibroblastlar, kemik iliği kaynaklı inflamatuvar hücreler, lenfositler, endotel veya mezenkimal hücreler, sinyal molekülleri ve hücre dışı matriks gibi farklı bileşenlerden oluşan, ilaç aktivitesi ve etkinliği üzerinde önemli bir role sahip hücresel ortamdır. Mikroçevrede bulunan hücreler ekstrasellüler matriks tarafından çevrelenir ve bir vasküler ağ tarafından beslenirler [21,22]. Ekstrasellüler matriks çeşitli kanser hücre türleri için zengin bir glikozaminoglikan ve büyüme faktörleri kaynağıdır.

Biyokimyasal (büyüme faktörlerinin bağlanma kapasitesi) ve biyomekanik sinyaller sağlayarak hücre diferansiyasyonu regülasyonu, adhezyonu, hayatta kalımı, migrasyonu ve proliferasyonunda rol oynar [23]. Kanser hücreleri kendi ihtiyaçları için uygun mikroçevre oluşturabilirler. Yapılan çalışmalar mutasyonların sadece tümör hücreleri ile sınırlı olduğunu, ancak bu hücrelerin tümör mikroçevresinde yaşayan ve tümörojenik olmayan hücrelerde epigenetik modifikasyonlara neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca, karşılıklı etkileşimden dolayı, tümör hücreleri diğer tümör oluşturmeyen hücrelere de epigenetik modifikasyonlar uygularlar. Analizler meme kanseri hücrelerindeki, histon modifikasyonları, kromatin değiştirici faktörler, DNA metil transferazların ekspresyonundaki değişiklikler ve mikroRNA'lar dahil olmak üzere epigenetik değişikliklerin, tümör malignitelerini teşvik ettiğini göstermektedir [24]. Tümör mikroçevresi hedeflemenin meme kanseri tedavisinde umut verici bir tedavi yöntemi olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, yeni terapötik yaklaşımlar, kanser hücreleri ve stromal hücreler arasındaki etkileşimi normalize etmeyi ve bunun yanında bağışıklık sistemini modüle etmeyi ve antitümör aktiviteyi teşvik etmeyi amaçlar [21,24].

Günümüzde kanser araştırmalarında hücre kültürü yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre kültüründe belirli bir hücre hattından hücreler çoğaltılıp bunların üzerinde çeşitli *in vitro* çalışmalar yapılmaktadır. Kanser araştırmalarında hücre hatlarının kullanılmasının yararları vardır. Bu hücreler, standart hücre kültür ortamında kendini kopyalama yeteneğine sahip, kısmen homojen hücre popülasyonu elde edilmesini sağlamaktadır. Sınıflandırma; histolojik tip, lenf düğüm durumu, tümör derecesi gibi faktörlerin yanı sıra östrojen reseptörü (ER), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) gibi prediktif belirteçlerin varlığına bağlıdır. Meme kanseri; Luminal A, luminal B, HER2, bazal ve normal olmak üzere en az beş alt kategoride (Tablo 2.1.) sınıflandırılabilir [25]. Östrojen ve progesteron reseptörlerinin, HER2 amplifikasyonunun ve Ki-67 antijen ekspresyonunun durumunun belirlenmesi, hasta prognozunun tahmin edilmesi ve tedavi stratejisinin belirlenmesi açısından önem arz etmektedir [26].

Tablo 2.1: Meme karsinomasının moleküler sınıflandırılması [25]

Sınıflandırma	İmmünprofil	Diğer Özellikler	Hücre Hatları
Luminal A	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁻	Ki67 düşük, endokrin yanıt, kemoterapiye cevap verir	MCF-7, T47D, SUM185
Luminal B	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁺	Ki67 yüksek, genellikle endokrin yanıt, kemoterapi için değişken, HER2 ⁺ trastuzumab duyarlı	BT474, ZR- 75
Bazal	ER ⁻ , PR ^{+/-} , HER2 ⁻	EGFR ⁺ ve / veya sitokeratin 5/6 ⁺ , Ki67 yüksek, endokrin yanıt vermez, genellikle kemoterapiye cevap verir	MDA-MB- 468, SUM190
Düşük Klaudin	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	Ki67, E-kadherin, klaudin- 3, klaudin-4 ve klaudin-7 düşük, kemoterapiye ara cevap verir	MDA-MB- 231, BT549, SUM1315
HER2	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺	Ki67 yüksek, trastuzumab duyarlı, kemoterapiye duyarlı	MDA-MB- 453, SKBR3

1958'de ilk meme kanseri hücre hattı BT-20 oluşturulmuştur. Dünya'da yaygın olarak kullanılmaya devam eden meme kanseri hücre hatlarından biridir. 1973'te oluşturulan MCF-7 hücre hattı ise östrojen reseptörü (ER) ekspresyonu aracılığıyla hassas bir hormon duyarlılığına sahiptir bu da MCF-7 hücre hattının hormon cevap deneylerinde ideal bir model olmasını sağlamaktadır [25].

2.2.1. Luminal A Meme Kanseri

Luminal A alt tipi tümörler ER-pozitif ve HER2-negatiftir, düşük Ki-67 indeksi gösterir. Meme kanserlerinin yaklaşık % 30-70'i luminal A tümörleridir [27]. Luminal A tümörlerinde hücre proliferasyon aktivitesinin diğer alt tiplerden çok daha düşük olduğu ileri sürülmektedir [26], ER-pozitif olma eğiliminde oldukları için tedavi genellikle hormon tedavisini içerir. Luminal A tümörlerinde tümör alt tipleri içinde oldukça iyi sağ

kalım oranları ve oldukça düşük nüks etme oranları ile en iyi prognoza sahip olma eğilimindedir [28].

Luminal A meme kanseri hücre hatlarından biri de MCF-7 meme kanseri hücresi hattıdır. MCF-7 kanser hücreleri Amerika'nın Detroit bölgesinde yaşayan, metastatik özellikteki meme kanseri hastasının plevral efüzyonundan elde edilmiş ve Michigan Kanser Vakfı tarafından geliştirilmiştir. Günümüzde tüm Dünya laboratuvarları tarafından kullanılan standart model haline gelmiştir. Dr. Marc Lippman ve grubu DNA replikasyonunu timidin kullanarak izlemiş ve östrojenin uyarıcı etkilerini gözlemlemiştir. Östrojen doğrudan tümör büyümesini teşvik etmektedir [29].

2.2.2. Luminal B Meme Kanseri

Luminal B tümörleri ER-pozitif olma eğilimindedir. HER2-negatif veya HER2-pozitif olabilirler, yüksek bir Ki-67 indeksine sahiptir [26]. Luminal B tümürlü kadınlarda meme kanseri genellikle luminal A tümörleri olanlardan daha genç yaşta teşhis edilir. Meme kanserlerinin yaklaşık %10-20' si Luminal B tümörlerdir [27]. Luminal A tümörleri ile karşılaştırıldığında, bunlar daha kötü prognoza yol açan faktörlere sahip olma eğilimindedirler, sağ kalım oranları daha düşüktür [28,30].

2.2.3. Bazal Benzeri / Triple Negatif Meme Kanseri

Bazal benzeri meme kanserleri; Triple negatif olmayan bazal-benzeri meme kanseri ve Triple negatif bazal-benzeri meme kanseri olarak iki alt grupta incelenir. Bu alt tipler BRCA mutasyonunu takiben ER / PR negatif kanserlerde HER2 amplifikasyonu / mutasyonu oluşup oluşmadığına bağlı olarak ayrılır. Triple negatif olmayan bazal-benzeri meme kanserinde HER2 amplifikasyonu ve ekspresyonu vardır [32].

Triple negatif meme kanseri ise ER-negatif, PR-negatif ve HER2-negatiftir. Agresif davranışı ile bilinmektedir, daha genç yaşlarda ortaya çıkar. Triple negatif meme kanseri tüm meme kanserlerinin %15-20' sini oluşturur. Bu tümörler, metastaz progresyon eğilimi ve spesifik hedef tedavilerin bulunmaması nedeniyle daha agresif bir fenotipe ve daha kötü bir prognoza sahiptir [31-33].

2.2.4. HER 2 Tip Meme Kanseri

HER2 moleküler alt tipi, HER2-pozitif ile aynı değildir ve tedaviyi yönlendirmek için kullanılmaz. Çoğu HER2 tipi tümörler HER2-pozitiftir ve bu nedenle böyle adlandırılır

ancak yaklaşık %30'u HER2 negatiftir [34]. HER2 tipi tümörler ER-negatif, PR-negatif, lenf nodu-pozitif, daha düşük tümör derecesi olma eğilimindedirler. Meme kanserlerinin yaklaşık yüzde %5-15' i HER2 türüdür [35]. HER2 tipi tümürlü kadınlar, lümen A ve lümen B tümörlerdekilere göre daha genç yaşta teşhis edilebilir [28].

2.3. EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR); Epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesinin peptid büyüme faktörleri ile bağlandıktan sonra aktive olan, reseptör tirozin kinazların ErbB ailesine ait transmembran, 170 KD proteindir [36,37].

ErbB ailesi dört farklı reseptör içerir. Bunlar: EGFR (ErbB-1 / HER1), ErbB-2 (neu, HER2), ErbB-3 (HER3) ve ErbB-4 (HER4) tür. Bu ailenin tüm proteinleri bir ekstrasellüler ligand-bağlama domainine, tek bir hidrofobik transmembran domaine ve bir sitoplazmik tirozin kinaz içeren domaine sahiptir [36,37]. EGF ve transforme edici büyüme faktörü α (TGF α) gibi potansiyel ligandlar reseptörlere bağlanır, reseptör dimerizasyonu ve intrinsik kinaz domaini aktivasyonunu indükler ve sitoplazmik kuyruk içinde spesifik tirozin kalıntılarının ATP'ye bağlı fosforilasyonu ile sonuçlanır [38].

EGF ve EGFR, karsinomların gelişiminin birçok yönü ile ilgilidir. Yapılan çalışmalarla EGF reseptörünün aşırı ekspresyonunun, özellikle epidermal karsinomalarda tümorigenezis ve progresyon gibi patolojik süreçlerde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir [39,40], ayrıca kanser hastalarında tümör derecesi, tümör boyutu, lenf nodu metastazı, sağ kalım ve kemoterapiye direnç ile korelasyon gösterdiği de gösterilmiştir [41]. Bu nedenle EGFR antitümör tedavide potansiyel bir hedeftir. EGFR'nin aşırı ekspresyonu, meme kanseri, yumurtalık kanseri veya nazofaringeal karsinom ve diğer kanserlerdeki hastalarda kötü prognoz ve azalmış sağ kalım oranı ile ilişkilidir [42-44].

Son yıllarda yapılan kansere yönelik tedavi çalışmalarında EGFR önemli bir role sahiptir. EGFR' yi hedeflemek için iki ana ajan sınıfı geliştirilmiştir: tirozin kinaz inhibitörleri ve monoklonal antikolar. Tirozin kinaz aktivitesini inhibe etmek için EGFR' nin ATP cebine rekabetçi olarak bağlanır. Buna karşılık antikolar rekabetçi bir

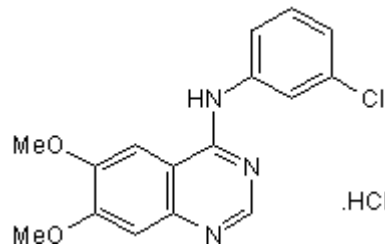
şekilde EGFR' ye ligand bağlanmasını engeller ve böylece reseptör aktivasyonunu engeller [45].

2.4. EGFR TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ AG 1478

Protein tirozin kinazlar; birçok sinyal iletim yolundaki temel enzimlerdir ve hücre düzenleyici süreçlerde mitogenezis, farklılaşma ve gelişme, onkogenezis, anjiogenezis, hücre sağ kalımı ve apoptoz, hücre şekli ve adezyonu, hücre döngüsü kontrolü, büyüme kontrolü, T-hücresi ve B-hücresi aktivasyonu, hücre dışı uyarılara yanıtlar, nörotransmitter sinyal verme, trombosit aktivasyonu, transkripsiyon kontrolü ve glikoz alımı gibi birçok önemli rol oynamaktadır [46-48]. Protein tirozin kinaz veya protein-tirozin fosfatazlardaki işlevsel bozulma, kanser, bağışıklık sistemi, diyabet, ateroskleroz ve sedef hastalığı gibi birçok yaygın hastalık ile sonuçlanabilir. Bu önemli rollerinden dolayı küçük molekül kinaz katalitik domain inhibitörleri geliştirilmektedir [49].

EGFR aktivasyonu, ligandın hücre dışı alana bağlanmasıyla ve daha sonra reseptörün hetero- ve homodimerizasyona yol açan ekstraselüler alanın konformasyonel değişikliği ile olur ve tirozin kalıntılarının hücre içi otofosforilasyonu ile sonuçlanır [40]. Protein tirozin kinaz inhibitörlerin çoğunluğu, enzimin ATP bağlama cebine bağlanarak sinyal iletimini bozmakta ve günümüzde klinik araştırmalarda kullanılmaktadır [49].

AG 1478 laboratuvar çalışmalarında kullanılan spesifik bir epidermal büyüme faktörü reseptörü tirozin kinaz inhibitörüdür [50].



Şekil 2.2: AG 1478 moleküler yapısı

Kimyasal İsmi: N-(3-Klorofenil)-6,7-dimetoksi-4-kinazolinanin hidroklorid,

Moleküler Formülü: $C_{16}H_{14}ClN_3O_2.HCl$

Moleküler Ağırlık: 352.22 gr

ABCG2, ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı ailesinin önemli bir üyesidir ve kanser hücrelerinde ilaç direnci kazandırdığı gösterilmiştir. Son yıllardaki araştırmalar, tirozin kinaz inhibitörü gefitinib'in, kanser hücrelerinde ABCG2 ve ters ABCG2 aracılı çoklu ilacı direnci fonksiyonunu modüle edebildiğini göstermektedir [51]. Bu yüzden yeni ve daha etkili EGFR tirozin kinaz inhibitörlerinin ve kombinasyonel kemoterapötik stratejilerin geliştirilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir. Aşırı duyarlı ilaç direnci olan, ABCG2 mutant insan meme kanseri hücre hattı MCF-7 hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar AG 1478' in ABCG2 yi aşırı eksprese eden hücreleri kemoterapötik ilaçlara karşı hassaslaştırdığını, çoklu ilaç direnci fonksiyonunu inhibe edebildiğini göstermiştir [52].

Zhu ve arkadaşlarının insan nazofaringeal karsinom hücre hattı CNE2 de yaptığı çalışmanın doz-etki ilişkisi sonuçları, AG1478'in EGFR' nin tirozin fosforilasyonunu doz bağımlı bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir [53].

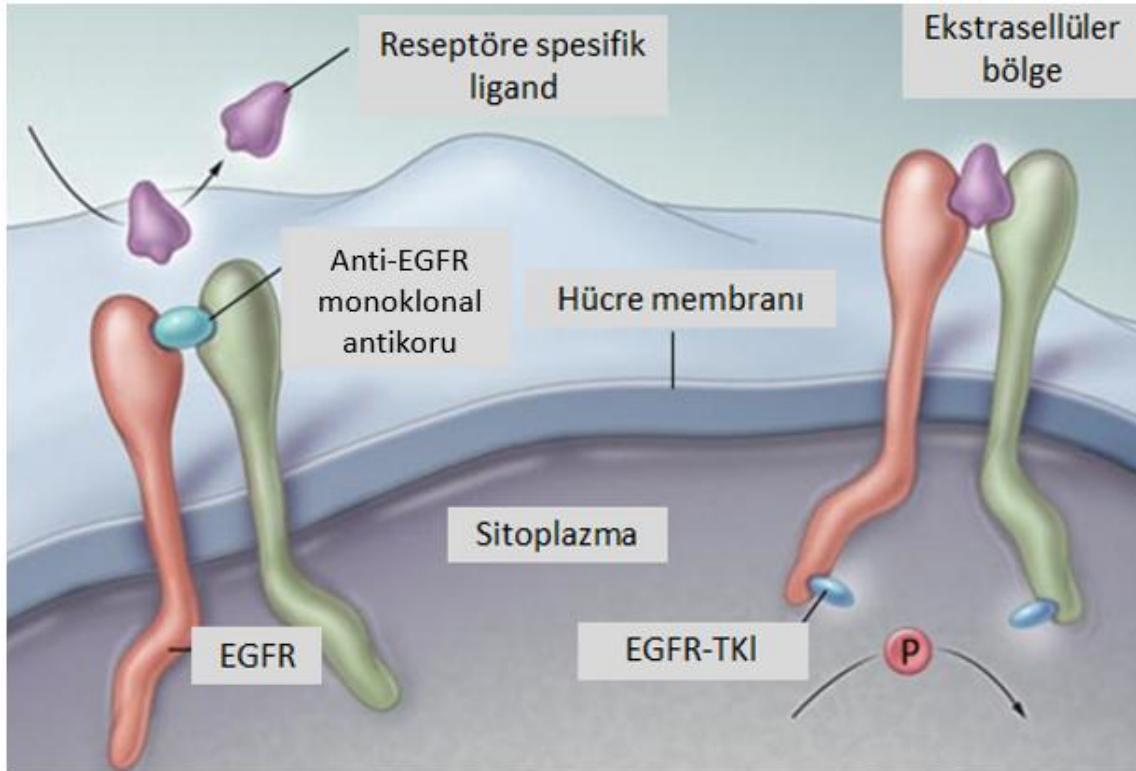
Yapılan çalışmalar AG 1478' in bazı Cisplatin' e dirençli akciğer kanseri türleri için klinik terapötik yaklaşım sağlayabileceğini göstermektedir. Ma ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada AG 1478' in Cisplatin' e dirençli A549/DDP hücre hattının hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve hücreleri G1 evresinde tuttuğu gözlemlenmiştir. Sonuçlar, AG 1478 uygulanan hücrelerdeki DNA sentezinin, muamele edilmemiş hücrelere kıyasla önemli ölçüde inhibe edildiğini ortaya koymuştur ayrıca hücre migrasyonunu ve invazyonunu da engellemektedir [54].

2.5. MEME KANSERİ TEDAVİSİ

Kanser; hastalığı saptamada, cerrahi işlemlerde, kemoterapi ve radyoterapide gelişmiş teknikler olmasına rağmen hala tedavisi zor bir hastalıktır. Erken evre meme kanserinde genellikle uygulanan tedavi cerrahi müdahaledir. Son zamanlarda birçok araştırmacı reseptörlerin ve büyüme faktörlerinin aşırı ekspresyonu, tümör süpresör geni inaktivasyonu ve onkogen aktivasyonlarının invaziv ve dirençli bir kanser fenotipinin gelişmesinin temel nedeni olduğunu ortaya çıkarmıştır. Hücre içi sinyal yollarındaki işlev bozukluklarının da aynı zamanda kanser gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynadığı bilinmektedir [39,55].

Meme kanseri tedavisinde; antiöstrojenlerin kullanılması gibi hormonal tedaviler veya hedefe yönelik tedaviler meme kanserinin alt tipi ile ilgili reseptörlerin ve hedeflerin tümör hücreleri tarafından anlatımı yapıldığı zaman etkin olabilmektedir. Hormonal tedavinin kemoterapiye göre daha az yan etkisi vardır [56,57]. Son yıllarda, hedefe yönelik tedavi yaklaşımları birçok kanser türünde olduğu gibi meme kanserinde de klasik yöntemlerin yerini almaktadır [58].

Kanser tedavisinde immünoterapi ile tedavi; immün sisteme ait hücrelerin programlanarak kanser hücrelerini hedef alıp yok etmesini sağlama amacına dayalıdır. İmmünoterapide tedavi; monoklonal antikolar ile tedavi, non-spesifik immünoterapi ve kanser aşılı olmak üzere 3 farklı yolla sağlanmaktadır. Monoklonal antikolar kanser hücrelerinin yüzeyinde yer alan reseptörlere bağlanarak aktivasyon ya da inhibisyona neden olabilirler. Örneğin, anti-CD 20 monoklonal antikoru apoptozu indüklerken, EGFR bağlayan antikor doğal ligandların bağlanmasını engelleyerek reseptör blokajına neden olur [1,39].



Şekil 2.3: Kanser Hücrelerinde Anti-EGFR İlaçların Etki Mekanizmaları [2].

Anti-EGFR monoklonal antikorlar, EGFR'nin ekstrasellüler alanına bağlanarak ligand bağlama ve reseptör aktivasyonunu bloke eder. Küçük molekülü EGFR tirozin kinaz inhibitörleri (TKI'lar) ise, intrasellüler EGFR tirozin kinaz katalitik domainine bağlanmak için ATP ile rekabet eder. Böylece EGFR otofosforilasyonu bloke olur. Bu inhibitörler ile tedavi sayesinde kanser hücrelerinde EGFR-bağımlı intrasellüler sinyaller etkilenir [2,45].

Meme kanseri tedavi yöntemlerinden biri de radyoterapidir. Bu yöntemin yan etkileri bulunmaktadır. Eski meme kanseri radyoterapi teknikleri ve bazı torasik tümörler için radyoterapi ile kullanılan yüksek torasik radyasyon dozları kalp hastalığı riskini artırır. Radyoterapi planlamasındaki ilerlemeler, çağdaş torasik radyoterapi sırasında kardiyak radyasyona maruz kalmayı önemli ölçüde azaltmıştır. Ancak çağdaş göğüs kanseri radyoterapisi sırasında kardiyak radyasyona maruz kalma yaşlı kadınlarda ejeksiyon fraksiyonu korunmuş kalp yetmezliği riskini ve doz bağımlı bir şekilde artırır [59].

Kanser tedavilerinden sonra ortaya çıkan yan etkileri ortadan kaldırmak için çalışmalar yapılmaktadır. Bu yan etkilerden biri de infertilitedir. Anti-müllerian hormon (AMH) ve antral folikül sayısı (AFC) genel popülasyonda over rezervinin yaygın olarak kullanılan işaretleyicileri olup, kanserli hastalarda da kontrollü yumurtalık uyarımı (COS) yanıtının belirleyicileri olarak kullanılabilir. Lee ve arkadaşları yaptığı çalışmada fertilitenin korunması amacıyla embriyo ve oosit kriyoprezervasyonu için yumurtalık uyarımı (letrozol eklenerek) uygulanan 126 meme kanseri hastasının 41'inde AMH ve AFC seviyelerinin over yanıtı için uygun olduğunu gözlemlemiştir. Meme kanseri hastalarının serum AMH düzeyleri, BRCA, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) veya HER2-neu durumu ile ilişki göstermemektedir [60].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN HÜCRE SOYU

Bu araştırmada Luminal A ve Triple Negatif meme kanseri hücre hatları ile çalışılmıştır. Luminal A meme kanseri modeli olarak MCF-7, Triple Negatif meme kanseri modeli olarak MDA-MB-231 hücre hattı soyları kullanılmıştır. Bu hücre soyları laboratuvarımızda rutin olarak kültüre edilen hücrelerdir.

MDA-MB-231 hücreleri, 100 µg/ml streptomisin (Streptomisin sülfat, İ.E. Ulugay), 100 IU/ml penisilin (Pronapen, Pfizer), Amhotericine B (Sigma), %10 Fetal Sığır Serumı (FBS, Gibco lab.) içeren pH'sı %4,4' lük NaHCO₃ ile 7.2' ye ayarlanabilen yüksek glikozlu DMEM doku kültürü besiyerinde yaşatılmaktadır. MCF-7 hücreleri ise, 100 µg/ml streptomisin (Streptomisin sülfat, İ.E. Ulugay), 100 IU/ml penisilin (Pronapen, Pfizer), Amhotericine B (Sigma), %10 Fetal Sığır Serumı (FBS, Gibco lab.) içeren pH'sı %4,4' lük NaHCO₃ ile 7.2' ye ayarlanabilen RPMI-1640 doku kültürü besiyerinde yaşatılmaktadır.

3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ

Hücreler konfluent olunca besi ortamı yetersiz hale gelir. Hücre atıkları besi ortamının pH 'sını asidik hale getirir ve atıklar hücrelere toksik etki yaratır. Bu da hücrelerin ölümüne sebep olur. Hücreler enzimatik reaksiyona tabi tutulup buldukları kültür ortamından kaldırılıp, hücre sayısı belirlendikten sonra, sayı azaltılarak kültür kaplarına geçirilirler. Bu sayede laboratuvarında hücre hatlarının devamlılığı sağlanmış olur.

Pasaj işlemi, hücrelerin buldukları kültür kaplarında tek tabaka haline geldiklerinde gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin yetiştirildikleri kültür kabı içinden kaldırılabilmesi için %0.25'lik tripsin eriyiği (Gibco Lab.) kullanılmıştır. Hücreler kaldırıldıktan sonra tripsinin hacmi ile 1:1 oranında besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi inaktif hale getirilmiş ve süspansiyon santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Süspansiyon 1500 rpm dönme hızında 3 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış, pellet üzerine kuyucuk başına

ekilecek olan hücre sayısı hesaplanarak sulandırma yapılmış ve ekim işlemine geçilmiştir.

3.3. HÜCRELERİN EKİM İŞLEMİ

Bağıl canlılık yüzdesini hesaplamak için 96 kuyucuklu kültür kaplarına her bir kuyucukta 30.000 hücre / 200 µl besiyeri olacak şekilde ekim yapılmıştır. Mitoz indeksi parametreleri için 24 kuyucuklu steril kültür kaplarının her bir kuyucuğunun içerisine steril yuvarlak lameller yerleştirilmiştir. Her bir kuyucuk başına 150.000 hücre / 300 µl besiyeri olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler lamellere yapıştıktan sonra her kuyucuğa 500 µl besiyeri eklenmiştir. Apoptoz indeksi için 12 kuyucuklu kültür kaplarına 50.000 hücre / kuyu olacak şekilde ekim işlemi gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik süre boyunca, 37°C’ de %95 hava ve %5 CO₂ karışımında inkübasyona devam edilerek hücreler deneye hazır hale getirilmiştir.

3.4. İNHİBİTÖR KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI

Uygulanan inhibitör konsantrasyonları daha önce yapılan *in vitro* çalışmalar temel alınarak saptanmıştır. Deneyler EGRF inhibitörü AG 1478’ in farklı konsantrasyonları ve bunların uygulandığı farklı zaman aralıklarında gerçekleştirilmiştir.

AG 1478 hidroklorid (Tocris), 10 mg toz halinde -20°C ‘de saklanmaktadır. Deneyler için DMSO’ da 10 Mm olacak şekilde 500µM / 10 mg çözülerek stok solüsyon elde edilmiş ve +4°C ‘de deneyler boyunca saklanmıştır. Deneylerde hücrelere uygulanmak istenen konsantrasyonlar; stok solüsyonun doku kültürü besiyeriyle seyreltilmesi sonucu elde edilmiştir.

3.5. İNHİBİTÖR UYGULAMASI

Deneyler 2 grup halinde gerçekleştirilmiştir.

Deney grupları:

I. MDA-MB-231 + AG 1478

II. MCF-7 + AG 1478 olarak belirlenmiştir.

Her bir grup kendi içerisinde kontrol ve ilaç grupları olarak ayrılmıştır. Kontrolü oluşturan gruplara inhibitör uygulaması yapılmamıştır. IC50 dozunu belirleyebilmek için MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine 20µM, 50µM, 100µM ve 150µM 'lık konsantrasyonlar uygulanmıştır. İnhibitör dozları 0-72 saatlik sürelerde uygulanmıştır.

3.6. MİTOTİK İNDEKS İÇİN PREPERATLARIN HAZIRLANMASI

Deney gruplarındaki hücrelerin inhibitör uygulama süreleri tamamlandığında, mitoz indeksi için yerleştirilip üzerine hücre ekilen lameller Carnoy fiksatif [glasiyal asetik asit: %96 etanol (1:3 v/v)] ile 10 dakika fikse edilmiş ve iki kez 5'er dakika % 70 etanol ile yıkanmıştır. Kuyucuklardan çıkarılan lameller filtre kâğıdının üzerine yerleştirilip kuruması beklenmiş ve şeffaf oje ile lamlara yapıştırılmıştır. Hazırlanan bu preparatlar kurutulmuş ve daha sonra Feulgen boyama yöntemi ile boyanmıştır.

3.7. HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRELERİ

3.7.1. Çoğalma Hızı: Metiltiazol Difenil Tetrazolyum (MTT) Testi

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) gibi tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. Proliferasyona uğrayan hücrelerde dehidrojenaz enzim aktivitesi artmaktadır. Dehidrojenaz enzimi tetrazolyumu dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözünebilen ancak suda çözünmeyen formazan kristallerine indirgemektedir. Bu sayede MTT testi ile mitokondriyal aktivite bozukluğu gösterilebilmektedir. Hücrelerin tetrazolyumu (sarı) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişimi absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülür [61].

AG 1478 in farklı dozlar halinde uygulanması sonucunda hücreler üzerinde meydana getirdiği sitotoksikite, MTT testi ile değerlendirilmiştir. Hücreler 96 kuyucuklu kültür kaplarına her bir kuyucukta 30.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler 24 saat etüvde bekletildikten sonra farklı konsantrasyonlarındaki AG 1478 dozları uygulanmıştır. Her doz için 20 tekrar yapılmıştır. Deney sürelerinin sonunda kuyucuklardaki besiyeri çekilip atılmış ve 40 µl MTT (5mg/ml) eklenmiştir. 4 saat beklendikten sonra MTT bulunan kuyucuklara 160 µl DMSO eklenerek çalkalayıcı etüvde 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan formazan kristallerinin bu işlemle çözünmesinin ardından deney gruplarının absorbans değerleri, 690 nm dalga boyu

referans alınarak 570 nm’de spektrofotometre ölçümleri gerçekleştirilmiştir (μ Quant, Bio-Tek Instruments INC.) [62].

3.7.2. xCELLigence DP Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) Sistemi ile Hücre İndeksi Değerlerinin Belirlenmesi

Hücre proliferasyonu ve hücre ölümlerinin belirlenmesindeki geleneksel yöntemler, kültüre hücrelerden belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak bunlar üzerinde biyokimyasal ölçümler yapılmasını içermektedir. Günümüzde çok yeni olarak bu amaçla kullanılmaya başlayan sistemler, kültüre hücrelerdeki çoğalma ve ölümleri, gerçek zamanlı ve devamlı bir şekilde, hücrelerin elektrik akımına karşı gösterdikleri direncin belirlenmesiyle gerçekleştirmektedirler. Bu sistemlerden biri de xCELLigence RTCADP sistemidir. xCELLigence RTCA-DP sisteminin temel ilkesi, alt yüzeyinde altın elektrotlar bulunan E-Plate yüzeyine yapışan hücre miktarı arttıkça akıma karşı oluşan direncin artması, yüzeye yapışan hücre miktarı azaldıkça, direncin de buna bağlı olarak azalması olgusuna dayanmaktadır. xCELLigence RTCA-DP sistemi aracılığıyla hücre proliferasyonu ve hücre ölümü gerçek zamanlı ve sürekli olarak kaydedilebilmekte ve kaydedilen veriler grafikler halinde bilgisayar ekranına aktarılmaktadır.



Şekil 3.1: xCELLigence DP cihazı ve E-Plate.

Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi xCELLigence DP kullanılarak elde edilecek hücre indeksi parametresinin değerlendirilebilmesi için 16 kuyucuklu E-Plate kullanılmıştır. Öncelikle E-Plate'in her bir kuyucuğuna 100 µl besiyeri eklenmiş ve xCELLigence DP cihazında background ölçümleri alınmıştır. Daha sonra MDA-MB-231 hücreleri için 100 µl besiyerinde 5.000 hücre, MCF-7 hücreleri için ise 100 µl besiyerinde 10.000 hücre olacak şekilde her bir kuyucuğa ekim yapılmıştır. Ekim işleminin ardından E-Plate'ler 20 dakika boyunca steril çalışma kabini içerisinde oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve daha sonra xCELLigence DP cihazındaki yerlerine yerleştirilerek 37⁰C ve %5 CO₂ ortam şartlarında inkübasyona devam edilmiştir. E-Plate'lere hücre ekimi gerçekleştirildikten sonra xCELLigence DP cihazına her 15 dakikada bir ölçüm alması için komut verilmiştir. Hücre ekiminde yaklaşık 24 saat sonra hücrelerin çoğalma fazının 1/3'lük diliminde EPlate'lerdeki besiyeri ilaçlı besiyeri ile değiştirilerek 72 saat süresince 15 dakika aralıklarla ölçüm alınmaya devam edilmiştir. Konsantrasyona ve zamana bağımlı hücre indeksi değerlerine ait grafikler bilgisayar ekranına aktarılmıştır [63].

3.7.3. Mitotik İndeks

Deney gruplarına göre hazırlanan preparatlar ilk olarak oda sıcaklığındaki 1 N HCl ile 1 dakika daha sonra 60⁰C deki 1 N HCl ile 10 dakika hidroliz edilmiştir. Hidroliz işleminin ardından preparatlara 1 saat boyunca Feulgen metodu uygulanmıştır. Bu preparatlar daha sonra Feulgen metodunun yıkama solüsyonu ile her biri 2 dakika olmak üzere 3 kez yıkanmış ve havada kurutulmuştur. Preparatlar kurduktan sonra 2 dakika süre ile Giemsa boyası ile boyanmıştır. Sayım için hazır duruma gelen preparatlardan mitoz indeksi (MI) değerlerini saptamak amacıyla geç, profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evreleri sayılmıştır. Erken profaz evresi interfaz grubundaki hücelere morfolojik olarak benzerlik gösterdiği için bu evre ile birlikte değerlendirilmiştir. Uygulanan inhibitör konsantrasyonu her süre için üçer preparat olarak değerlendirilmiş ve her bir preparattan ortalama 3.000 hücre sayılarak, MI değerleri saptanmıştır.

3.7.4. İstatiksel Değerlendirme

Tüm deney gruplarına uygulanan konsantrasyonların ve zamana göre saptanan hücre kinetiği parametrelerinin değerleri kontrol gruplarına ve birbirlerine göre değerlendirilmiştir. Deney gruplarından saptanan değerlere tek yönlü ANOVA testi

uygulanmıştır. Grupların kontrole göre anlamlılıkları DUNNETT'S testi ile değerlendirilirken, grupların birbirleri ile olan anlamlılıkları ise t-testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerde $p < 0.01$ anlamlılık seviyesi temel alınmıştır.



4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında hedefe yönelik tedavide kullanılması amaçlanan EGFR inhibitörü AG 1478 kullanılmıştır. *In vitro* koşullarda östrojen, progesteron reseptörü ve HER-2 gen anlatımı negatif olan triple negatif meme kanseri hücreleri MDA-MB-231 ile östrojen reseptörü pozitif meme kanseri hücreleri MCF-7 üzerine bu inhibitör, değişik süre ve konsantrasyonlarda uygulanmış; çoğalma hızı, mitotik indeks ve apoptotik indeks verilerinin değerlendirmeleri yapılmıştır. Bu inhibitörün Triple negatif ve Luminal A meme kanseri modeli olarak kullanılan MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerinde meydana getirdiği antiproliferatif etkiler araştırılmıştır.

4.1. ÇOĞALMA HIZI

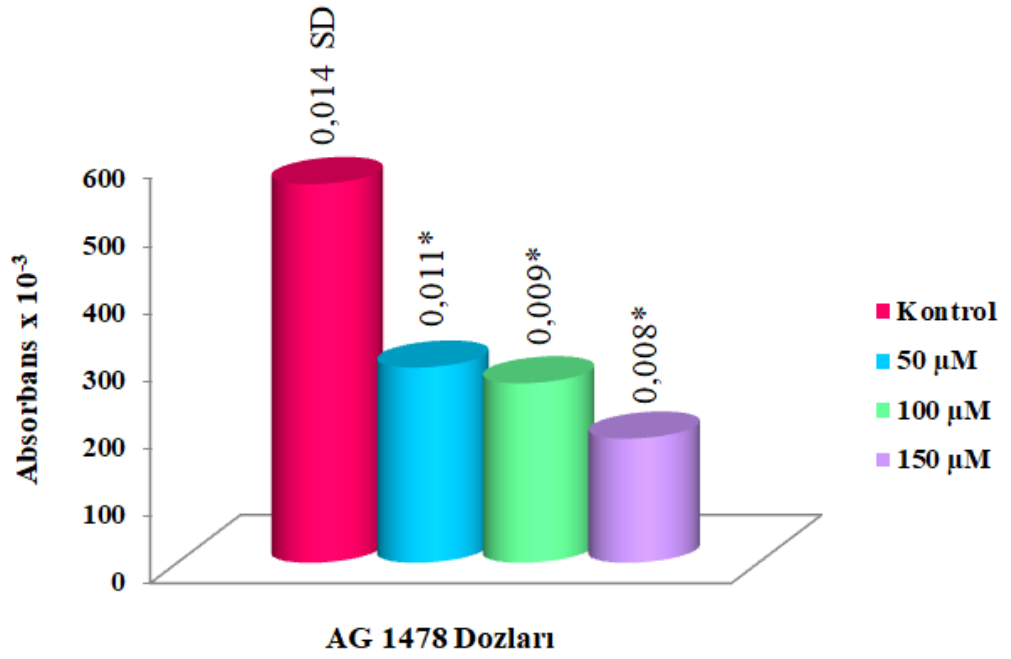
Triple negatif meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 ve östrojen reseptörü bakımından pozitif olan MCF-7 hücre hatları üzerine AG 1478' in hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana getirdiği değişikliklerin belirlenmesi amacıyla, kültüre edilen hücelere ilk olarak 24 saat süresince başlangıçta 20 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM inhibitör konsantrasyonları kullanılmıştır. İnhibitör uygulanmayan kontrol grubu ile paralel yürütülen deney serilerinden elde edilen absorbans değerleri Tablo 4.1 ve 4.2. ile Şekil 4.1. ile Şekil 4.2. de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: 24 saat süresince 50µM, 100 µM ve 150µM AG 1478 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01)

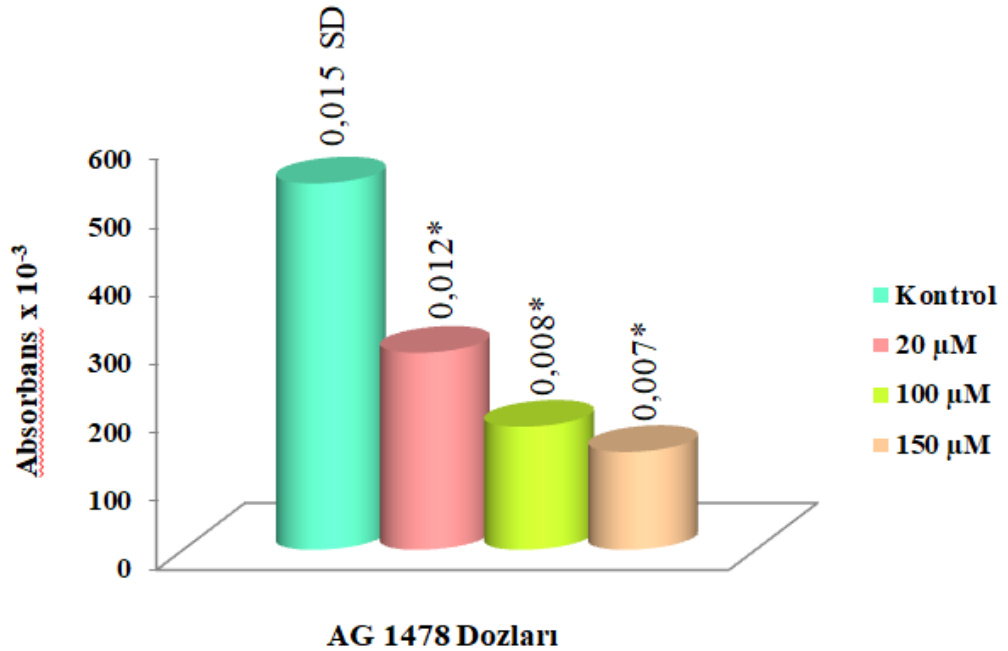
Deney Grupları	<u>Absorbans Değerleri (450-690 nm)</u>
Kontrol	561,636 x 10⁻³ ± 0,014^{SD}
50 µM	289,5 x 10⁻³ ± 0,011*
100 µM	266,15 x 10⁻³ ± 0,009*
150 µM	184,1 x 10⁻³ ± 0,008*

Tablo 4.2: 24 saat süresince 20 µM, 100 µM ve 150 µM AG 1478 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).

Deney Grupları	<u>Absorbans Değerleri (450-690 nm)</u>
Kontrol	535,727 x 10⁻³ ± 0,015^{SD}
20 µM	288,166 x 10⁻³ ± 0,012*
100 µM	180 x 10⁻³ ± 0,008*
150 µM	143,166 x 10⁻³ ± 0,007*

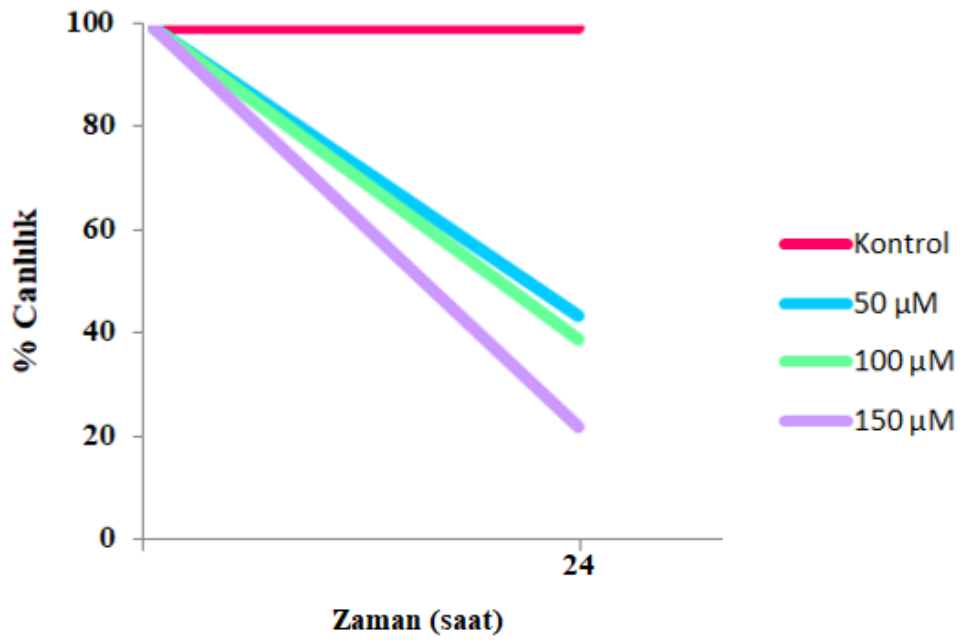


Şekil 4.1: 24 saat süresince 50 µM, 100 µM ve 150 µM AG 1478 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrole göre anlamlı $p<0.01$).



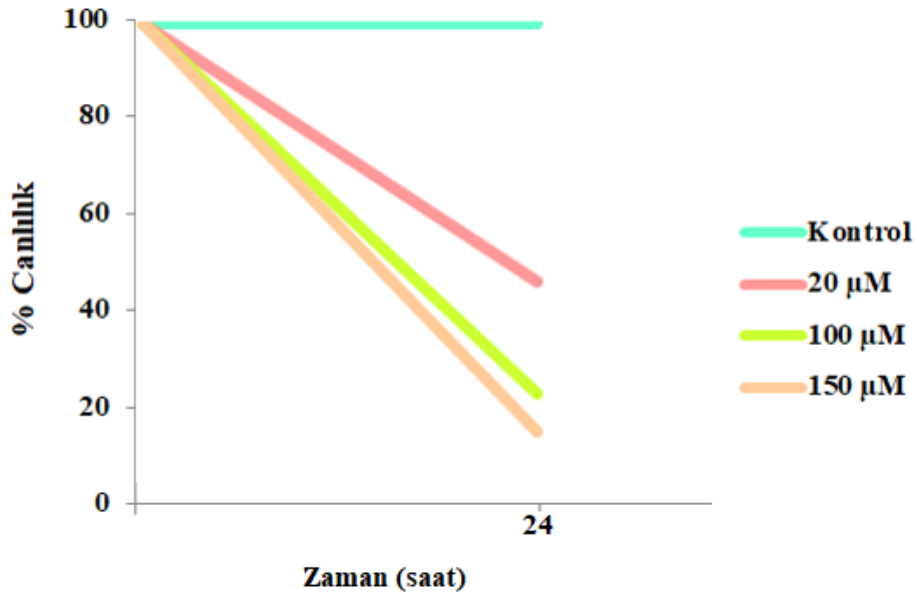
Şekil 4.2: 24 saat süresince 20 µM, 100 µM ve 150 µM AG 1478 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrole göre anlamlı $p<0.01$).

Absorbans değerleri incelendiğinde; MDA-MB-231 hücresi için % 100 kabul edilen kontrol grubuna göre 50 μ M'lık AG 1478 konsantrasyonunun hücrelerin canlılığını % 51,8 'e, 100 μ M AG 1478 konsantrasyonunun % 47,63 'e ve 150 μ M AG 1478 konsantrasyonunun ise % 32,95 'e düşürdüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3: 24 saat süresince 50 μ M, 100 μ M ve 150 μ M AG 1478 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p < 0.01$).

MCF-7 hücrelerine ait absorbans değerleri incelendiğinde ise % 100 kabul edilen kontrol grubuna göre 20 μM 'lık AG 1478 konsantrasyonunun hücrelerin canlılığını % 51,76 'ya, 100 μM AG 1478 konsantrasyonunun % 45,42 'ye ve 150 μM AG 1478 konsantrasyonunun ise % 37,94 'e düşürdüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: 24 saat süresince 20 μM , 100 μM ve 150 μM AG 1478 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrolle göre anlamlı $p < 0.01$).

Elde edilen veriler doğrultusunda MDA-MB-231 hücre hattı için 50 μM AG 1478, MCF-7 hücre hattı için ise 20 μM AG 1478 konsantrasyonu hücrelerin yarısının ölümüne neden olan IC_{50} dozu olduğu görülmektedir. Elde edilen verilerin kontrole göre istatistiksel açıdan $p < 0.01$ seviyesinde anlamlı olduğu belirlenmiştir.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları için belirlenmiş olan IC₅₀ dozlarının 0-72 saat süresince uygulanması sonucunda elde edilmiş olan absorbans değerleri Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

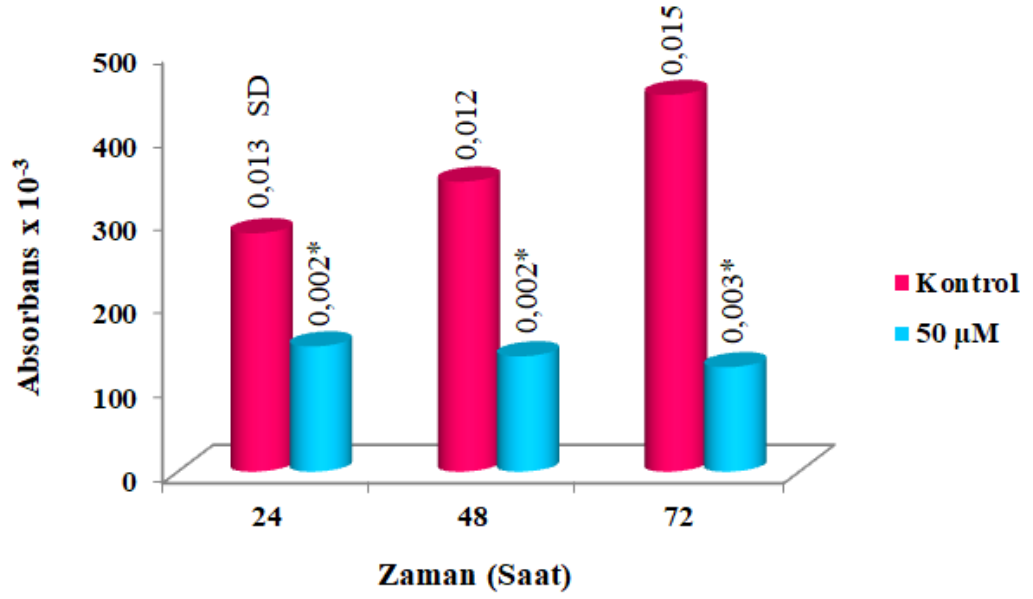
Tablo 4.3: 0-72 saat süresince 50 µM AG 1478 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).

Zaman (Saat)	Absorbans Değerleri (450-690 nm)	
	Kontrol	50 µM
24	283,63 x 10 ⁻³ ± 0,013 ^{SD}	149 ± 0,002*
48	345 x 10 ⁻³ ± 0,012	137,18 ± 0,002*
72	448,13 x 10 ⁻³ ± 0,015	124,25 ± 0,003*

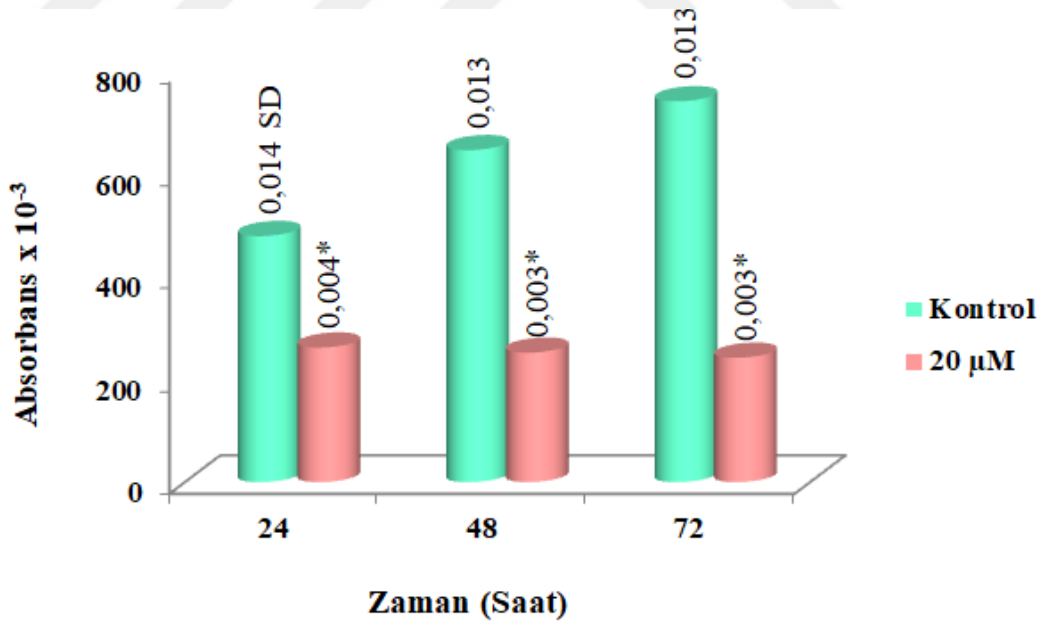
Tablo 4.4: 0-72 saat süresince 20 µM AG 1478 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).

Zaman (Saat)	Absorbans Değerleri (450-690 nm)	
	Kontrol	20 µM
24	479,125 x 10 ⁻³ ± 0,014 ^{SD}	262,11 ± 0,004*
48	646,375 x 10 ⁻³ ± 0,013	252,15 ± 0,003*
72	741,375 x 10 ⁻³ ± 0,013	242,18 ± 0,003*

0-72 saatlik absorbans değerlerine ait grafikler incelendiğinde MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin çoğalma hızlarında zamana bağlı olarak kontrole göre istatistiksel açıdan p<0.01 seviyesinde anlamlı bir düşüşün meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



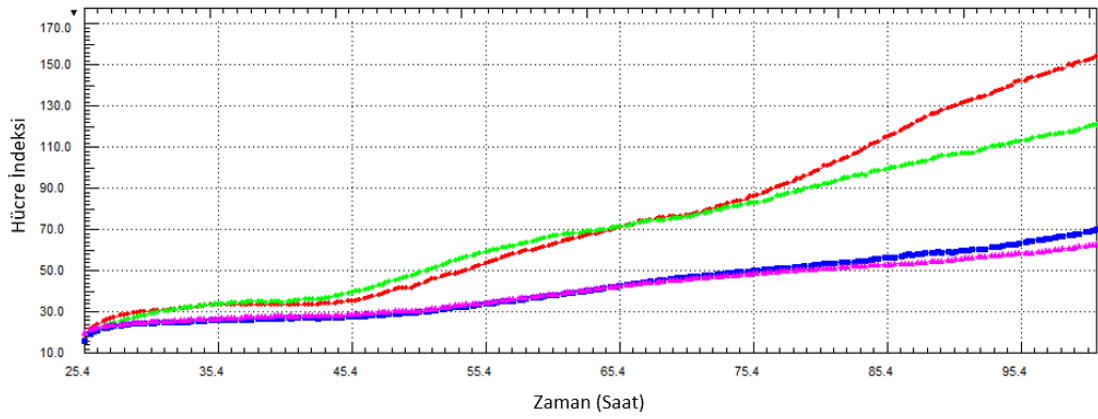
Şekil 4.5: 0-72 saat süresince 50µM AG 1478 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).



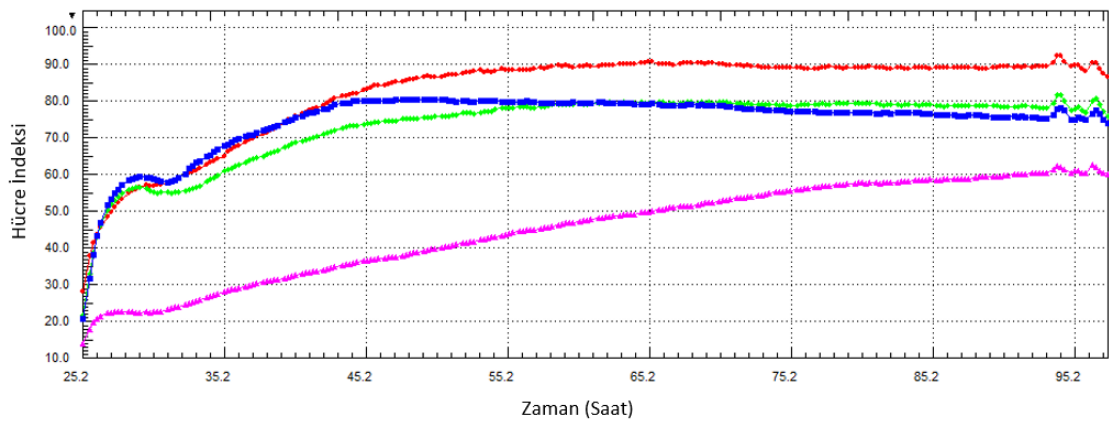
Şekil 4.6: 0-72 saat süresince 20 µM AG 1478 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).

4.2. XCELLİGENCE GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ SİSTEMİ İLE HÜCRE İNDEKSİ

AG 1478 in MDA-MB-231 hücre hattına 50 μ M, 100 μ M ve 150 μ M, MCF-7 hücre hattına 20 μ M, 100 μ M ve 150 μ M konsantrasyonlarda uygulanması sonucunda gerçek zamanlı hücre analiz sisteminden elde edilen hücre indeksi değerleri incelendiğinde; ajanın hücreler üzerinde antiproliferatif etkilerinin olduğu görülmektedir. Hücre indeksi değerlerine ait grafiğin eğrileri, kullanılan standart eğriler ile karşılaştırıldığında, uygulanan tüm AG 1478 konsantrasyonlarının her iki hücre hattında da sitostatik etki meydana getirdiğini düşündürmektedir.



Şekil 4.7: 50 μ M, 100 μ M ve 150 μ M dozlarında AG 1478 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (-- Kontrol, -- 50 μ M, -- 100 μ M , -- 150 μ M).



Şekil 4.8: 20 μ M, 100 μ M ve 150 μ M dozlarında AG 1478 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (-- Kontrol, -- 20 μ M, -- 100 μ M , -- 150 μ M).

4.3. MİTOTİK İNDEKS

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerine AG 1478 uygulanması sonucunda, mitotik indeks değerlerindeki değişimi belirlemek amacıyla; 0-72 saat süresince kültüre edilen MDA-MB-231 hücrelerine 50 μ M ve MCF-7 hücrelerine 20 μ M inhibitör konsantrasyonları uygulanmıştır. İnhibitör uygulanmayan kontrol grubu ile paralel yürütülen deney sonucu elde edilen mitotik indeks değerleri Tablo 4.5 ve tablo 4.6 da gösterilmiştir.

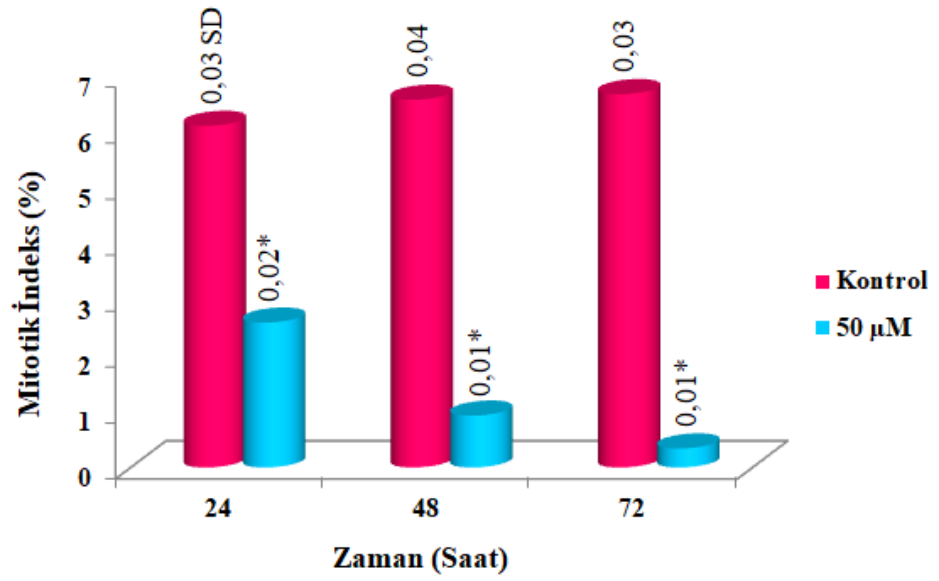
Tablo 4.5: 0-72 saat süresince 50 μ M AG 1478 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitotik indeks değerleri (* Kontrolle göre anlamlı $p<0.01$).

Zaman (saat)	Mitotik İndeks (%)	
	Kontrol	50 μ M
24	6,13 \pm 0,03 ^{SD}	2,6 \pm 0,02*
48	6,6 \pm 0,04	0,93 \pm 0,01*
72	6,7 \pm 0,03	0,34 \pm 0,01*

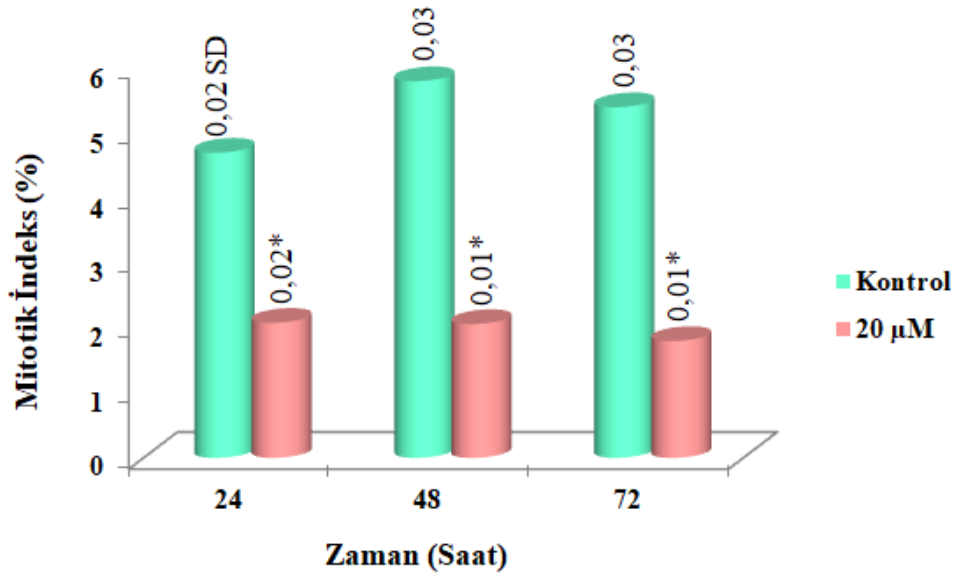
Tablo 4.6: 0-72 saat süresince 20 μ M AG 1478 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitotik indeks değerleri (* Kontrolle göre anlamlı $p<0.01$).

Zaman (saat)	Mitotik İndeks (%)	
	Kontrol	20 μ M
24	4,7 \pm 0,02 ^{SD}	2,08 \pm 0,02*
48	5,8 \pm 0,03	2,06 \pm 0,01*
72	5,4 \pm 0,03	1,8 \pm 0,01*

Şekil 4.9. ve Şekil 4.10. da görüldüğü gibi AG 1478 uygulaması sonucu MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerine ait mitotik indeks değerleri zamana bağlı olarak anlamlı ölçüde düşüş göstermiştir. Meydana gelen bu düşüşün her iki hücre soyunda da istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0.01$) saptanmıştır.



Şekil 4.9: 0-72 saat süresince 50 µM AG 1478 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitotik indeks değerleri (* Kontrolle göre anlamlı $p < 0.01$).



Şekil 4.10: 0-72 saat süresince 20 µM AG 1478 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitotik indeks değerleri (* Kontrolle göre anlamlı $p < 0.01$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çağımızın en önemli hastalıklarından biri olan kanserin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi, kullanılan yöntemlerin etkinliklerinin artırılması ve yan etkilerinin giderilmesi amaçları doğrultusunda tedavilerin belirli hedeflere yönlendirilmesi hastaların sağ kalım şanslarını yükseltmektedir.

Triple negatif meme kanseri kötü prognoza ve agresif bir fenotipe sahiptir. Hormon reseptörlerini ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 yi hedef alan ilaçlara duyarsızdır. Bu nedenle, triple negatif meme kanserini tedavi etmek için etkili bir terapötik reaktifin geliştirilmesi gereklidir [64].

Tirozin kinaz inhibitörlerinden AG1478, laboratuvar çalışmalarında HER1 inhibitörü olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.

EGF, HER1'e bağlanır ve onun tirozin kinaz aktivitesini aktive eder. Bu olayda, mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) yolaklarının aktivasyonu ile sonuçlanır. HER1, klasik bir MAPK yolu olarak bilinen Ras-Raf-MEK-ERK yolağı aracılığıyla sinyal verir. MAPK aktivasyonu, büyüme faktörlerinin bir sensörü olarak hizmet eden siklin D1'in indüksiyonu ile sonuçlanır ve genellikle siklin bağımlı kinazları aktive veya inhibe edebilen p21'in eşzamanlı indüksiyonu ile sonuçlanır [65,66].

Bishop ve arkadaşları kanser hücrelerinin EGFR ailesinin farklı inhibitörlerine karşı gösterdikleri hassasiyetleri inceleyen çalışmalarında, bütün HER1 ekspresyonu olan hücrelerde HER1 ve MAPK sinyalizasyonunun AG 1478 tarafından inhibe edildiğini gözlemlemiştir. Bu çalışmada AG 1478' in hücrelerin G₁ fazında duraklamasına aracılık ettiği ve yüksek HER1 ekspresyonu olan hücre hatlarında; düşük konsantrasyonlarda inhibitörün hem HER1 fosforilasyonunu hem de MAPK yolağını potansiyel olarak inhibe ettiği, düşük HER1 eksprese eden hücre hatlarında ise aynı etkiler için daha yüksek inhibitör konsantrasyonlarına ihtiyaç olduğu gözlemlenmiştir [67].

Yapılan bu çalışmada; Triple negatif ve Luminal A meme kanseri hücre hatlarına farklı konsantrasyonlarda AG 1478 uygulanıp xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile değerlendirildiğinde, elde edilen hücre indeksi değerleri ve bu değerlerden elde edilen eğrilerin standart eğrilerle karşılaştırılması sonucunda eğrilerin her iki hücre hattı için hücreler de, hücre büyümesini durdurucu etki meydana getirdiğini düşündürmesi, yukarıda ki literatür de bahsedilen AG 1478' in G₁ fazında duraksamaya aracılık etmesi ile uygunluk göstermektedir.

EGFR 'nin aktivasyonu, PI3K / AKT sinyal yolları (sağ kalım sinyali) da dâhil olmak üzere hücre içi sinyal yollarının aktivasyonuna yol açtığından, AG1478 ile EGFR aktivasyonunun inhibisyonu PIK3CA gen durumuna bağlı olarak apoptozu indükleyebilmektedir. Baba ve arkadaşları AG1478'in farklı PIK3CA gen statüsüne sahip kanser hücreleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. PIK3CA mutant baş ve boyun skuamöz hücreli karsinoma üzerinde yaptıkları çalışmada; mutant PIK3CA geni olan hücrelerin EGFR fosforilasyonu inhibisyonu için yeterli konsantrasyonda AG 1478 ile muamele edilmesine rağmen apoptoz girmediği, buna karşılık doğal fenotip PIK3CA genine sahip hücrelerde doza bağlı olarak apoptoz indüklendiği bulgularını elde etmiş ve AG1478 'in apoptotik etkisinin PIK3CA gen durumuyla derinden ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir [68].

Zhang ve arkadaşlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde yaptığı çalışmada AG1478' in EGFR, ERK1 / 2 ve AKT sinyal yollarının aktivasyonunu engelleyebildiği ve iki hücre hattının EGFR 'yi farklı seviyelerde eksprese ettikleri halde inhibitörün hücre hatları üzerinde benzer antiproliferatif etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte çalışma AG 1478 'in bu hücre hatlarında telomeraz aktivitesini doza bağımlı olarak baskıladığını ve apoptozu indüklediğini göstermektedir. Bu sonuçlar, AG 1478 'in meme kanseri hücrelerinde hücrel apoptotik yanıtı teşvik edebileceğini göstermektedir [69].

AG 1478 ile yapılan çalışmalar antitümör etkinliğine sahip olduğunu göstermektedir. *in vitro* çalışmalarda inhibitör, glioblastoma [70], leyomyoma [71], kolorektal karsinom [72] ve nazofaringeal karsinoma hücrelerinde [53] önemli antiproliferatif etkiler göstermiştir ayrıca tümörleri cisplatin ve temozolomidin sitotoksik etkisine veya bir

anti-EGFR antikoru olan monoklonal antikor mAb 806 'ya karşı hassaslaştırdığı gösterilmiştir [73-75].

Son yıllarda hem klinik gözlemler hem de deneysel çalışmalar, östrojenlerin ve östrojen reseptörlerinin meme tümörlerinin gelişiminde ve ilerlemesinde kritik rolleri bulunduğunu tespit etmiştir. Meme tümörlerinin yaklaşık % 70'inde ER ve / veya progesteron reseptörü eksprese edildiği için klasik hormonsuz bir tümördür [76]. Östrojenlerin etki mekanizması, ER 'lerin varlığı veya olmaması ve yalnızca çekirdekte değil aynı zamanda sitoplazmada ve hücre zarında lokalizasyonu ile tanımlanmaktadır [77]. Hormonal tedaviler ER pozitif meme kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır; Bununla birlikte, bu endokrin terapilere içsel ve edinilmiş direnç hala ortak bir özelliktir.

Tsonis ve arkadaşları yaptığı çalışmada kanser progresyonunda yer alan biyoaktif ECM makromoleküllerinin ekspresyonunda ER 'lerin ve ER-IGFR-EGFR çapraz-sirasının rolünü incelemiş ve ER 'lerin EGFR ve / veya IGFR ile eşgüdümlü hareketinin çok önemli olduğunu ve endokrin terapiler için yeni, güçlü ajanlar tasarlamak ve geliştirmede potansiyel hedefler sağladığını göstermişlerdir [78].

Lei ve arkadaşları küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri üzerinde yaptıkları araştırmanın sonucunda kemoterapötik ilaçlarla kombinasyon halinde tirozin kinaz inhibitörlerinin, EGFR 'nin kuvvetli ekspresyonunu gösteren küçük hücreli olmayan akciğer kanseri türlerinin tedavisi için uygulanabilir bir terapötik strateji olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu çalışmadaki bulgular ile güçlü EGFR ekspresyonu olan NCI-H596 hücrelerinin Cisplatin, doksorubisin ve etoposid'in büyüme önleyici etkilerine daha dirençli olduğunu, genel bir tirozin kinaz inhibitörü olan Genistein ve AG 1478' in NCI-H596'da EGFR'nin fosforilasyonunu inhibe ettiğini ve NCI-H596 hücrelerinde antiproliferatif etkileri arttırdığı ve programlanmış hücre ölümünü indüklediğini göstermişlerdir [73].

Yapılan bu çalışmada; MDA-MB-231 hücreleri için IC₅₀ dozu olarak belirlenen 50 µM'lık ve MCF-7 hücreleri için IC₅₀ dozu olarak belirlenen 20 µM'lık AG 1478 konsantrasyonu hücrelerin canlılığını 24., 48. ve 72. saatlerde anlamlı olarak düşürmüştür. Bu veriler yukarıda bahsedilen çalışmalar ile örtüşmektedir.

Mikrotübül aktif ilaçlar da dahil olmak üzere, kemoterapötik ajanlar, normal ve kanserli hücreler arasında kötü ayırım yapmaktadır. Kanser hücreleri büyüme faktörlerine daha az bağımlıdır ve / veya büyüme inhibitörlerine dirençlidir, fazlar arası normal hücrelerin seçici olarak durdurulması mümkündür, mikrotübül-aktif ilaçlar, siklik hücrelerde mitotik tutulma oluşturabilme yetenekleri nedeniyle sitotoksiktir ve ara evrede tutulan hücreler mikrotübül-aktif ilaçlara karşı duyarlı olmayabilir [79,80].

Blagosklonny ve arkadaşları normal meme epitel hücresi MCF-10A ve MCF-7 hücre hatları üzerinde yaptıkları araştırmada AG1478 ile ön işlem yapılmasının, MCF-7'de paclitaxel ile indüklenen Bcl-2 / Raf-1 fosforilasyonu etkilemediğini ancak MCF-10A'da bu fosforilasyonu yok ettiğini gözlemlemiştir. Yapılan çalışmada düşük dozda AG1478 uygulaması ile MCF-10A tutuklaması olmuş ve paclitaxelin etkileri ortadan kalkmış, ancak MCF-7 hücrelerinde bu etki görülmemiştir. Bu sonuç büyüme faktörü bağımlılığının sömürüsü, normal hücrelerin mikrotübül-aktif ilaçlardan korunmasına izin verebileceğini göstermektedir [81].

İntegrin ailesinin üyeleri meme tümörözenezinde ve ilerlemesinde rol oynayan önemli sinyalleme bileşenleridir çünkü integrinler hücre göçü, hücre proliferasyonu ve hücre sağ kalımı üzerinde önemli roller oynamaktadır. Bazı çalışmalar, $\beta 1$ 'in bloke edilmesinin hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve hücre apoptozunu indüklediğini bildirmiştir [82,83]. Daha önce yapılan araştırmalar MDA-MB-231 hücrelerindeki $\alpha 6\beta 4$ integrinin EGFR kümelemesine neden olduğunu göstermiştir [84].

Hou ve arkadaşları yaptıkları çalışmada MDA-MB-231 hücrelerinde, $\beta 1$ geninin susturulması yoluyla çalışma yapmışlar ve $\beta 1$ 'in sadece hücre göçü ve sağkalım için önemli olmadığını, hücre çoğalmasını hücre yoğunluğuna bağlı olarak düzenlediğini göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışma ile AG1478 'in hücre proliferasyonu üzerindeki inhibe edici etkilerinin $\beta 1$ nakavt hücrelerde, doğal fenotip hücrelere göre daha etkili olduğunu ve anti-EGFR tedavisinin anti-integrin ilaçlarla birleştirilmesinin kanser tedavisi için önemli olduğunu göstermişlerdir [85].

Sonuç olarak bu tez çalışmasında; Triple negatif meme kanseri modeli olarak MDA-MB-231 ve Luminal A meme kanseri modeli olarak kullanılan MCF-7 hücre hatları

üzerine EGFR inhibitörü AG 1478 'in etkisi hücre canlılığı, hücre indeksi, mitotik indeks gibi hücre kinetiği parametreleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda elde edilen veriler hücre canlılığı, hücre indeksi, mitotik indeks değerlerinde zamana bağlı olarak anlamlı bir düşüşün olduğunu göstermektedir.

Elde edilen bu veriler ile meme kanseri ve diğer kanser türlerinde EGFR ye yönelik tedavilerin kanser tedavisinde olumlu sonuçlar doğuracağı düşünülmektedir. Bulgular Triple negatif meme kanseri gibi tedavisi zor, HER2-negatif kanser tiplerinde HER1 hedeflenerek tedavi stratejilerinin geliştirilebileceğini göstermektedir. Ayrıca tedaviye dirençli kanserlerin de tedavisinde yararlı olacağı düşünülmektedir. Gelecekte yapılacak *in vitro* çalışmalar ve hayvan deneyleri ile AG 1478 gibi EGFR inhibitörlerinin veya EGFR monoklonal antikorlarının tek başına ve kombin olarak kullanımlarının etki mekanizmalarının, daha iyi araştırılması ve desteklenmesiyle EGFR ye yönelik tedavi yöntemlerinin, klinik kullanımlarda başarılı sonuçlar vereceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Demirelli, F. H., 2005, Hedefe yönelik kanser tedavisi ve monoklonal antikorlar. *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği (ANKEM) Dergisi*, 19, 123-125.
- [2]. Ciardiello, F., Tortora, G., 2008, EGFR antagonists in cancer treatment, *New England Journal of Medicine* 358(11), 1160-1174.
- [3]. Massarotti, C., Scaruffi, P., Lambertini, M., Remorgida, V., Del Mastro, L., Anserini, P., 2017, State of the art on oocyte cryopreservation in female cancer patients: a critical review of the literature, *Cancer Treatment Reviews Cancer Treatment Reviews*.
- [4]. Russo, J., Russo, I.H., 2004, Development of the human breast, *Maturitas*, 49 (1), 2-15.
- [5]. Pandya, S., Moore, R. G., 2011, Breast development and anatomy. *Clinical obstetrics and gynecology*, 54(1), 91-95.
- [6]. Mahr, D. M., Bhargava, R., Insana, M. F., 2012, Three-dimensional in silico breast phantoms for multimodal image simulations. *IEEE transactions on medical imaging*, 31(3), 689-697.
- [7]. Javed, A., Lteif, A., 2013, Development of the human breast. In *Seminars in plastic surgery*, 27(01), 005-012 Thieme Medical Publishers.
- [8]. Hassiotou F., Geddes D., 2013, Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat* 26: 29-48.
- [9]. Johnson M. D., 2012, Reproductive Systems In: Johnson MD (Ed.), *Human Biology Concepts and Current Issues (6th edition)*, Pearson, USA p: 376-403.
- [10]. Bahreyni A, Samani S. S, Rahmani F, Behnam-Rassouli R, Khazaei M, Ryzhikov M, Parizadeh M. R, Avan A, Hassanian S. M., 2017, Role of adenosine signaling in the pathogenesis of breast cancer. *Journal of Cellular Physiology*.
- [11]. Moradi M, Bahrami A, ShahidSales S, Joodi M, Hassanian SM, Anvari K, Avan A. 2017, The Prognostic Value of MGMT Promoter Methylation in Glioblastoma: A Meta-analysis of Clinical Trials. *Journal of Cellular Physiology*.
- [12]. Tajbakhsh A, Mokhtari-Zaer A, Rezaee M, Afzaljavan F, Rivandi M, Hassanian SM, Ferns GA, Pasdar A, Avan A. 2017b. Therapeutic Potentials of BDNF/TrkB in Breast Cancer; Current Status and Perspectives. *Journal of Cellular Biochemistry*

- [13]. Topçul, M., ve Çetin, İ., 2015, Breast Cancer, Cancer: Disease of the Age, In: (Ed.) Ahmed M El-Sharkawy, Chapter 19, *OMICS Group eBooks*, Foster City, USA. 1-21.
- [14]. Board, P. C. G. E., 2016, Genetics of Breast and Gynecologic Cancers (PDQ®).
- [15]. Schulz W.A., 2005, Breast Cancer. In: Schulz WA (Ed.). *Molecular Biology of Human Cancers*. Springer, Germany p: 357-382. 10.
- [16]. Weber G. F., 2007, Epithelial Tumors. In: Weber GF (Ed.). *Molecular Mechanisms of Cancer*. Springer, USA p: 441-524.
- [17]. Nik-Zainal, S., Morganella, S., 2017, Mutational Signatures in Breast Cancer: The Problem at the DNA Level, *Clin Cancer Res*, 23:2617-2629.
- [18]. Tryggvadottir, L., Olafsdottir, E. J., Gudlaugsdottir, S., Thorlacius, S., Jonasson, J. G., Tulinius, H., Eyfjord, J. E., 2003, BRCA2 mutation carriers, reproductive factors and breast cancer risk. *Breast Cancer Research*, 5(5), R121.
- [19]. Narod S. A., 2002, Modifiers of risk of hereditary breast and ovarian cancer, *Nat Rev Cancer*, 2:113-123.
- [20]. Vidarsson, H., Mikaelsson, E. K., Rafnar, T., Bertwistle, D., Ashworth, A., Eyfjord, J. E., Valgeirsdottir, S., 2002, BRCA1 and BRCA2 bind Stat5a and suppress its transcriptional activity. *FEBS letters*, 532(1-2), 247-252.
- [21]. Afsane Bahrami, A., Hassanian, S. M., Khazaei, M., Hasanzadeh, M., Shahidsales, S., Maftouh, M., Ferns, A.G., Avan, A., The therapeutic potential of targeting tumor microenvironment in breast cancer: rational strategies and recent progress, 2017, *Journal of Cellular Biochemistry*, doi:10.1002/jcb.26183
- [22]. Vannucci, L., 2015. Stroma as an active player in the development of the tumor microenvironment. *Cancer microenvironment*, 8(3), 159-166.
- [23]. Romero-López, M., Trinh, A. L., Sobrino, A., Hatch, M. M., Keating, M.T., Fimbres, C., Lewis, D. E., Gershon, P. D., Botvinick, E. L., Digman, M., 2017, Recapitulating the human tumor microenvironment: Colon tumor-derived extracellular matrix promotes angiogenesis and tumor cell growth, *Biomaterials* 116:118-129.
- [24]. Mao, Y., Keller, E. T., Garfield, D. H., Shen, K., & Wang, J. (2013). Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 32(1-2), 303-315.
- [25]. Holliday, D. L., Speirs, V., 2011, Choosing the right cell line for breast cancer research, *Breast Cancer Research*, 13(4), 215.
- [26]. Yanagawa, M., Ikemoto, K., Kawauchi, S., Furuya, T., Yamamoto, S., Oka, M., Sasaki, K., 2012, Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype. *BMC Research Notes*, 5(1), 376.

- [27]. Voduc, K. D., Cheang, M. C., Tyldesley, S., Gelmon, K., Nielsen, T. O., Kennecke, H., 2010, Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse, *J Clin Oncol.* 28(10):1684-91.
- [28]. Metzger-Filho, O., Sun, Z., Viale, G., ve ark., 2013, Patterns of recurrence and outcome according to breast cancer subtypes in lymph node-negative disease: results from international breast cancer study group trials VIII and IX. *J Clin Oncol.* 31(25):3083-90.
- [29]. Levenson, A. S., Jordan, V. C., 1997, MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line, *Cancer research*, 57(15), 3071-3078.
- [30]. Koboldt, D. C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., ve ark., 2012 for the Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418):61-70
- [31]. Yao, H., He, G., Yan, S., Chen, C., Song, L., Rosol, T. J., Deng, X., 2017, Triple-negative breast cancer: is there a treatment on the horizon?, *Oncotarget*, 8(1), 1913.
- [32]. Fan, C., Oh, D. S., ve ark., Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med.* 355(6):560-9, 2006.
- [33]. Howlader N, Altekruse, S. F., Li, C. I., ve ark. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *J Natl Cancer Inst.* 106(5), 2014.
- [34]. Foukakis, T., Bergh, J., Hayes, D. F., Vora, S. R., 2013, Prognostic and predictive factors in early, non-metastatic breast cancer. *Dizon Ed UpToDate.*
- [35]. Carey L. A., Cheang M. C. U., Perou, C. M., 2014, Chapter 29: Genomics, Prognosis, and Therapeutic Interventions, in Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Diseases of the Breast*, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins,
- [36]. Yarden, A., 1988, Ullrich, Growth factor receptor tyrosine kinases, *Annu. Rev. Biochem.* 57, 443-478.
- [37]. Normanno, N., De Luca, A., ve ark., 2006, Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 366 (1), 2-16.
- [38]. Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., Hynes, N.E., 2000, The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer, *The EMBO journal* 19(13), 3159-3167.
- [39]. Mehrabi, M., Mansouri, K., Solymani, B., ve ark., 2017, Development of a human epidermal growth factor derivative with EGFR-blocking and depleted biological activities: A comparative in vitro study using EGFR-positive breast cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules.*
- [40]. Cadena, D. L., Gill, G.N., 1992, Receptor tyrosine kinases, *FASEB J.* 6 2332-2337
- [41]. Aronson, S.A., 1991 Growth factors and cancer, *Science* 254, 1146-1152.

- [42]. Pawlowski, V., Revillion, F., Hebbar, M., Hornez, L., Peyrat, J.P., 2000, Prognostic value of the type I growth factor receptors in a large series of human primary breast cancers quantified with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay, *Clin. Cancer Res.* (6) 4217-4225.
- [43]. Gullick, W. J., 1991, Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor, *Br. Med. Bull.* (47) 87-98.
- [44]. Mao, R. D., Tan, Y. M., 1999, Expressions of EGFR and p16 protein in nasopharyngeal cancer, *Pract. J. Cancer (Chinese)* (14) 182-184.
- [45]. Gan, H. K., Walker, F., Burgess, A. W., Rigopoulos, A., Scott, A. M., Johns, T. G. 2007, The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Tyrosine Kinase Inhibitor AG1478 Increases the Formation of Inactive Untethered EGFR Dimers. *Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 2840-2850.
- [46]. Kolibaba K. S. ve Druker B. J., 1997, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1333, F217-F248.
- [47]. Hunter T., 1997, *Cell*, 88, 333-346.
- [48]. Patarca R., 1996, *Crit. Rev. Oncog.*, 7, 343-432
- [49]. Al-Obeidi, F. A., Lam, K. S., 2000, Development of inhibitors for protein tyrosine kinases. *Oncogene*, 19(49), 5690.
- [50]. Johns, T. G., Luwor, R. B., Murone, C., ve ark., 2003, Antitumor efficacy of cytotoxic drugs and the monoclonal antibody 806 is enhanced by the EGF receptor inhibitor AG1478. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15871-15876.
- [51]. Elkind, N. B., Szentpétery, Z., ve ark., 2005, Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). *Cancer research*, 65(5), 1770-1777.
- [52]. Shi, Z., Parmar, S., Peng, X. X., ve ark., 2009, The epidermal growth factor tyrosine kinase inhibitor AG1478 and erlotinib reverse ABCG2-mediated drug resistance. *Oncology reports*, 21(2), 483.
- [53]. Zhu, X. F., Liu, Z. C., Xie, B. F., ve ark., 2001, EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 inhibits cell proliferation and arrests cell cycle in nasopharyngeal carcinoma cells, *Cancer letters*, 169(1), 27-32.
- [54]. Ma, L., Yan, H., Zhou, Q., 2014, AG1478 inhibits the migration and invasion of cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma cells via the cell cycle regulation by matrix metalloproteinase-9. *Oncology letters*, 8(2), 921-927.
- [55]. Seshacharyulu, P., Ponnusamy, M. P., ve ark., 2012, Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16(1), 15-31

- [56]. Samphao, S., Wheeler, A.J., Rafferty, E., ve ark., 2009, Diagnosis of breast cancer in women age 40 and younger: delays in diagnosis result from underuse of genetic testing and breast imaging, *The American Journal of Surgery*, 198 (4), 538-543.)
- [57]. Pieńkowski, T., Zielinski, C.C., 2010, Trastuzumab treatment in patients with breast cancer and metastatic CNS disease, *Annals of Oncology*, 21 (5), 917-924.
- [58]. Topçul, M.R., Çetin, İ., 2014, Endpoint Of Cancer Treatment: Targeted Therapies, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15 (11), 4395-4403.
- [59]. Hirofumi, S., Moulay, G., Guenzel, A.J., ve ark., 2017, Experimental Cardiac Radiation Exposure Induces Ventricular Diastolic Dysfunction with Preserved Ejection Fraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*
- [60]. Lee, S., Ozkavukcu, S., Heytens, E., Moy, F., Alappat, R. M., Oktay, K., 2011, Anti-Mullerian hormone and antral follicle count as predictors for embryo/oocyte cryopreservation cycle outcomes in breast cancer patients stimulated with letrozole and follicle stimulating hormone. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(7), 651-656.
- [61]. Lee, S., Ozkavukcu, S., Heytens, E., Moy, F., Alappat, R. M., Oktay, K., 2011, Anti-Mullerian hormone and antral follicle count as predictors for embryo/oocyte cryopreservation cycle outcomes in breast cancer patients stimulated with letrozole and follicle stimulating hormone. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(7), 651-656.
- [62]. Topçul, M.R., Çetin, İ., 2015, Effects of metformin on cell kinetic parameters of Mcf-7 breast cancer cells in vitro, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, 2351-2354.
- [63]. Martinez-Serra, J., Gutierrez, A., Muñoz-Capó, S., Navarro-Palou, M., Ros, T., Amat, J.C., Lopez, B., Marcus, T.F., Fueyo, L., Suquia, A.G., Gines, J., Rubio, F., Ramos, R., Besalduch, J., 2014, xCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies, *Onco Targets Ther*, 7, 985-994.
- [64]. Kawai, M., Nakashima, A., Kamada, S., & Kikkawa, U., 2015, Midostaurin preferentially attenuates proliferation of triple-negative breast cancer cell lines through inhibition of Aurora kinase family. *Journal of biomedical science*, 22(1), 48.
- [65]. Sherr C. J., 2000, *Cancer Res.*, 60, 3689 -3695.
- [66]. Sherr C. J. Ve Roberts J. M., 1999, *Genes Dev.*, 13, 1501 – 1512.
- [67]. Bishop, P. C., Myers, T., Robey, ve ark., 2002, Differential sensitivity of cancer cells to inhibitors of the epidermal growth factor receptor family. *Oncogene*, 21(1), 119.

- [68]. Baba, Y., Maeda, T., Suzuki, A., Takada, S., Fujii, M., Kato, Y., 2017, Deguelin Potentiates Apoptotic Activity of an EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor (AG1478) in PIK3CA-Mutated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *International journal of molecular sciences*, 18(2), 262.
- [69]. Zhang, Y. G., Du, Q., Fang, W. G., Jin, M. L., & Tian, X. X., 2008, Tyrphostin AG1478 suppresses proliferation and invasion of human breast cancer cells. *International journal of oncology*, 33(3), 595.
- [70]. Nagane, N., Levitzki, A., Gazit, A., Cavanee, W. K. ve Huang H. J., 1998, Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumour specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase 3-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5724-5729,18.
- [71]. Shushan, A., Rojansky, N., Laufer, N. ve ark., 2004, The AG1478 tyrosine kinase inhibitor is an effective suppressor of leiomyoma cell growth. *Hum Reprod* 19: 1957-1967.
- [72]. Partik, G., Hochegger, K., Schörkhuber, M. ve Marian, B., 1999, Inhibition of epidermal -growth-factor-receptor-dependent signalling by tyrphostins A25 and AG1478 blocks growth and induces apoptosis in colorectal tumour cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 125: 379-388.
- [73]. Lei, W., Mayotte, E. J. ve Levitt, L. M., 1999, Enhancement of chemosensitivity and programmed cell death by tyrosine kinase inhibitors correlates with EGFR expression in non-small cell lung cancer cells. *Anticancer Res* 19: 221-228.
- [74]. He, H. Y., Fang, W. G., Zheng, J. ve ark., 2003, Mechanisms of mitogenactivated protein kinase phosphatase-5 regulation growth and invasion of a human prostate cancer cell line. *Natl Med J China* 83: 1812-1818.
- [75]. Nakamura, H., Takamori, S., Fujii, T., ve ark., 2005, Cooperative cellgrowth inhibition by combination treatment with ZD1839 (Iressa) and trastuzumab (Herceptin) in non-small-cell lung cancer. *Cancer Lett* 230: 33-46.
- [76]. Lim, E., Metzger-Filho, O., Winer, E. P., 2012, The natural history of hormone receptor-positive breast cancer. *Oncology* 26 (688–694), 696.
- [77]. Sui, M., Zhang, H., Fan, W., 2011, The role of estrogen and estrogen receptors in chemoresistance. *Curr Med Chem* 18, 4674–4683.
- [78]. Tsonis, A. I., Afratis, N., Gialeli, C., ve ark., 2013, Evaluation of the coordinated actions of estrogen receptors with epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor in the expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans and cell motility in breast cancer cells. *FEBS Journal*, 280(10), 2248-2259
- [79]. Horwitz, S. B., 1992, Mechanism of action of taxol. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13:134–136.

- [80]. Jordan, M. A. ve Wilson, L., 1998, Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10: 123–130.
- [81]. Blagosklonny, M. V., Bishop, P. C., Robey, R., Fojo, T., Bates, S. E., 2000, Loss of cell cycle control allows selective microtubule-active drug-induced Bcl-2 phosphorylation and cytotoxicity in autonomous cancer cells. *Cancer research*, 60(13), 3425-3428.
- [82]. Park C. C ve ark., 2006, Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Res.* 66, 1526–1535
- [83]. Wang F. ve ark., 2002, Phenotypic reversion or death of cancer cells by altering signaling pathways in three-dimensional contexts. *J Natl Cancer Inst.* 94, 1494–1503.
- [84]. Gilcrease M. Z. ve ark., 2009,. Alpha6 beta4 integrin crosslinking induces EGFR clustering and promotes EGF-mediated Rho activation in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 28, 67.
- [85]. Hou, S., Isaji, T., Hang, Q., Im, S., Fukuda, T., Gu, J., 2016, Distinct effects of β 1 integrin on cell proliferation and cellular signaling in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Scientific reports*, 6.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Nazlıcan İŞLEN
Doğum Yeri	Silivri
Doğum Tarihi	15.01.1991
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	0533 927 33 18
E-Posta Adresi	naz.islen@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Kültür Üniversitesi
Fakülte	Fen-Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Radyobiyojoloji
Mezuniyet Tarihi	2017