

**T.C.  
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**METFORMİN VE TRİPTOLİD UYGULAMASININ MDA-MB-231 HÜCRE  
HATINDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNE ETKİLERİNİN  
GÖSTERİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Amani Abbas ABDULMUNEM**

**1700005175**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**OCAK 2020**

**T.C.**  
**İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**METFORMİN VE TRİPTOLİD UYGULAMASININ MDA-MB-231 HÜCRE  
HATINDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNE ETKİLERİNİN  
GÖSTERİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Amani Abbas ABDULMUNEM**

**1700005175**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ajda Çoker GÜRKAN**

**Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Elif Damla ARISAN**

**Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA**

**OCAK 2020**

# ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, her konuda desteğini esirgemeyen değerli ve çok sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ajda Çoker GÜRKAN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca akademik alanda sahip oldukları bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL, Sayın Prof. Dr. Elif Damla ARISAN ve Sayın Doç. Dr. Pınar OBAKAN'a,

Tez çalışmamın gerçekleşmesi için deneysel süreçte İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarlarının sundukları ve olanaklara, ayrıca deneysel çalışmalarımnda yardımlarını esirgemeyen meslektaşlarım; Berre AKDENİZ, Gizat RAKHMATULA Kadriye KOYUNCU, Elif KANSIZ, Ülkü GÜNGÖR, Orçun OKUMUŞ, Talha YOL, Burak TANER'e

Manevi destekleriyle her daim yanımda olan, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim çok sevgili annem LamyA ABED, çok sevgili babam Abbas ABDULMUNEM ve çok sevgili kardeşlerim Umniyah ve Hamid ABDULMUNEM'e teşekkürlerimi sunarım.

**Ocak, 2019**

**Amani ABDULMUNEM**

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
KISALTMALAR .....	vi
SEMBOL LİSTESİ .....	ix
ŞEKİL LİSTESİ .....	x
TABLO LİSTESİ .....	xii
ÖZET .....	xiii
SUMMARY .....	xiv
BÖLÜM I .....	1
1.1. GİRİŞ .....	1
1.2. Amaç .....	2
BÖLÜM II .....	3
2.1. Kanser .....	3
2.2. Meme kanseri .....	4
2.3. Meme Kanseri Tipleri .....	4
2.4. Meme Kanseri Risk Faktörleri .....	6
2.5. MEME KANSERİNİN GENETİK TEMELLERİ .....	6
<b>2.5.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü .....</b>	<b>7</b>
<b>2.5.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü .....</b>	<b>7</b>
<b>2.5.3. Tümör Büyüme Faktörü-Beta Reseptörü .....</b>	<b>8</b>
<b>2.5.4. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Reseptörü .....</b>	<b>8</b>
<b>2.5.5. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü .....</b>	<b>9</b>
<b>2.5.6. Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü .....</b>	<b>9</b>
2.6. PROLAKTİN VE PROLAKTİN RESEPTÖRÜ .....	10

2.7. BÜYÜME HORMONU (GH) .....	11
2.8. Otokrin GH ve İlaç Direnç Mekanizması .....	12
2.9. Büyüme Hormonu Sinyali .....	14
2.10. MEME KANSERİ TEDAVİSİ .....	16
2.11. Triptolid .....	17
2.12. Metformin .....	19
2.13. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES .....	20
2.14. Apoptotik Hücre Ölümü.....	23
<b>2.14.1. Dışsal Ölüm Reseptör Yolu .....</b>	<b>23</b>
<b>2.14.2. İç Mitokondriyal Apoptoz Yolu .....</b>	<b>24</b>
BÖLÜM III .....	26
3.1. MATERYAL .....	26
<b>3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.2. Hücre Kültürü Donanımları .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.3. Kullanılan Kimyasallar .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.4. Kullanılan Tamponlar .....</b>	<b>26</b>
3.2. YÖNTEMLER.....	27
<b>3.2.1. Hücre Kültürü .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.3. Hücre Sağ kalım Analizi .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.6. Yara İyileşme Yöntemi .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.9. Total Protein İzolasyonu.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.11. Hücre Akış Sitometresinde PI Analizi .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.12. CHOP Biyolojik Aktivitesinin Plazmit Aracılı Floresan Mikroskobu Gösterilmesi .....</b>	<b>32</b>
<b>3.5.13. İstatiksel Analiz .....</b>	<b>33</b>
BÖLÜM IV .....	34
4.1. SONUÇLAR .....	34

<b>4.1.1. MDA-MB-231 Doğal Tip ve Bh+ Hücre Canlılığı Üzerinde Etkisini Doza Bağlı Triptolid Uygulanmasını Gösterilmesi.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.2. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ hatları üzerinde doza bağlı triptolid uygulanmasını hücre ölümü ve Mitokondri Membran Potansiyeli üzerine etkisi .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1.3. MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Hücre canlılığı üzerinde etkisinin doza bağlı triptolid ile metforminin beraber uygulanmasının etkisinin gösterilmesi .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.4. MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Hatları Üzerinde Triptolid ve Metformin'in Doza Bağlı Olarak (0 Mm-5 Mm) DNA Kırıklarını, Mitokondri Membran Potansiyeli, Hücre Canlılığını Gösterilmesi .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.5. MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Hücreleri Üzerinde Triptolid, Metformin ve Kombine'nin Doza Bağlı Olarak DNA Kırıklarını, Mitokondri Membran Potansiyeli, Hücre Canlılığını Gösterilmesi.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1.6. Hücre Sağ kalım Analizi ile Zamana Bağlı MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Hücreler hattı üzerinde Triptolid ve kombine İlacın Hücre Canlılığına Etkisinin Gösterilmesi.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3.1. Kombine İlaç Uygulamasının Koloni Oluşumu Üzerine Etkisinin MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Meme Kanseri Hücrelerinde Gösterilmesi .....</b>	<b>46</b>
<b>4.3.2. Zamana Bağlı Kombine İlaç Uygulamasının MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisinin Asılı Damla Modeli Analizi ile Gösterilmesi .....</b>	<b>48</b>
<b>4.4.2. Zamana Bağlı Kombine Uygulamasının MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisinin Yumuşak Agar koloni oluşumu deneyi ile Gösterilmesi .....</b>	<b>50</b>
<b>4.5.1. Zamana Bağlı Kombine Uygulamasının MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisinin yara iyileşme Modeli Analizi ile Gösterilmesi .....</b>	<b>52</b>

<b>4.6.1. MDA-MB-231 Doğal Tip ve Büyüme Hormonu Meme Kanseri Hücre Hatında Triptolid ve Metforminin Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerinde Etkisinin Zamana Bağlı Gösterilmesi .....</b>	<b>54</b>
<b>4.6.2.CHOP promotor (-649/+136)-pmCherry Plazmit Trasfeksiyon.....</b>	<b>57</b>
<b>4.6.3. MDA-MB-231doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde Metformin ile triptolid uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisinin gösterilmesi. 58</b>	
BÖLÜM V .....	60
1.1TARTIŞMA .....	60
KAYNAKLAR .....	74
EKLER.....	85
ÖZGEÇMİŞ .....	91

# KISALTMALAR

<b>BH</b>	Otokrin Büyüme Hormonu
<b>TPL</b>	Triptolid
<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri.
<b>APS</b>	Amonyum Persülfat
<b>BRCA1</b>	Meme Kanseri 1 Geni
<b>BRCA1</b>	Meme Kanseri 2 Geni
<b>BSA</b>	Sığır Serum Albümin
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DIOC<sub>6</sub></b>	3,3'-diheksiloksakarbosianin iyodür
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfoksit
<b>EDTA</b>	Etilendiamin tetraasetik asit
<b>TNBC</b>	Üçlü Negatif Meme Kanseri
<b>ER</b>	Östrojen Reseptörü
<b>PR</b>	Progesteron Reseptörleri
<b>HER2</b>	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>FBS</b>	Fetal Sığır Serumumu
<b>MTT</b>	Metiltiazol Difeniltetrazolyum Bromür
<b>NFκB</b>	Nükleer Faktör Kappa B
<b>PARP</b>	Poli ADP riboz polimeraz
<b>PBS</b>	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
<b>PI</b>	Propidyum İyodür
<b>PVF</b>	Poliviniliden Florit
<b>SDS</b>	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SDS-PAGE</b>	SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>TBE</b>	Tris Borik Asit
<b>TBS</b>	Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi
<b>TEMED</b>	Tetrametiletildiamin
<b>Tyr</b>	Tirozin
<b>BLBC</b>	Normal- Benzeri Meme Kanseri
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü



<b>CHOP</b>	CCAAT/yükseltici-bağlanma-proteini-homolog protein.
<b>ER</b>	Endoplazmik Retikulum.
<b>UPR</b>	Katlanmamış Protein Cevabı
<b>ERK</b>	Ekstraselüler sinyalleri düzenleyen kinaz (p44/42)
<b>ETOH</b>	Etanol
<b>FBS</b>	Fetal Sığır Serumumu
<b>kDa</b>	Killodalton
<b>mg</b>	Miligram
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
<b>p53</b>	Apoptozun-tümör-ilişkili proteini -53
<b>PI</b>	Propidyum İyodür.
<b>rpm</b>	Santrifüjün dakikadaki devir sayısı.
<b>STAT</b>	Transkripsiyonun Sinyal Dönüştürücüsü ve Aktivatörü.
<b>GHBP</b>	Büyüme hormonu bağlayıcı protein
<b>UPR</b>	Katlanmamış protein cevabı.
<b>EGF</b>	Epidermal Büyüme Faktörü
<b>FGF</b>	Fibroblast Büyüme Faktörü
<b>ATPL</b>	Adenozin Trifosfat
<b>MAPK</b>	Mitojenin Aktive Ettiği Protein Kinaz Modülüdür
<b>AMPK</b>	AMP ile Aktive Edilen Protein Kinaz
<b>ALL</b>	Akut Lenfoblastik Lösemi
<b>JAK</b>	Janus kinaz.
<b>Bad</b>	Bcl-2 ilişkili Ölüm Proteini
<b>Bax</b>	Bcl-2 ilişkili X proteini
<b>Bcl-2</b>	B-hücre lenfoma 2
<b>cDNA</b>	Komplementer DNA
<b>CO2</b>	Karbondioksit
<b>DMSO</b>	Dimetil sülfoksit
<b>DNA</b>	D eoksiribonükleik asit
<b>IGF-I</b>	İnsülin benzeri büyüme faktörü
<b>mTOR</b>	Rapamisinin Memeli TOR Proteini
<b>p53</b>	Tümör Protein
<b>PAS</b>	Otofaji Oluşum Merkezi

<b>PUMA</b>	Apotozun p53 Upregüle Modülatörü
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türevler
<b>TBS</b>	Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi
<b>MED</b>	Tetrametletilendiamin
<b>Tripsin-EDTA</b>	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
<b>Bim</b>	Bcl-2 ile Etkileşime Gien Hücre Ölümü Aracısı
<b>BiP</b>	İmmunoglobulin Ağır Zincir Bağlanma Proteini
<b>E. coli</b>	Escherichia coli ( <i>Koli basili</i> )
<b>FADD</b>	Fas İlişkili Ölüm Domaini
<b>HIV</b>	İnsan İmmun Yetmezliği Virüsü
<b>IR</b>	İnsülin Reseptörü
<b>Mdm2</b>	Fare Çift Dakika 2 Enzimi
<b>PERK</b>	Protein Kinaz RNA-benzeri ER Kinaz
<b>ATF6</b>	Aktive Transkripsiyon Faktörü
<b>GFR</b>	Büyüme Faktörü Reseptör
<b>EGFR</b>	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>IGFR</b>	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>IGF</b>	İnsülin Benzeri Büyüme Aktörü
<b>GHBP</b>	Büyüme Hormonu Bağlayıcı Protein
<b>PDGFR</b>	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>FGFR</b>	Froblast Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>EMT</b>	Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm
<b>AKT</b>	Protein Kinaz B
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3'-kinaz
<b>GPCR</b>	G-proteinine Bağlı Östrojen Reseptörü

## SEMBOL LİSTESİ

<b>%</b>	Yüzde
<b>°C</b>	Santigrat derece
<b>Mg</b>	Mikrogram
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>µM</b>	Mikromolar
<b>bç</b>	Baz çifti
<b>cc</b>	Santimetre küp
<b>cm</b>	Santimetre
<b>cm<sup>2</sup></b>	Santimetre kare
<b>IC<sub>50</sub></b>	Yarım maksimum inhibitör konsantrasyonu
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>mA</b>	Mili amper
<b>ml</b>	Mililitre
<b>mm</b>	Milimetre
<b>nm</b>	Nanometre
<b>V</b>	Volt

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Dünya çapında kanser türlerini kadın ve erkeklerde görülme sıklığına göre istatistiksel veri [13].....	3
Şekil 2. Büyüme hormonu amino asit dizisi [46].....	11
Şekil 3. İnsan büyüme hormonu üç boyutlu yapısı.....	11
Şekil 4. Büyüme hormonu sinyal yolağı.....	14
Şekil 5. Triptolidin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 6. Metformin kimyasal yapısı.....	19
Şekil 7. Metforminin anti-proliferatif etkisinin normoglisemik koşullar altında önerilen mekanizmasını temsil eden şematik [4].....	20
Şekil 8. Yanlış katlanmış protein cevabın moleküler mekanizmaları [87].....	21
Şekil 9. Apoptotik hücre ölümü yolağı [105]. ....	25
Şekil 10. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücreleri hatlarında doza bağlı triptolidin hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi.....	34
Şekil 11. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ hücre hattı üzerinde doza bağlı triptolid uygulanmasını (0- 50nM) hücre ölümünü ve Mitokondri Membran Potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyaması ile gösterilmesi.....	36
Şekil 12. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücreleri hattında triptolidin hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi.....	38
Şekil 13. MDA-MB-231 doğal tip hücre hattı üzerinde triptolid ile metforminin uygulanmasını hücre ölümünü ve Mitokondri Membran Potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyamalar ile gösterilmesi.....	40
Şekil 14. MDA-MB-231 BH+ hücre hattı üzerinde triptolid ile metforminin uygulanmasını hücre ölümünü ve Mitokondri Membran Potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyamalar ile gösterilmesi.....	41
Şekil 15. MDA-MB-231Doğal tip BH+ hücre hattı üzerinde triptolid ile metforminin uygulanmasını hücre ölümünü ve Mitokondri Membran Potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyamalar ile göste.....	43
Şekil 16. Hücre Sağ kalım Analizi ile Zamana Bağlı MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Hücre hatları üzerinde Triptolid ve kombinenin Hücre Canlılığına Etkisinin Gösterilmesi.....	45
Şekil 17. Kombine Uygulamasının Koloni Oluşumu Üzerine Etkisinin MDA-MB-231 Doğal Tip ve Büyüme hormonu meme kanseri hücreleri.....	47

<b>Şekil 18. Zamana Bağlı Kombine Uygulamasının MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisinin Asılı Damla Modeli Analizi ile Gösterilmesi. ....</b>	<b>49</b>
<b>Şekil 19. Zamana Bağlı Kombine Uygulanmasının MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisinin A Yumuşak Agar Koloni Oluşumu Deneyi ile Gösterilmesi.....</b>	<b>51</b>
<b>Şekil 20. Zamana Bağlı Kombine Uygulamasının MDA-MB-231 Doğal Tip ve Büyüme Hormonu Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisinin yara iyileşme Modeli Analizi ile Gösterilmesi. ....</b>	<b>53</b>
<b>Şekil 21 MDA-MB-231 doğal tip ve büyüme hormomnu meme kanseri hücre hattında triptolid ve metforminin endoplazmik retikulum stresi üzerinde etkisinin zamana bağlı gösterilmesi.....</b>	<b>55</b>
<b>Şekil 22. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında triptolid ve metforminin apoptotik proteinlerin anlatımı üzerine etkisinin gösterilmesi. ....</b>	<b>56</b>
<b>Şekil 23. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında triptolid ve metforminin Jak-STAT yolların gösterilmesi. ....</b>	<b>57</b>
<b>Şekil 24. MDA-MB-231Doğal tip meme kanseri hücrelerinde CHOP aktivasyonu floresan gösterilmesi.....</b>	<b>58</b>
<b>Şekil 25. MDA-MB-231doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde Metformin ile triptolid uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisinin gösterilmesi. ....</b>	<b>59</b>
<b>Şekil 26. Triptolid ve metforminin kombin uygulanmasının MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde invazyon ve metastatik profil, ilaç direnci, hücre proliferasyonu, apoptoz etksi. ....</b>	<b>72</b>

# TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Meme kanseri Tipleri.....	5
Tablo 2. Meme kanseri faktörlerin oranları .....	6
Tablo 3. Meme kanseri tedavi yönetmeleri.....	16
Tablo 4. Alt ve üst jel içerikleri .....	85
Tablo 5. Kullanılan cihazların listesi .....	85
Tablo 6. Hücre kültürü donanımları.....	86
Tablo 7. Kullanılan kimyasalların listesi .....	87
Tablo 8. %12'lik SDS-PAGE Jel içeriği.....	90



## ÖZET

Meme kanseri, kadınlarda kanser kaynaklı ölümler arasında ikinci en sık görülen kanser tipidir. Pek çok büyüme faktörü (VEGF, HER2/neu, PDGF) ve hormonun (PRL, BH) meme kanseri gelişiminde önemi gösterilmiştir. Son dönemde postnatal büyüme üzerinde etkisi bilinen BH'nun ve reseptörünün (BHR) anlatımının meme kanseri biyopsi örneklerinde normal meme epitel hücrelerine kıyasla yüksek olduğu gösterilmiştir. Otokrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri *in vivo* ve *in vitro* hücre modellerinde hücre proliferasyonu, invazyon-metastazı indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca otokrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde tamoxifen, doxorubisin, curcumin gibi ilaçlara direnç mekanizmasına yol açtığı ifade edilmiştir. Triptolid, *Tripterygium wilfordii* bitkisinden izole edilen anti-karsinojenik etkisi meme, kolon, pankreas ve akciğer kanserlerinde gösterilen ilaçtır. Metformin, *Galega officinalis* bitkisinden izole edilen anti-proliferatif etkisi meme, melanom, kolon, pankreatik ve lösemi kanser tiplerinde gösterilen bitkisel bileşendir. Bu tez ile amacımız metformin ve triptolid beraber etkisinin otokrin BH anlatımı arttırılmış MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde endoplazmik retikulum stresine bağlı apoptotik etkisinin gösterilmesidir. Doza bağlı triptolid uygulamasının otokrin BH sinyali arttırılmış MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde doğal tip hücrelere kıyasla direnç gösterdiği ancak metformin ile beraber triptolid uygulamasının hücre canlılığına sadece triptolid uygulamasına kıyasla daha etkin ket vurduğu belirlenmiştir. Ayrıca metformin ve triptolid beraber uygulamasının sadece triptolid uygulamasına kıyasla hücre proliferasyonu, koloni oluşumunu, yara kapanmasını engellediği gösterilmiştir. Ayrıca triptolid uygulamasının BiP, PERK ve PDI gibi ER stres anahtar moleküllerin anlatımını indüklediği hem doğal tip hem de BH+ MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde gösterilmiştir. Ayrıca metformin ve triptolid ikili ilaç uygulamasının G1 fazında hücrelere ket vurduğu MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmiştir. Sonuç olarak triptolid ve metformin beraber uygulamasının otokrin BH anlatımına bağlı ilaç direnç mekanizmasını kırarak MDA-MB-231 gibi agresif hücre hatlarında da hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Triptolid, Metformin, ER stresi, Meme kanseri, Büyüme Hormonu.

## SUMMARY

Breast cancer is the second common cancer deaths-related type in women. Several growth factors (VEGF, HER2 / neu, PDGF) and hormone (PRL, GH) are important in the development of breast cancer. Recently, expression of GH and its receptor (GHR), known to have an impact on postnatal growth, and it's higher in breast cancer biopsy samples compared to normal breast epithelial cells. Expression of autocrine GH has been shown to induce cell proliferation, invasion-metastasis *in vivo* and *in vitro* cell models of breast cancer. In addition, the expression of autocrine GH causes resistance to drugs such as tamoxifen, doxorubicin, curcumin in breast cancer cells. Triptolide is an anti-carcinogenic drug isolated from the *Tripterygium wilfordii* plant, has great potential against Breast, colon, pancreas and lung cancer. Metformin is a *Galega officinalis* plant component isolated from plant whose anti-proliferative effects in breast, melanoma, colon, pancreatic and leukemia cancer types. In this thesis, our aim is show the effect of metformin and triptolide on apoptotic effect via endoplasmic reticulum stress in MDA-MB-231 breast cancer cells with increased autocrine GH expression. Dose-induced, MDA-MB-231 GH breast cancer was shown resistant to triptolide comperd to the wild type cells. But triptolide with metformin can inhibited cell viability more effectively than triptolide alone. In addition, wild-type and GH + MDA-MB-231 breast cancer cells the triptolide induces expression of ER stress key molecules such as BiP, PERK and PDI. In MDA-MB-231 GH+ breast cancer cells triptolid and metformin as a co-treatment inhibits cells in the G1 phase. In conclusion, it has been shown that triptolide and metformin co-administration triggers cell death in aggressive cell lines such as autocrine MDA-MB-231 and breaking the drug resistance.

**Key words:** Triptolide, Metformin, ER stres, Breast cancer, Growth Hormone.



# BÖLÜM I

## 1.1. GİRİŞ

Kanser, vücuttaki farklı hücrelerin herhangi birinin anormal ve kontrolsüz bir şekilde çoğalmasından kaynaklı bir hastalıktır. Kanser patolojisinde en önemli husus, iyi huylu ve kötü huylu tümörler arasındaki farktır [1]. İyi huylu (benign) türleri konulmandaki mikro çevreye yayılma özeliği yoktur. Ancak kötü huylu tümörler, hem uzak dokuyu invazyon hem de dolaşım ya da lenfatik sistemler yoluyla vücutta yayılma yeteneğine (metastaz) sahip olmaktadır [2].

Meme kanseri, kanser kaynaklı ölümler arasında kadınlar arasında ikinci sırada görülen kanserdir. Meme kanseri risk faktörleri, değiştirilemez ve değiştirilebilen faktörlere ayrılmaktadır. İleri yaş, kadın cinsiyeti, 45 yaşından sonra menopoz, genetik mutasyonlar ve aile öyküsü, meme kanseri ile ilişkili olarak değiştirilemeyen başlıca risk faktörleridir. Kontrol edilebilecek meme kanseri risk faktörleri arasında hormon replasman tedavisi, oral kontraseptifler, gebelik, emzirme ve yüksek meme yoğunluğu bulunmaktadır. Meme kanseri gelişimi ile ilişkili davranışsal ve yaşam tarzı risk faktörleri arasında kötü beslenme, yani yüksek yağ, düşük sebze ve meyve, düşük lif ve basit karbonhidratlar; aşırı kilo ve obezite ve fiziksel aktivitenin azaltılması sayılabilmektedir [3].

Meme kanseri genellikle östrojen reseptörü (ER), (PR) veya HER2 ifade düzeyine göre sınıflandırılmaktadır. Anti-östrojen tedavileri, progesteron aromataz inhibitörleri, Herceptin her sıklıkta meme kanseri tedavisinde kullanılır [4]. Ancak tedavilerin başarısızı tekrarlanma riski nedeniyle geliştirmeye ihtiyaç duyulur.

Proliferasyon ve apoptoz arasındaki denge, kemoterapi, radyoterapi ve daha yakın zamanda hormonal tedavilere cevap olarak tümörün genel büyümesini veya gerilemesini belirlemede çok önemlidir [5].

Meme kanseri gelişiminde birçok büyüme faktörü ve hormonu etkisi olduğu bilinmektedir. Büyüme faktörleri arasında (VEGF) ve hormonlardan (östrojen) meme kanserinin gelişimini tetiklediğini *in vitro* ve *in vivo* gösterilmiştir. Meme kanseri hastaların serumunda Büyüme Hormonu (GH) ile birlikte reseptörü GHR anlatımında artış gösterilmiştir [6]. Laboratuvarımdaki otokrin GH anlatımının MCF7, SKBR3 ve

T47D hücrelerinin *in vitro* ve *in vivo*'da daha önceki çalışmalara göre otokrin BH tümör büyümesini, hücre proliferasyonu, metastazı ve ilaçlara karşı direnç gösterdiğini görülmüştür [7]. Ayrıca BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücreleri (MCF10) invazyon ve metastazın indüklendiği ispat edilmiştir [8].

Triptolid (TPL), yeni antikanser etkileri olan doğal bir ilaçtır. Klinik öncesi çalışmalar, TPL'nin hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini, apoptozu indüklediğini, tümör metastazını inhibe ettiğini kanser türlerinde göstermiştir [9].

Metformin, reçete edilen oral hipoglisemik yaygın ajanlardan biridir. Hipoglisemik etkilerinden bağımsız olduğu düşünülen potansiyel antitümörjenik etkilerinden dolayı, yakın geçmişte araştırmaların ilgisini çekmiştir. Metforminin *in vitro* ve *in vivo* kanser büyümesini baskılayabilmesi için çeşitli potansiyel mekanizmaları tetiklediğini bilinmektedir. Metforminin, moleküler mekanizması LKB1 / AMPK yolunun inhibe edilmesi ile hücre döngüsü durmasının ve / veya apoptozun kolon [10], meme kanser hücrelerinde göstermiştir [4].

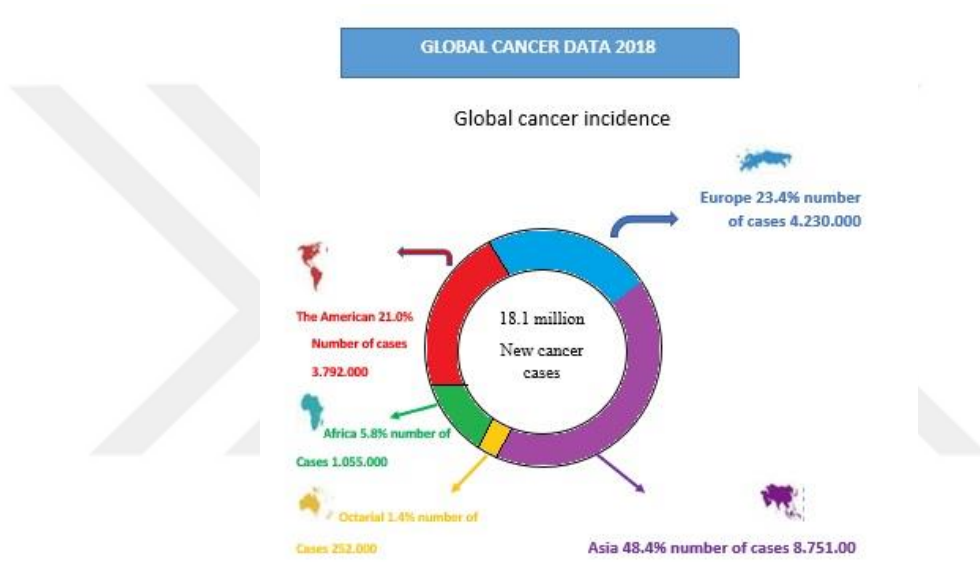
## 1.2. AMAÇ

Bu tezde, otokrin GH anlatımı kazandırılmış MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde triptolid uygulamasına karşı doğal hücrelere kıyasla ilaç direncinin metformin ile beraber GH bağlı invaziv-metastatik, koloni oluşumu üzerine ket vurucu etkisinin gösterilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca triptolid ile beraber metformin uygulamasının doğal tip ve GH+ MDA-MB-231 TNBC hücrelerinde apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin endoplazmik retikulum stresi üzerinden etkisinin modellenmesi amaçlanmıştır.

## BÖLÜM II

### 2.1. KANSER

Kanser, kontrolsüz bir şekilde bölünen ve anormal hücrelerin topluğu olacak ifade edilmiştir [11]. Yaklaşık 9 milyon yeni kanser vakasının teşhis edildiği ve dünyada her yıl 4,5 milyondan fazla insanın kanser kaynaklı öleceği tahmin edilmektedir. Dünya genelinde meme kanseri oranı tüm kanser vakalarının %10,4'ünü oluşturmaktadır [12] (Şekil 1).



Şekil 1. Dünya çapında kanser türlerini kadın ve erkeklerde görülme sıklığına göre istatistiksel veri [13]

Bazı kanserler hızlı büyür ve yayılırken bazıları yavaş büyümektedir. Bu nedenle Kanser türleri tedavilere de farklı şekilde yanıt vermektedir. Bazı kanser türleri için en iyi tedavi cerrahi iken bazıları için kemoterapi daha iyi yanıt verebilmektedir. Genellikle en iyi sonuçları alabilmek için 2 veya daha fazla tedavi kullanılmaktadır. İlk olarak bir doku veya organda gelişen kansere birincil kanser denmektedir [11]. Bir tümörü çevreleyen dokuya daha derin invazyon yapabilir ve kendi kan damarlarını geliştirebilir. Bu süreçte kanserli hücreler büyür ve yeni bölgeye yayılması bir şekilde uzak dokulara hareket ederek metastaz ederler [14].

## **2.2. MEME KANSERİ**

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanseridir. 2018 yılında kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %15'ine kadar 627,000 kadın meme kanserinden ölümler [15]. Meme kanseri tipi, etkilenen spesifik hücreler tarafından belirlenmektedir. Hücre orijinine bağlı olarak, meme kanserleri, karsinoma ve sarkoma olmak üzere ikiye ayrılabilir [16]. Karsinomalar, memenin epitelyal hücre grubunda köken olan meme kanserleridir. Bunlar lobulleri çevreleyen hücreler olup, süt salgısından sorumlu terminal kanallarından oluşmaktadır. Sarkomalar, memenin stromal bileşenlerinden kaynaklanan, miyofibroblastlar ve kan damarı hücrelerini içeren çok ender görülen bir meme kanseri türü olmaktadır. Gen ifadesi araştırmaları, kanser hücrelerinde tedavi edici hedeflerin yanı sıra teşhiste farklılık gösteren çeşitli belirgin meme kanseri alt tiplerini de tanımlamıştır [17].

## **2.3. MEME KANSERİ TİPLERİ**

Yeni nesil düzeltme teknikleri ile Luminal A Meme Kanseri, HER2 ile Zenginleştirilmiş Meme Kanseri, Luminal B meme kanseri, Üçlü Negatif / Bazal Benzeri Meme Kanseri ve Normal-Benzeri meme kanseri alt tipleri farklılaştıran içsel faktörler daha iyi tanınmaktadır. Örneğin, östrojen reseptörü ifadesi (lümen kümesi), insan epidermal büyüme faktörü ekspresyonu ile ilgili birkaç gen hedefi terapötik açıdan bu alt tiplerde daha iyi tedavi sağlanmaktadır [17- 18] (Tablo1).

**Tablo 1. Meme kanseri Tipleri**

<b>Meme Kanseri Tipleri</b>	<b>Tanım</b>
Luminal A Meme Kanseri	Tüm meme kanserinin %30-40'ı oluşturan bir alt tipidir. Bu alt tip ER ve/veya PR+, HER2- ve düşük Ki-67 sahip bir meme kanseri türüdür.
HER2 ile Zenginleştirilmiş Meme Kanseri	Tüm meme kanserlerinin %15- %25'ini oluşturan bir alt tipidir.
Luminal B Meme Kanseri	Tüm meme kanserlerinin <%20'sini oluşturan bir alt tipidir. Bu alt tip ER ve/veya PR+, HER2+ ve düşük Ki-67 sahip bir meme kanseri türüdür.
Üçlü Negatif / Bazal Benzeri Meme Kanseri	Tüm meme kanserinin yaklaşık %20'sini oluşturan bir alt tipidir. Bu alt tip ER-, PR-negatif ve HER2- olarak tanımlanmaktadır.

## 2.4. MEME KANSERİ RİSK FAKTÖRLERİ

Meme kanseri en önemli risk faktörlerinden biri cinsiyettir. Meme kanseri, kadınlarda erkeklere göre yaklaşık 100 kat daha fazla görülmektedir. Meme kanseri için risklerinden biri de ailesel öyküsüdür [3].

**Tablo 2. Meme kanseri faktörlerin oranları [19]**

Risk Faktörü	Görülme Sıklığı (%)
Yaş	4,6
Meme kanseri öyküsü	27,1
Yağlı diyet	32,7
30 yaşından sonra ilk çocuk	51
55 yaşından sonra menstruasyon	16,7
12 yıl öncesine mensup	12,8
Oral kontraseptif oranı	39,6
Alkol alımı	15
Meme kanserinin önceki tedavisi	27,1
Yarış	11,9
Şişmanlık	16,4

## 2.5. MEME KANSERİNİN GENETİK TEMELLERİ

Ailesel meme kanseri genetik kaynaklı temeli olarak sayılmaktadır. Meme kanseri, genlerde mutasyonların varlığı veya gen farklı ifadeleri ile ilişkilidir. Bunların arasında hücre bölünmesi ve ölümü, kansere neden olduğu bilinen birkaç gen önem arz etmektedir [20]. Son yıllarda meme kanserinden dolayı ölüm oranı sabit bir artış göstermektedir. 1994 ve 1995 yılında meme ve yumurtalık kanseri ile BRCA1 ve BRCA2 genleri arasındaki ilişkinin ortaya çıkmıştır. BRCA1 ve BRCA2 genleri, tümör baskılayıcı olarak bilinmektedir [21]. BRCA1'deki mutasyonlara bağlı tümörler bazal benzeri fenotip olma eğilimindedir, histolojik dereceleri yüksektir ve genellikle üçlü olarak adlandırılan ER, PR veya HER2 bunun için üçlü negatif meme tümörü denmektedir [22].

Kanserin heterojen doğası, sürekli klonal genişleme ve mutasyona uğramış hücrelerin kontrolsüz büyümesi, kan ve lenfatik damarların intravasasyonu ve ekstrasvasasyonu, uzak organlara yayılma ve en son metastaz ile karakterizedir. Tümör mikro ortamında hücrelere, anjiyogenez işlemi ile sızdıran vaskülatürlü düzensiz kan damarlarının

oluşması yoluyla besinler verilmektedir. Hücre zarlarında veya sitoplazmada anlatımında (GFR'ler), hücre büyümesi, hayatta kalma, anjiyogenez ve metastaz üzerinde derin rollere sahip olmaktadır. GFR'lerin çoğalması, klasik kemoterapilere ve hedeflenen moleküllere karşı doğal ve kazanılmış direnç oluşturmaktadır. Artan büyüme sinyalleri, programlanmış hücre ölümü apoptozunu inhibe etmek için ölüm sinyalleriyle iletişim içindedirler [23].

### **2.5.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü**

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ailesi, hücre yüzeyinde anlatımı olan ve tirozin kinaz aktiviteleri sergileyen dört proteini kapsamaktadır. EGFR, diğer tüm RTK gibi fonsiyonal yapıdan oluşmaktadır: ligand bağlanma yeri olan hücre dışı bir alan, bir transmembran alanı ve kinaz aktivitesine sahip olan bir hücre içi alan olmaktadır [24]. Ligand bağlanması üzerine, reseptörler homo veya hetero-dimerler oluşturur, aktivasyonu teşvik eder, proliferasyon, hayatta kalma, göç ve farklılaşma için sinyalleri iletir ve böylece kanser ilerlemesinde büyük rol oynamaktadır. EGFR'nin aşırı anlatımı ve veya gen amplifikasyonu, çeşitli dokulara malignite kazandırmaktadır. Ayrıca yapısal olarak EGFR'nin aktif mutantları, sıklıkla kötü prognozlarla ilişkili oldukları çeşitli kanserlerde bulunmaktadır [25].

### **2.5.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü**

IGF-1, tek zincirli bir polipeptit ve dört domainden oluşmaktadır [26]. İnsan gelişiminde IGF-1, IGF bağlayıcı proteinleri (IGFBP'ler) ve IGF-1 reseptörünü (IGF-1R) içeren İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 (IGF-1) sistemi önemli bir rol oynamaktadır [27]. IGF-1'in üzerine yapılan araştırmalara göre meme kanseri dahil olmak üzere kanserin gelişimine neden olmaktadır [28]. Her insan dokusunda IGF-1 ifade edilmektedir. Bununla birlikte hem malign dokusunda hem de normal meme bezinde nadir olarak epital hücreleri tarafından ifade edebilmektedir [29]. IGF-1 Doğumdan sonra IGF-1'in seviyesi yüksek olurken ileri yaşlarda GH seviyesinde düşük olunca buna bir yanıt olarak IGF-1'in seviyesinde sabit bir düşüş görülmektedir [30]. Meme kanserinde ve melanomda IGF1R geninin çoğaldığı ve pediatrik kanserde IGF1R geninin aşırı ekspresyonu olduğu bildirilmektedir [31]. IGF1R, Tümör büyümesini baskılar, invazyonu tetikler ve anjiyogenezi bloke etmektedir. IGF2R

lokusunda mutasyonlar akciğer hücrelerinde gözlenmiş ve çeşitli popülasyonlarda hepatoselüler karsinomda erken bir olay olarak tanımlanmaktadır [32].

### **2.5.3. Tümör Büyüme Faktörü-Beta Reseptörü**

Büyüme faktörü-beta reseptörü (TGF- $\beta$ R) ailesi, çeşitli hücre tiplerinde eksprese edilen ve TGF-1 ligand bağlanması üzerine iletilen sinyallerle farklı hücresel görevleri düzenleyen üç membran reseptörü (TRI, TRII ve TRIII) içermektedir [31]. 2014' yılında araştırmalara göre TGF- $\beta$ , NF- $\kappa$ B/MMP2 yolunu aktif ederek metastazı indükleyebildiğini görülmüştür [34].

### **2.5.4. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Reseptörü**

Kemik oluşumu, hematopoez ve yara ileşilmesi gibi normal fizyolojik fonksiyonlarında önemli bir rol oynamaktadır. VEGF, endotelial hücrelerde ve birkaç ek hücre tipinde eksprese edilen üç membran reseptöründen (VEGFR1-3) oluşmaktadır. VEGFR'ler, ekstra sitoplazmada yedi immüoglobulin (Ig) benzeri domain ve hücre intra sitoplazmik kısımları iki tirozin kinaz bağlanma bölgesi içeren bir proteindir [35]. VEGFR-1 ve -2'nin homodimerlerini veya heterodimerlerini oluşturmak ve VEGFR-1 ve -2'nin homodimerlerini oluşturmak üzere VEGF izoformunun (VEGFA-D) ligandları ve plasenta büyüme faktörlerini (PlGF1 ve 2) disülide bağlı homodimerine bağlanmaktadır. VEGFR tarafından iletilen sinyaller bu reseptörler arasında farklı olmaktadır örneğin, VEGFR2 (ayrıca KDR /-k-1 olarak da bilinir), mitojenle aktive olan protein kinazları (MAPK) bağımlı hücre çoğalmasını indüklerken, VEGFR1 (flt-1) hücre büyümesini indüklememektedir. Ayrıca, VEGFR1'in VEGF ile aktivasyonu, VEGFR2 aktivasyonu ile de tetiklenen bir cevap olan hücre göçünü uyarmaktadır. Bu VEGF-VEGFR etkileşimleri, vaskülojenez ve anjiyojenezdeki kilit rolleri ile iyi bilinmiştir. Lenfatik damarlarda ifade edilen VEGFR3 (Flt-4), VEGF-C ve VEGF-D ile etkileşime girer ve lenfanjiyogenezini teşvik ettiği düşünülmektedir. VEGFR'lerin tümör mikro çevresinde kan ve lenf damarı oluşumundan sorumlu olduğu ve dolayısıyla tümör büyümesini ve ilerlemesini desteklediği düşünülmektedir. VEGFR geninin yüksek ekspresyonu birçok farklı malignitede gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, VEGFR2 ve VEGFR3 genlerindeki somatik mutasyonlar en sık görülen bebek malignitesi Juvenil Hemanjiyomda tespit edilmektedir [36].



### **2.5.5. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü**

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) ailesi, iki farklı gen tarafından kodlanan ve farklı hücre tiplerinin membranında eksprese edilen iki reseptör (PDGFR- $\alpha$  ve- $\beta$ ) içermektedir. Bu tek zincirli reseptör proteinleri, beş Ig benzeri hücre dışı alanlara ve bir tirozin kinaz alanına sahiptir. Reseptörlerin dimerleştirilmesi, PDGF (A-D) ligandlarının homo / heterodimerlerine bağlanarak meydana gelir, reseptörlerdeki konformasyonel değişikliklere yol açar, bunları trans-fosforile etmeleri ve aşağı doğru proteinleri uyarmaları için harekete geçirmektedir. Bu, sinyalleri genellikle MAPK ve PI3K yolları yoluyla alıcı hücrelere iletir ve böylece hücre çoğalmasını, farklılaşmasını, büyümesini, göçünü ve hayatta kalmasını düzenlemektedir. Anjiyogeneze rolleri kaynaklı tümör büyümesini indüklemektedir. PDGFR genlerinde aşırı ekspresyon ve mutasyonlar, çeşitli kanserlerle ilişkilidir [37]. PDGFR $\alpha$  ve PDGFR $\beta$  genlerinin amplifikasyonu ve / veya aşırı ekspresyonu nedeniyle aşırı PDGFR ekspresyonu, insan glioblastoma multiforme'sinde bildirilmiştir [38].

### **2.5.6. Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü**

Fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR) ailesi, FGFR mRNA'nın ayırıcı eklenmesi nedeniyle değişmiş ligand spesifik şehirlerine sahip olan dört yakından ilişkili transmembran proteininden (FGFR1-4) ve bunların farklı izo formlarından oluşmaktadır. Bu tek zincirli reseptörler, ligand bağlama kapasitesine sahip üç immünoglobulin tekrarlı bir hücre dışı alanı, bir transmembran alanı ve karboksi terminalinde kinaz aktivitesine sahip bir hücre içi alanı içermektedir. Farklı FGF reseptörlerine bağlanabilen 18 değişik FGF ligand vardır. Bağlandıktan sonra, FGFR'nin dimerizasyonu otomatik fosforilasyona ve kinaz aktivasyonunu izin vermektedir [39]. Fosforile edilmiş FGFR'ler sırayla bir dizi proteini fosforile eder ve / veya birçok efektör için moleküler yerleştirme bölgesi olarak görev görür, böylece hücre çoğalması, büyümesi, farklılaşması, göçü, vasküler onarımı, yara iyileşmesi ve hücre sağ kalımı dahil bağlama bağlı hücresel fonksiyonları düzenlemektedir. FGF-FGFR etkileşimleri, sırasıyla aşağı mitojenik büyüme sinyalleri (MAPK) ve anti-apoptotik PI3K/AKT sinyallerinin sırasıyla kontrolsüz büyümesine ve hücre ölümünün inhibisyonuna yol açtığı şekilde, tümörjenezinde önemli rollere sahiptir. FGFR'lerin aşağısındaki PLC/PKC yolunun ayrıca hücre büyümesini desteklemek

üzere MAPK yoluna yakınlaştığı bulunmuştur. Bu reseptörlerin hem parakrin hem de otokrin olarak etki edip modalarında anjiyogenezde önemli rol oynadıkları ispat edilmiştir. FGFR ekspresyonu, tümör hücrelerinin birçok ilaca, özellikle de geniş çapraz konuşmalarından dolayı diğer büyüme faktörü reseptörlerini (EGFR, PDGFR ve VEGFR) hedefleyen inhibitörlere direnç kazanmasına neden olmaktadır. FGFR genlerinde reseptörlerin aktif aktivasyonuna / yukarı regülasyonuna yol açan genleşme ve mutasyonlar, meme, yumurtalık, mide ve akciğer kanserleri dahil olmak üzere farklı tip malignitelerde bulunmuştur [40].

## 2.6. PROLAKTİN VE PROLAKTİN RESEPTÖRÜ

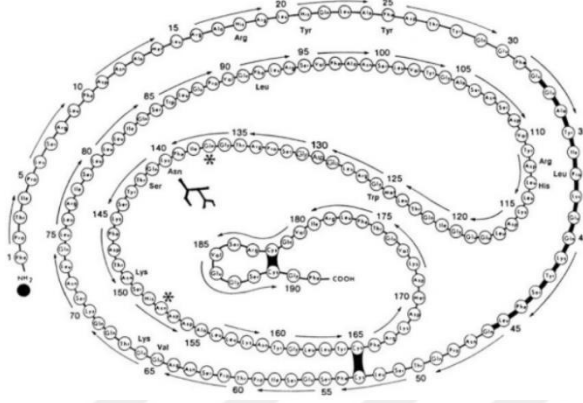
Prolaktin (PRL), süt proteini üretiminde rol alan hipofiz hormonu olarak tanımlanmış ve meme bezinin gelişimi için önemli görevi olduğu bilinmektedir [41]. Ayrıca PRL'nin meme epitel hücreleri ve *in vitro* meme kanseri hücreleri üzerindeki doğrudan uyarıcı rolünün kesin kanıtları bulunmuştur [42]. Meme kanseri hastalarının bazı alt popülasyonlarında ve ailesel meme kanseri gelişme riski olan kadınlarda serum PRL konsantrasyonlarında önemli artış gösteren bazı epidemiyolojik araştırmalar da mevcuttur [43].

Hipofiz bezi, meme bezinin normal gelişimi için önemli olduğu bilinen (Seks steroidleri, PRL ve GH) gibi birçok hormonun salgılanmasını kontrol etmektedir. PRL, GH ve plasental ile aynı gen ailesine aittir. PRL reseptörü ve GH reseptörü (GHR), sitokin reseptör süper ailesinin üyeleridir [6]. İki reseptör molekülünün ligand bağlanma dimerizasyonunu takiben Janus ailesindeki tirozin kinazların aktif hale getirilmesi, STAT ailesinin fosforilasyonu ve MAPK sinyallemeye yolunda yer alan proteinlerdir [44].

Bazı klinik gözlemleri ve deneysel çalışmalarında, GH da dahil olmak üzere hipofiz hormonlarının insan meme kanserinin gelişiminde rol oynadığını gösterdiğini belirlenmiştir. GHR ekspresyonunu değerlendirmek üzere transkripsiyon Rrt-PCR, immünohistokimya ve immünoiblotlama teknikleri kullanılarak 48 insan meme karsinomunda GH ve GHR anlatımını gösterilmiştir [41].

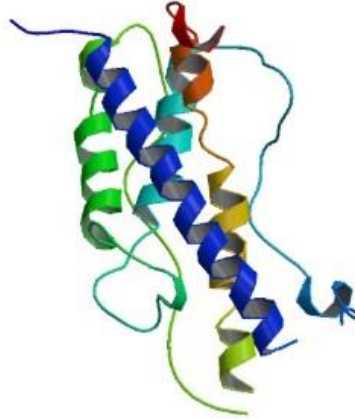
## 2.7. BÜYÜME HORMONU (GH)

GH, ön hipofiz bezinden 191 amino asitten uzunluğunda peptit sentezlenen ve postnatal büyümeyi indükleyen bir hormondur [45] (Şekil2).



Şekil 2. Büyüme hormonu amino asit dizisi [46]

BH, protein sentezinin uyarılması ve amino asitlerin hücre alımını içeren önemli metabolik etkilere sahiptir [47] (Şekil 3). 1950 yıllarda BH, büyüme yetersizliği (BHE) olanları tedavi olarak kullanılmaktadır [48].



Şekil 3. İnsan büyüme hormonu üç boyutlu yapısı  
(htTPLs://www.drugbank.ca/drugs/DB00052)

BH, temel olarak hipotalamik büyüme hormonu salgılayan hormona cevap olarak ön hipofizden sentezlenip salgılanmaktadır. Plasental laktojen ve prolaktin ile beraber BH, evrimsel olarak ilişkili peptid hormonlarının ailesine aittir [49]. Prolaktin'in normal meme ve meme kanseri gelişiminde pek çok fizyolojik ve patolojik süreçlerde

rolü bulunmaktadır [50]. Meme kanseri gelişiminde, BH seviyelerinin en önemli faktör olduğu, meme kanseri hastalar serumlarında BH seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir [51]. 2004 yılında yapılan bir çalışmada BH'ın, meme kanserli hücrelerinde çoğalmayı arttırdığı, EMT 'yi uyararak invazyonu ve metastazı indüklediğini belirlenmiştir [52].

2005 yılında, *in vivo* olarak otokrin BH üretiminin insan karsinoma hücrelerinde, JAK2'ye bağlı büyümeyi arttırdığını görülmüştür [53]. Büyüme hormonu, insan epitel hücrelerinin (MCF-10A) proliferasyonunu artırarak, apoptozu azaltarak ve hücre morfolojide değişikliklere neden olarak onkogenik transformasyona sebep olmaktadır. Ayrıca, otokrin BH anlatımı MCF-10A hücrelerinde siklin D1, c-myc ve Bcl-2 gibi genlerin transkripsiyonunda artış gösterdiğin saptanmıştır [8]. Bununla ilgili olarak birkaç klinik çalışmada BH metastazı ve maligniteyi indüklediği tespit edilmiştir [50-51]. Ayrıca büyüme hormonu tedavisini kullanan hastalarda kanser oranı daha yüksek olduğunu görülmüştür [55]. 2011 yılında farklı kanser üzerinde BH etkisine bakılmış ve sonuç olarak lenf nodu metastazını, tümör büyümesini ve meme kanserinde hücre çoğalmasını etkilediğini görülmüştür [56].

## **2.8. OTOKRİN GH VE İLAÇ DİRENÇ MEKANİZMASI**

Otokrin GH, embriyonik gelişim ve hücre farklılaşma ve proliferasyonda düzenleyici görevlere sahiptir ve tümör hücrelerinin gelişimine ve metastazına dahil olduğu bildirilmiştir [57]. Son araştırmalarda PRL ve GH 'in meme kanseri gelişiminde rolünü araştırılmıştır. Bununla ilgili olarak Metastatik meme karsinomunda GH gen ekspresyonu yüksek olduğu ve kemoterapi tedavilere kemoterapötik ilaçlara direnç gösterdiği görülmüştür [8].

Tamoksifen, östrojen reseptörü pozitif meme kanseri hastalarının tedavisinde kullanılan en yaygın anti-östrojen ilacı olup meme kanseri üzerinde önemli terapötik etkiler ortaya koymuştur ve meme kanseri ölüm oranını azaltmaya katkıda bulunmuştur. östrojenin, ER- $\alpha$  ve  $\beta$  geleneksel reseptörlerden başka bir üçüncü reseptöre sahip olduğu gösterilmiştir [58]. Ayrıca, hipofizektominin, hayvan modellerinde metastatik meme tümörünü dramatik bir şekilde baskıladığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, büyüme hormonu reseptörü antagonisti pegvisomant, dişi farelerde meme bezi gelişimini engellemekle kaldığı MCF-7 meme kanseri

ksenograft modelinde tümör büyümesini de inhibe ettiği gösterilmesi BH'nın meme kanseri gelişiminde önemli bir rolü olduğu ortaya koymaktadır [59].

Meme epitelindeki otokrin GH ekspresyonu, metastatik meme kanserinde en yüksek ekspresyon seviyesine sahip meme dokusunun neoplastik progresyonu ile pozitif korelasyon göstermektedir. MCF-10A'da GH'nin, hücre fenotipinde neoplastik değişikliklere yol açtığı ve hücrelerin, immün yetmez ksenograft hayvan modelinde tümör oluşturabildiği belgelenmiştir [60]. Hücresel düzeyde, otokrin GH hücre sağkalımını, çoğalmasını ve hareketliliğini arttırmanın yanı sıra hücre apoptozu azaltmak [61]. Otokrin büyüme hormonu ayrıca kemoresistant tümör fenotipine yol açabilmektedir. Otokrin GH, östrojen biyosentezinde anahtar bir enzim olan p450 aromataz ekspresyonunu düzenler, çünkü meme karsinomu hücrelerinde aromataz inhibitör ilaçlarına direnç sağlayabilmektedir [62].

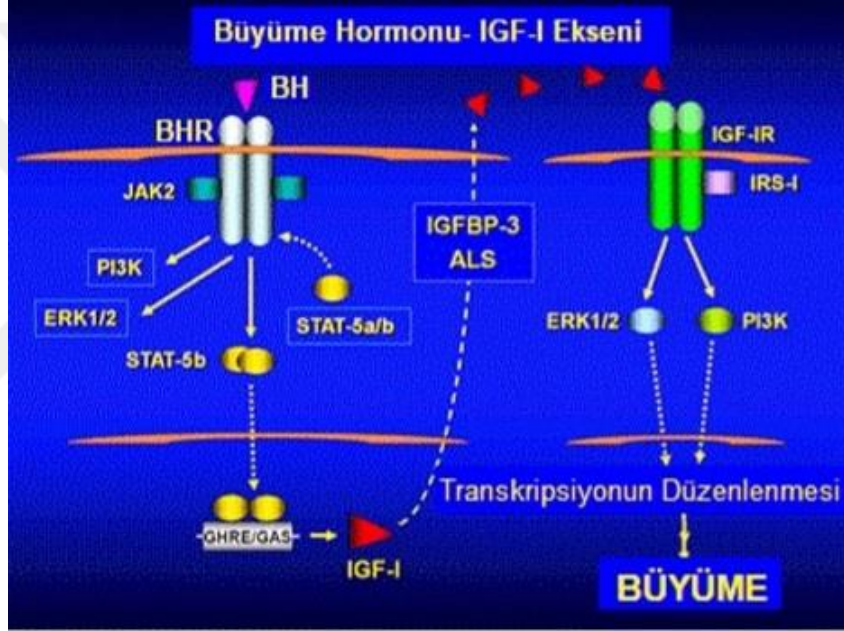
Daha önce laboratuvarımızda yapılan araştırmalar sonucunda, BH+T47D meme kanseri hücrelerinde kurkumini kullanılarak NF- $\kappa$ B sinyal yolu aktive edilmiş ve böylelikle, otokrin BH direncini önlediği ispat edilmiştir [63]. BH+ anlatımı yapan MCF-7, MDA -MB-453 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde zamana bağlı olarak kurkumin uygulanmasıyla hücrelerin ilaca karşı direnci azaltılmıştır [7]. Çin'de 2012 yılında yapılan bir çalışmada BH+ MDA-MB-435S ve T47D kanser hücrelerinde büyüme hormonunun IR ile birlikte radyoterapide kullanılarak arttırıldığı görülmüştür [64]. 2019 yılında BH+ ve IGF-1+ MCF-7 meme kanseri hücrelerinde kemoterapötik ilaçlara direnç gösterdiğini ve ölüm oranını arttırdığını ispat edilmiştir [65]. Başka bir çalışmaya göre hGH+ hepatosellüler kanser hücrelerinde hGH+ hücrelere göre daha hızlı çoğalmasını indüklediğini görülmüşken, hGH antagonismi kullanarak bu çoğalmayı inhibe ettiğini ispat edilmiştir [66].

2008 yılında yapılan bir çalışmaya göre MCF-7 BH+ hücrelerinde MAPK sinyal yolağı aktive ettiğini ve JAK/STAT sinyal yolağını inhibe ettiği görülmüştür [67]. MCF-7 Meme tümörlerindeki BH ifadesini, tümörün büyümesini, apoptozu azalttığını ve hücre çoğalmasını indüklediği görülmüştür [68]. Karmal ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmaya göre, MCF-7 meme kanseri hücrelerine eksojen olarak ilave edilmiş ve hGH apoptozu inhibe edildiği görülmüştür [69].

2018 yılında VEGFA (vasküler endotel büyüme faktörü A) MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmaya göre *in vivo* olarak triptolid uygulanmasıyla kontrole göre tümörün baskılandığını görülmüştür [70].

## 2.9. BÜYÜME HORMONU SİNYALİ

Büyüme hormonu (BH), ön hipofiz bezi sentezlenen bir hormondur. BH tarafından gerçekleştirilen sayısız fonksiyon arasında vücut büyümesinin düzenlenmesi, hücre çoğalması, farklılaşması ve proteinlerin, lipidlerin ve karbonhidratların metabolizmasının düzenlenmesi yer almaktadır [71]. Hücre zarı üzerindeki büyüme hormonu reseptörüyle BHR bağlanırken tirozoin kinazı doğrudan aktive ederek veya insülin benzeri büyüme faktörü indükleyerek büyüme hormonu etkisini ortaya koymaktadır [72] (Şekil 4).



Şekil 4. Büyüme hormonu sinyal yolağı.

([htTPLs://www.ohsu.edu/doernbecher/ron-rosenfeld-pediatric-research-lab](http://www.ohsu.edu/doernbecher/ron-rosenfeld-pediatric-research-lab))

BH, somatik hücrelerin postnatal büyümesinde esas rol alan hormondur ve bunun hücre büyümesi, farklılaşması üzerindeki etkileri, reseptörü (BHR) ile etkileşime girerek aracılık edilmektedir. Ayrıca, BH metabolizmayı, kalp ve bağışıklık fonksiyonunu ve yaşlanma üzerinde etkilenebilmektedir. Günümüzde GH, kısa boylu çocuklarda büyümenin desteklenmesi, BH eksikliği olan erişkinlerin tedavisi gibi çeşitli klinik durumlar için terapötik ajan olarak kullanılmaktadır [41].

GHR, karaciğer, kas, yağ ve böbrek ve erken embriyonik ve fetal dokular dahil olmak üzere, vücuttaki birçok dokunun hücre yüzeylerinde bulunmaktadır [73]. BHR'nin büyümedeki önemine dair kanıtlar, BHR geninde yer alan ve cüce fenotip ve BH-

duyarsız bir durumla sonuçlanan değişik mutasyonları ifade eden bireyler üzerinde yapılan çalışmalardan gelmektedir [74].

BHR'nin BH bağlanması, tirozin kinazı Janus kinaz 2'yi (JAK2) aktive eder, böylece hücre sel proliferasyon, farklılaşma ve göç, apoptozun önlenmesi, iskeleti yeniden yapılanma ve metabolik yolların düzenlenmesi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik tepkilerle sonuçlanan çok sayıda sinyalleşme kaskadını başlatmaktadır. BH tarafından aktive edilen bir dizi sinyal proteini ve yolu, JAK'lar, sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörleri (STAT), mitojen aktiveştirilmiş protein kinaz (MAPK) yolağı ve fosfatidilinositol 3'-kinaz (PI3K) yolağı dahil tanımlanmıştır [45]. BH, JAK2'nin uzun süreli aktivasyonu hücre transformasyonu ve kanser ile ilişkili gösterilmiştir [75].



## 2.10. MEME KANSERİ TEDAVİSİ

Meme kanserinde pek çok çeşitli tedavi yöntemleri hastanın patolojik durumuna göre seçilerek uygulanmaktadır (Tablo 3).

**Tablo 3. Meme kanseri tedavi yöntemleri [64- 65]**

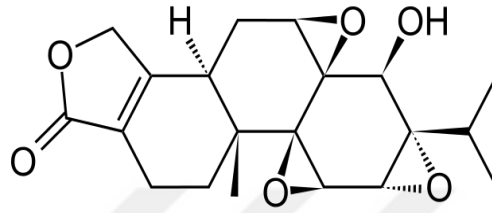
<b>Tedavi yöntemi</b>	<b>Tanım</b>
Cerrahi tedavi	Meme kanserli kadınların çoğu, tedavilerinin bir parçası olarak bir tür ameliyat geçirmektedir. Çeşitli tipte meme cerrahisi bulunmaktadır ve duruma bağlı olarak farklı nedenlerle yapılabilmektedir.
Radyasyon tedavi	Yerel veya bölgesel nüks riski olan hastalarda tavsiye edilmektedir.
Kemoterapi tedavi	Kanserli hücrelerin apoptotik ölümünü indükleyen oral olarak veya damar yoluyla verilmektedir.
Hormon tedavi	Hormon tedavisi (hormon tedavisi, hormon tedavisi veya endokrin tedavisi olarak da bilinir), vücudun hormon üretme yeteneğini bloke ederek veya hormonların meme kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini engelleyerek hormona duyarlı tümörlerin büyümesini yavaşlatır veya durdurur.

Hastaların çoğu bu farmakolojik tedavi yöntemleri birleşik olarak ihtiyacı olabilmektedir. Ancak şimdiye kadar potansiyel olarak meme kanseri kemoterapötik ilaçlara karşı direnç göstermekte olduğu için ikili ilaç kombine uygulanmasının etkisini mekanizması hala incelenmektedir.



## 2.11. TRIPTOLİD

Triptolid (TPL), *Tripterygium wilfordii* bitkisinden izole edilen doğal bir bileşendir [77]. TPL, antiinflamatuvar, immünosüpresif, antifertilite, antisistojenez ve antikanser ajanı olarak aktiviteye sahip olan bir bileşiktir. Triptolid, hücre proliferasyonunu, büyümesini etkiler ve apoptozu tetikler. Ayrıca, hücre döngüsünü indükleyerek, tümör anjiyogenezini inhibe ederek ve otofajiyi indüklemektedir [78] (Şekil 5).



Şekil 5. Triptolidin kimyasal yapısı

TPL, hücre ölümünün indüksiyonu nedeniyle *in vitro* ve *in vivo* olarak çeşitli kanser hücresi üzerinde önemli anti-tümör etkilere sahiptir. Akciğer ve prostat kanserinde antikanser rojenik etkisi olduğu bulunmuştur [79]. Triptolid ile indüklenen hücre ölümünün özellikleri arasında DNA hasarı, sitokrom C salınımı, inflamatuvar yolların aktivasyonu, otofajinin desteklenmesi ve proapoptotik anlatımını indüklediği TPL, meme kanseri hücrelerinin apoptozunu indükler. TPL'nın MCF-7 meme kanseri hücresi üzerinde anti proliferatif etkisi olduğu tespit edilmiştir [80].

Triptolid'in, çeşitli kanser türlerinde antitümör etkileri gösterdiğini ispat edilmiştir. Triptolid, antikanser aktivitesinden dolayı geniş çapta araştırılmıştır. Çalışmalar, triptolidin, özellikle onkoproteinlerin baskılanması veya hücre büyümesi / sağkalım faktörlerinin baskılanması yoluyla, çeşitli kanserlerde apoptozu inhibe ettiğini ve apoptozu indüklediği saptanmıştır [81].

2014'te yapılan bir çalışmada, triptolid'in, MDM2'yi transkripsiyonel seviyede kuvvetle inhibe ettiği, yüksek riskli bir ALL grubu olan MDM2 aşırı eksprese eden ALL hücrelerinin güçlü apoptoz ile sonuçlandığı tespit edilmiştir. Etki mekanizmasını daha da inceleyerek, MDM2'nin triptolid tarafından inhibe edilmesinin, p53 birikiminin artmasına yol açtığını belirlenmiştir. Ayrıca, hücre döngüsünün durdurulması ve apoptoz için p53'ün p21 ve PUMA'yı indüklemesinin birincil fonksiyonu aktiveleştirilmemiştir [82].

MDA-MB-231 hücrelerin üzerine yapılan bir araştırmada MDA-MB-231 hücrelerinde triptolid uygulanması ile kaspaz-3 aktivasyonu, ilişkili apoptotik yolu otofaji sinyal yollarını modüle ederek hücre ölümünü teşvik ettiği ispat edilmiştir. Bu nedenle, MDA-MB-231 hücrelerinde, apoptozis ve otofaji yolakları arasındaki farklılıklar, triptolid kaynaklı hücre ölümünde önemli bir adımdır. Birçok kanserde koruyucu bir mekanizma olan artan otofaji yolağı süreci, uygun kemoterapötik ajanların müdahalesiyle proapoptotik bir olay olarak yeniden programlanabilmektedir. Triptolid'in TNBC hücre proliferasyonunu teşvik eden ve hücre ölümünü / apoptozu önleyen yolaklar üzerindeki etkisini değerlendirmek için daha fazla hücre bazlı, *in vivo* çalışmalar terapötik etkinliği gösterilmiştir [83].

MCF-7 meme kanseri hücrelerinde triptolid uygulanmasıyla Erk1/2 yolağına etki ederek apoptozu indüklediği ispat edilmiştir [80]. Başka bir çalışmada MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde triptolidin uygulanmasıyla PERK, eIF2 $\alpha$  anlatımı ve ROS oluşumu arttırdığını görülmüştür [84]. Triptolid, MCF-7 meme kanseri hücreleri fokal adezyon kinazı yoluyla, doza bağlı olarak hücrenin büyümesini azalttığı ispat edilmiştir [85].

Farklı kanser hücre hatlarında triptolidin uygulanması apoptozu p53 yolu aktive ederek teşvik ettiği kanıtlanmıştır [86]. 2018 yılında yapılan bir çalışmada triptolid uygulanması kanser hücrelerindeki DNA hasarına neden olmuştur [87].

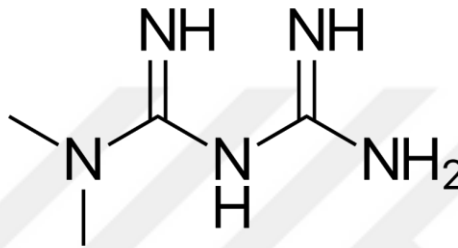
Başka bir araştırmada çeşitli doğal ürünlerden izole edilen ilaçları triptolid dahil olmak üzere kullanarak meme kanseri hücreleri çoğalması, gösterdiği direnci ve metastazı büyük ölçüde inhibe ettiği ispat edilmiştir [88].

2018 yılında MCF-7 meme kanseri hücreleri triptolid uygulanması Erk1/2 aktifleşerek otofojiyi ve apoptozu indüklemiştir [80]. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A kontrol olarak kullanarak spesifik olmayan MKP-1 inhibitörü triptolid uygulayarak meme kanseri hücre büyümesini azaltmıştır [89]. MDA-MB-231, BT-474 ve MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine triptolid uygulanmasıyla Wnt /  $\beta$ -katenin sinyal yolu ile apoptozu teşvik edilmiştir [90]. Farelerden elde edilmiş 4T1 meme kanseri hücreleri triptolid uygulanması apoptozu teşvik etmiş ve hücre çoğalmasını azaltmıştır [91]. 2014 yılında yapılan bir çalışmada BALB/ c fare modelinde triptolid uygulanması mock ilacına göre tümör büyümesini önemli bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür [92]. Triptolid, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde NF $\kappa$ B aktive ederek PLD1 anlatımını arttığı ve hücre çoğalmasını inhibe edildiği ispat edilmiştir [93]. Farklı kanser tiplerine, Prostat kanseri ve meme kanserinde triptolid uygulanması apoptozu

indüklediğini görülmüştür [79].1991 yılında yapılan bir araştırmada koloni, meme ve mide kanserinde koloni oluşum potansiyelinin azalttığı görülmüştür [94].

## 2.12. METFORMİN

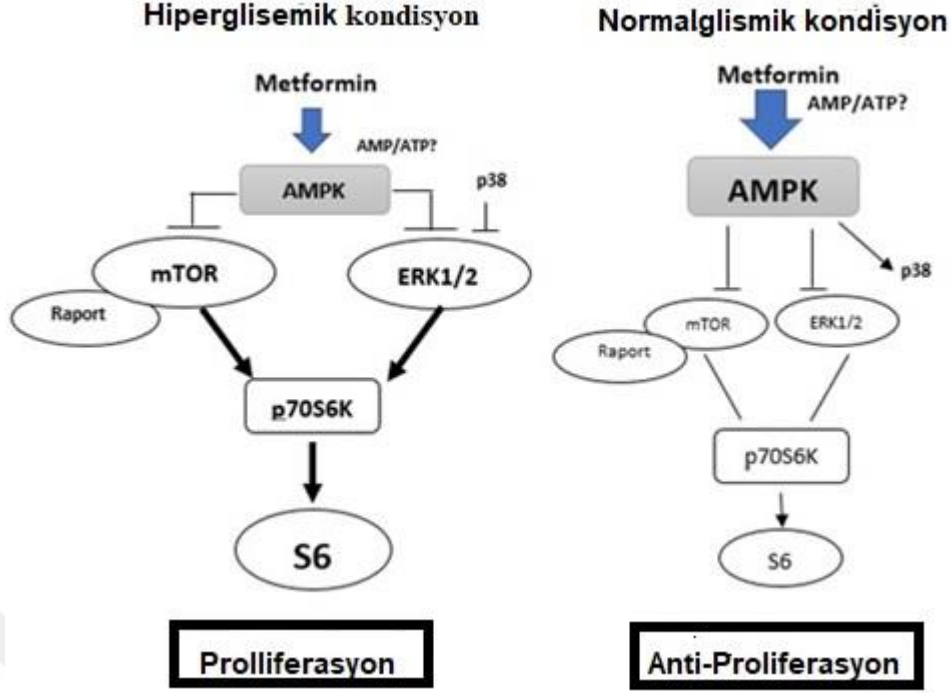
Metformin, *Galega officinalis* bitkisinden izole edilen bir ilaçtır [95]. Metformin, glikoz üretimini azaltma, glukoz emilimini azaltma ve hedef hücre insülin duyarlılığını artırma gibi fark tespit edilmektedir. Tip 2 diyabeti olan erişkinlerde glisemik (kan şekeri) kontrolünü iyileştirmek için tip2 terapötik olarak kullanılmaktadır [96] (Şekil 6).



Şekil 6. Metformin kimyasal yapısı

Metformin uygulanmasını 8 bin diyabet hastası üzerinde kansere yakalanma riskinin %54 oranında azaldığı tespit edilmiştir [96]. Metformin'in, meme, kolon [97] ve akciğer kanseri [98] bağırsakta polip büyümesini engellediği görülmüştür [99]. Metforminin, birçok meme kanseri hücre hattında esas olarak enerji algılama kinazının, AMP ile aktive olan protein kinazın (AMPK) aktivasyonu nedeniyle güçlü bir anti-proliferatif etkiye sahip olduğu göstermiştir [100].

MDA-MB-231 hücreleri, çeşitli anti-kanser ajanlarına ve ayrıca metforminin anti-proliferatif etkisine dirençli olduğu bilinen agresif ve invazivon meme kanseri hücreleridir. Metformin bir glikoz düşürücü ilaç olduğundan, normogliseminin MDA-MB-231 hücrelerini metforminin anti-proliferatif etkisine duyarlı hale getireceğini gösterilmiştir [101]. Meme kanserleri genellikle ER, PR veya HER2 ifadesine göre Sınıflandırılmaktadır [49]. MDA-MB-231 hücreleri, çeşitli anti-kanser ajanlarına dirençli oldukları bilinen agresif ve invasif TNBC hücreleri olup bazı epidemiyolojik araştırmalara göre, diyabetin artan meme kanseri riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir [102]. Ayrıca metformin meme kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinde AMPK arttırarak etki ettiği ifade edilmiştir [4] (Şekil 7).



**Şekil 7. Metforminin anti-proliferatif etkisinin normoglisemik koşullar altında önerilen mekanizmasını temsil eden şematik [4]**

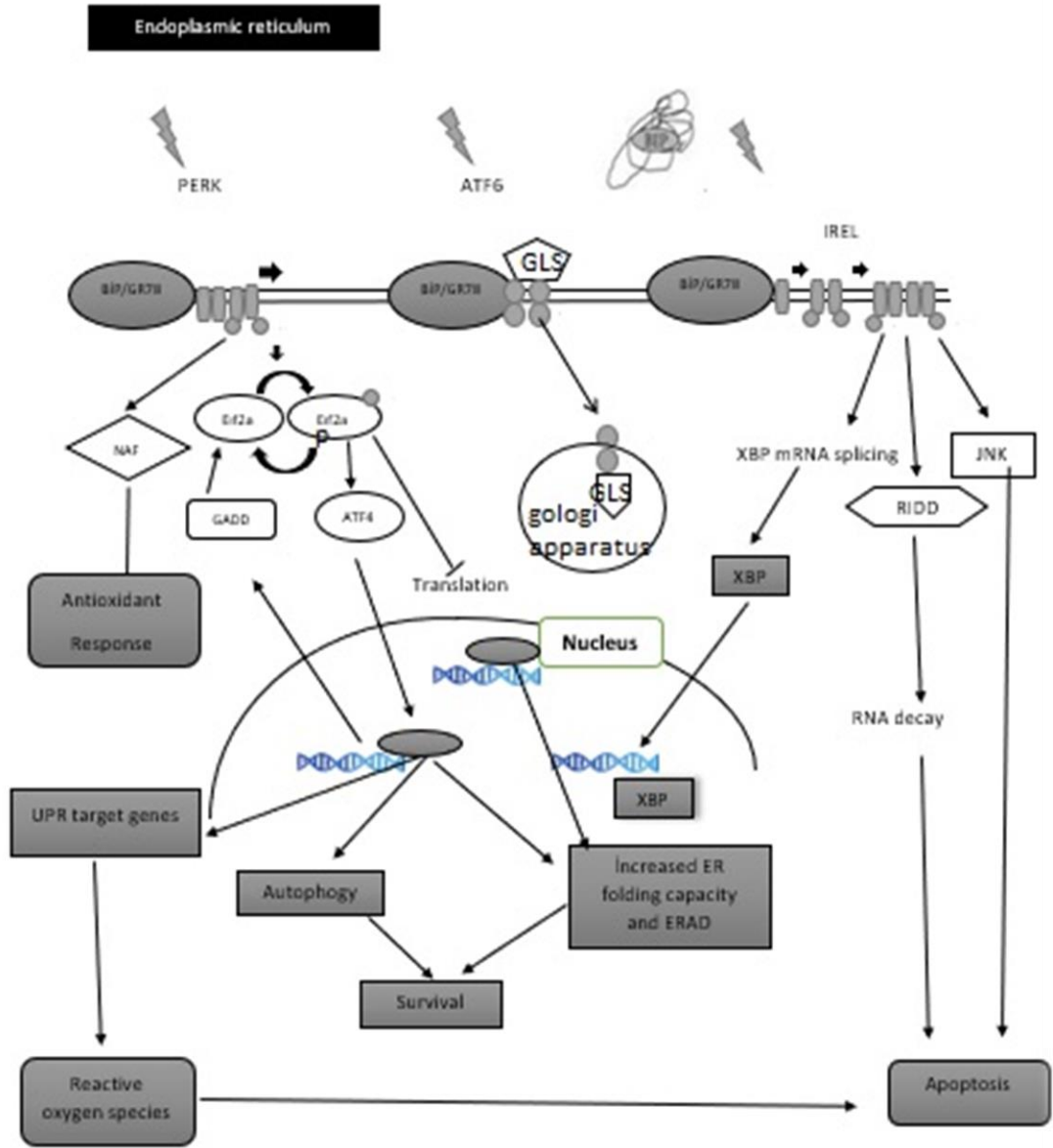
### 2.13. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES

ER, lipit ve protein sentezi, protein katlanması, kalsiyum homeostazı gibi çeşitli işlevlerinden sorumlu bir organeldir [103]. Bu organelde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerde bir artış ve birikim organelin homeostazında değişikliklere neden olmaktadır. Katlanmamış proteinler, protein kümeleri oluşturmak üzere eğilimli olan proteindeki hidrofobik amino asit kalıntılarını ortaya çıkarmıştır. Endoplazmik retikulum stresi nörodejeneratif hastalıklar, metabolik hastalıklar, ateroskleoz, diabetes mellitus ve obezitede görülmüştür. Endoplazmik retikulum stresi de kanserle ilişkili olduğun ispat edilmiştir [104].

Hipoksi, besin açlık, asidoz, redoks dengesizliği, kalsiyum homeostazı kaybı veya ilaçlara veya diğer bileşiklere maruz kalma gibi birçok durumda ER homeostazını bozabilmektedir, doğru protein katlanması kapasitenin azalmasına yol açmaktadır.

ER'nın içinde uzun bir sürede ve şiddetli bir şekilde yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinler biriktirmeye devam ederse buna yanıt olarak ölümünü tetikleyebilen katlanmış protein yanıtına yol açmaktadır [105].

Endoplazmik retikulumun (ER) stresi çeşitli faktörlerle tekliyebildiğini gösterilmiş ve hücrenin homeostazının korunmasından sorumlu olduğu bulunmuştur [106] (Şekil 8).



Şekil 8. Yanlış katlanmış protein cevabın moleküler mekanizmaları [107]

Endoplazmik retikulumun stresi üç protein aktivasyonu ile ilişkili olduğunu bilinmektedir. Bunlar PKR benzeri ER kinazı (PERK), aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) ve inositol gerektiren enzim (IRE1) [108].

Bununla bağlı olarak UPR'nın azalmasından ve CHOP proteini tarafından tetikleyerek pro apoptotik cevabından sorumlu olduğunu ortaya koyulmuştur [109]. IRE1 $\alpha$ , endoplazmik retikulum stresli durumunda ototransfosforirasyona maruz kalan ve endoRNaz aktive edebilen bir kinazdır. UPR yoluyla ER stresi kaynaklı hücresel cevapta başka aktivasyon yolu yoktur. ATF6'nın aktivasyonu. Bu da ER stresi sırasında sitoprotektif bir faktör olarak tanımlanmıştır [110]. ATF6, proteoliz ile aktive edilir ve streslerden sorumlu genlerin alt akış ekspresyonunu düzenlemek için transkripsiyonel bir faktör olarak hareket edilmektedir. Aktif ATF6 sinyallemesinin çeşitli tümör tipleri, kanser nüksü, metastatik lezyonlar, tümör büyümesini tetiklenmektedir [111].

Hipoksinin, endoplazmik retikulumun stresi nedeniyle protein biyosentezini zayıflattığını ve bu da UPR'ye yanıt yolunun aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. UPR'nin hipoksik tümörlerde aktivasyonu artmış otofajiye yol açmaktadır [112].

Oksidatif stres ER stresine neden olan ana faktörlerden biri olup reaktif oksijen türleri (ROS), yani hidroksil (OH) ve süperoksit (O<sub>2</sub>) radikalleri gibi eşleşmemiş bir elektrona sahip moleküller, mitokondride solunum zincirinde endojenik olarak üretilmektedir[113]. UPR'nın PERK ve ATF6, IRE1 $\alpha$  gibi ana bileşenlerinin artmış ekspresyon seviyeleri selise edilmemiş XBP1, beyin, meme, mide, böbrek, karaciğer, akciğer dahil olmak üzere farklı insan tümörlerinde doku kesitlerinde gözlemlenmiştir [114].

## 2.14. APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜ

On dokuzuncu yüzyılın ortalarından beri, birçok çalışma, hücre ölümünün, özellikle embriyogenez ve metamorfoz sırasında, çok hücreli organizmaların fizyolojik süreçleri sırasında önemli bir rol oynadığını göstermiştir. 1964 yılında programlanmış hücre ölümü apoptoz olarak adlandırılmıştır [115]. Apoptoz terimi, kontrollü hücresel kendi kendine yıkıma yol açan morfolojik süreçleri tanımlamak için yapılmış ve ilk olarak Kerr, Wyllie ve Currie tarafından yayınlanmıştır [80]. Apoptozu, farklı patolojik ve fizyolojik indükleyebilmektedir. Farklı biyokimyasal ajanları tarafından apoptotik yollarına başlatılmaktadır [116]. Ayrıca hücreler farklı faktörleri ve reseptörleri etkileyerek apoptoza gitmektedir. Bazıları ligand bağlama ve protein çapraz bağlama yoluyla Fas veya TNF reseptörlerini eksprese edebilmektedir [117].

Memelilerde, iki önemli apoptotik yolu vardır, içsel (mitokondriyal bağımlı) ve dışsal (ölüme reseptör bağımlı) yollar olduğunu gösterilmiştir. İki yolda, kaspazların ana düzenleyici proteinler olduğu gösterilmiştir. Kaspazlar, hücre içi sistemin proteazlarıdır [118] (Şekil 9).

### 2.14.1. Dışsal Ölüm Reseptör Yolu

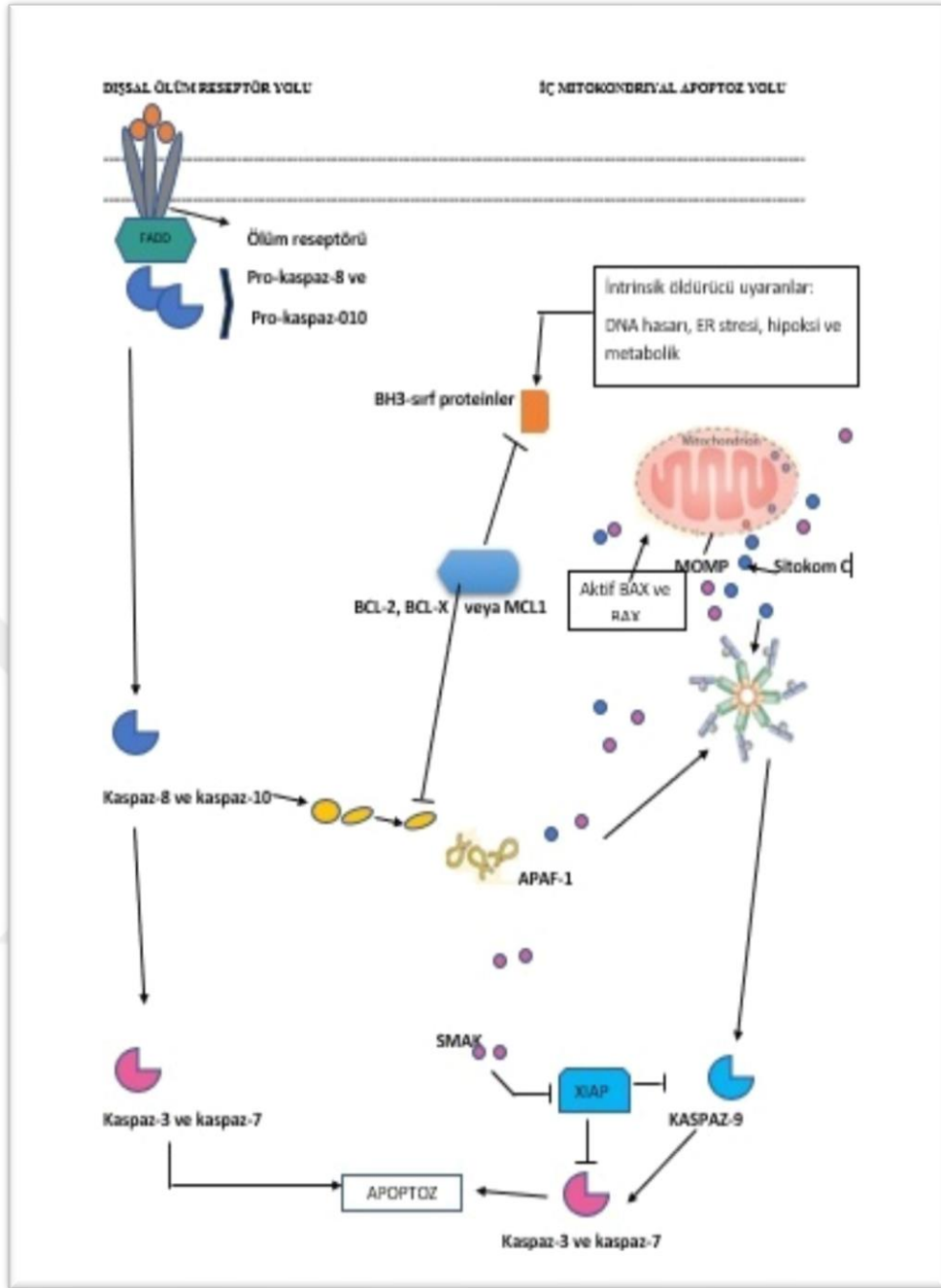
Bu yol hücrenin dışından gelen sinyallere bağlı meydana gelmektedir. Apoptotik kaskadı, bir hücre dışı ligand, TNF, Fas ligand veya TNF ile ilişkili apoptoz indükleyen ligandın bir transmembran proteine (ölüm reseptörü) hücre dışı bir bölgeye eklenmesini takiben başlamaktadır. Bağlandıktan sonra, transmembran proteininin hücre içi kısmı, yani ölüm bölgesi, Fas ligand bağımlı veya TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanıdır. Bağlanmış hücre içi proteinler, kaspaz 8'de de bulunan ve Ölüm Etki Alanı (DED) olarak adlandırılan başka bir bağlanma bölgesi içermektedir. DED, FADD'nin DED ile etkileşime girmektedir. Bu etkileşimler, sonuçta apoptozu etkileyen efektör kaspazlarını aktive eden pro-kaspaz 8'in aktivasyonuna yol açan bir Ölüm İndüklenme Sinyal Kompleksi (DISC) ile sonuçlanmaktadır [119].

### 2.14.2. İç Mitokondriyal Apoptoz Yolu

Hücre dışı ölüm reseptör yolunun aksine, içsel mitokondriyal apoptoz yolundaki apoptotik sinyaller hücre içi proteinlerin hücre streslerinin tanımlanması üzerine hücrenin mit bağlı gelmektedir [120]. MOMP, Hücre içi ölüm apoptotik Mitokondriyal Dış Membran Geçirgenliği (MOMP) ile sonuçlanan mitokondriye sinyalleri iletmektedir. Mitokondriyal Dış Membran azalması permeabilizasyon, B-hücreli lenfoma 2 protein ailesi proteinleri, yani anti-apoptotik proteinler (MCL1, A1 / Bfl-1, Bcl-B / Bcl2L10, Bcl-2) ve pro-apoptotik proteinler (Bax) arasındaki dengeye bağlı olduğunu bilinmektedir. BOK, BAK, BID, BIM, PUMA, NOXA, BIK, HRK, BMF). MOMP'nin oluşması için, genellikle Bcl-2 protein ailesinin aracılık ettiği mitokondriyal membran proteini ve protein-protein etkileşimleri arasında karmaşık bir etkileşim olmaktadır [121]. Programlı hücre ölümü veya apoptoz süreci genellikle farklı morfolojik özellikler ve enerjiye bağlı olarak karakterize edilmektedir. Apoptoz, hücre içinden veya dışından çeşitli uyaranlar tarafından tetiklenebilir, örneğin hücre yüzey reseptörlerinin ligasyonu, DNA onarım mekanizmalarında bir kusurun nedeni DNA hasarıdır. Bununla birlikte, bu türden çeşitli kökenlerin ölüm sinyalleri, apoptotik hücre ölümünün karakteristik özelliklerine yol açan bir ortak hücre ölüm mekanizmasını nihayetinde aktive etmektedir [122]. Genomik analizin ortaya çıkışı, kanserlerin hücre ölümünü engellemesine izin veren çeşitli mutasyonlar hakkında önemli bilgiler sağlamıştır [123].

Normal meme gelişiminde, hücre çoğalması ve apoptozun arasındaki bir denge tarafından kontrol edilir ve tümör büyümesinin sadece kontrolsüz proliferasyonun bir sonucu değil, aynı zamanda azaltılmış apoptozun bir sonucu olduğuna dair güçlü kanıtlar olmaktadır. Proliferasyon ve apoptoz arasındaki denge, kemoterapiye, radyoterapiye ve son zamanlarda hormonal tedavilere yanıt olarak tümörün genel büyümesinin veya gerilemesinin belirlenmesinde çok önemli olduğunu kanıtlanmıştır. Bunların tümü kısmen apoptozu uyararak etki eder; bu nedenle, apoptoz ve kontrol ve regülasyonu inceleyerek ve bunları klinik avantajdan yararlanarak moleküler ve biyokimyasal düzeydeki münferit tümörlerin biyolojisini tanımlamak mümkündür [124].





Şekil 9. Apoptotik hücre ölümü yolağı [125]

# BÖLÜM III

## 3.1. MATERYAL

### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde Tablo 4'te sunulmuştur.

### 3.1.2. Hücre Kültürü Donanımları

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Ekler bölümünde Tablo 5'te sunulmuştur.

### 3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Çalışma sürecinde kullanılan kimyasal maddeler Ekler bölümünde Tablo 6'da sunulmuştur.

### 3.1.4. Kullanılan Tamponlar

10X TBS 86,6 gr NaCl, 12,11 gr Tris-Baz konulur. PH:8'e ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml'e tamamlanır. Hazırlanan 10X TBS kullanılmak için 1X TBS'e dönüştürülür. 10X TBS-Tween 1X TBS içine 500 ul Tween20 konularak hazırlanır. Yürütme tamponunun hazırlanması 30,3 gr Tris-Baz, 114 gr Glisin ve 10 gr SDS tartılarak 1000 ml distile su içinde çözülür. Hazırlanan 10X yürütme tamponudur. Jel yürütmesi aşamasında kullanılmak için 1X'e dönüştürülür. Transfer tamponunun hazırlanması 200 ml 10X yürütme tamponunun üzerine 100 ml metanol konularak distile su ile 1000 ml'e tamamlanır. Yürütme Jelinin Hazırlanması Protein ağırlıklarına göre ayrılmaları için %12'lik SDS poliakrilamid jelde yürütülürler. Jel içeriği Ekler bölümünde sunulmuştur. Hücre Dondurma Medyasının Hazırlanması 9 ml filtre edilmiş Fetal Sığır Serumu ve 1 ml dimetilsülfoksit (DMSO) ile hazırlanandondurma medyası yardımıyla hücreler önce 2-3 gün izopropanolde bekledikten sonra uzun süreli olarak sıvı azot tankının içinde saklanabilir.

## 3.2. YÖNTEMLER

### 3.2.1. Hücre Kültürü

MDA-MB-231 (östrojen reseptörü negatif, ER-) doğal tip meme kanseri hücre hatı American Type Tissue Culture Collection'dan temin edilmiştir. Stabil otokrin BH anlatımı kazandırılan MDA-MB-231 hücre hatları İKU Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Yüksek Lisans mezunu Merve Çelik tarafından yapılmıştır. Hücreler %10 sığır fetüs serumu ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotiği içeren DMEM besiyeri içerisinde %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C etüvde inkübe edilmiştir. Hazırlanmış olan besiyeri 0.22 µM por çapındaki hücrekültürü ile uyumlu filtrelerden geçirilerek steril hale getirilip, 50 ml'lik falkon tüplerde +4°C'de saklanmıştır. Hücreler 25 ve 75 cm<sup>2</sup> 'lik hücre kültürü petrilерinde büyütülmüştür. Protein, RNA izolasyonları için 60 ve 100 mm'lik, floresan mikroskobu çalışmaları için 96 ve 6 kuyucuklu, 60 mm'lik hücre kültürü petrilерine ekimler yapılmıştır. Hücreler bir gece boyunca hücre kültürü petrilерine yapıştıktan sonra kullanılan ilaç belirlenen sürelerde uygulanmıştır ve %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C etüvde inkübe edilmiştir. Gerçekleştirilecek deneyler doğrultusunda hücre ekimleri veya petri kabı içerisindeki hücrelerin yoğunluğunun artması sonucunda hücre pasajlama işlemi için öncelikle ortamdan besiyeri uzaklaştırılmıştır. 75 mm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü petrisi içerisine 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırılır. Petri kabı içerisine 2 ml tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) (%0,25) eklenerek CO<sub>2</sub> içeren etüvde 3-4 dakika boyunca bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin zarar görmemesi için petri kabına 2 ml DMEM besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuş ve hücreler santrifüj tübüne alınmıştır. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmış, hücrelerin üzerine 1 ml taze besiyeri eklenmiştir. İyi pipetaj yapıp homojen bir hale gelen hücre süspansiyonu hücre sayımına hazırlanmış bulunmaktadır. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresinin kanalına aktarılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Hemositometrede 25 karede sayılan hücre sayısı, 1 ml'deki hücre sayısının bulunabilmesi için 10<sup>4</sup> ile çarpılmıştır. 1,5x10<sup>6</sup> hücre, 75 cm<sup>2</sup>'lik petri kaplarına ekilerek hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.2. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücre canlılığını belirlemek amacıyla MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromit) ajanı kullanılmıştır. MTT ajanı, canlı hücre içerisinde mor renkli formazan tuzu oluşturulması sonucu kolorimetrik yöntem ile hücre canlılığı belirlenmiştir. MDA-MB-231 doğal tip ve büyüme hormonu meme kanseri hücresi  $1 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine ekim gerçekleştirilmiştir. Bir gece inkübasyonu takiben hücelere (0- 50 nM) triptolid ve (0- 5 mM) metformin 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İlaç uygulamasının sonrasında hücelere 4 saat boyunca MTT ajanı uygulanmış ve DMSO ile formazan tuları çözümlenilip absorbans değeri ikili dalga boyunda 570 ve 655 nm’de mikropilaka okuyucusunda ölçüm yapılmıştır.

### 3.2.3. Hücre Sağ kalım Analizi

Triptolid ve metformin’in MDA-MB-231 doğal tip ve büyüme hormonu meme kanseri hücreleri canlılığını belirlemek amacıyla hücre sağ kalım deneyi yapılmıştır. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece yapışması beklenen hücelere 2 nM triptolid 24,48 ve 72 saat boyunca uygulanmıştır. 24,48 ve 72 saat sonunda hücreler tripsin ile toplanarak 2000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edilir. Hücre pelleti 100 µl besiyeri ile çözülür. Çözülen pelletten 10 µl alınır ve 10 µl tripan mavisi ile karıştırılarak hemositometride sayımı yapılır.

### 3.2.4. Floresan Boyama

3,3’Diheksiloksakarboxianin İyodür (DIOC<sub>6</sub>) Boyama Triptolid ve Metformin’in MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemek amacıyla DIOC<sub>6</sub> boyama gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine  $10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücelere (0-50 nM) triptolid ve (0-2 mM) metformin 24 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 1 nM DIOC<sub>6</sub> (ana stok: 4 mM) 30 dakika boyunca uygulanarak floresan mikroskopunda mavi filtre ile canlı hücreler belirlenmiştir. Hücre ölümü belirlemek amacıyla PI boyama gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine  $10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücelere (0- 50 nM) triptolid 24 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyonu takiben her

bir kuyucuğa 2 ug/ml PI (ana stok:50 mg/ml) uygulanarak 15 dakika etüvde inkübe edildikten sonra yeşil filtrede ölü hücreler belirlenmiştir. 4',6-diamidino -2-fenilindol (DAPI) Boyama triptolid ve metforminin MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla DAPI boyama gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine  $10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere (0-50 nM) triptolid ve (0-5 mM) metformin 24 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 1 µl/ml DAPI boyası 30 dakika uygulanmıştır. Mitotraker/DAPI boyama Hücreler 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisi içerisine  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekilmiştir. Bir gece boyunca yapışmaları beklendikten sonra hücrelere (0-50 nM) triptolid ve (0-5 mM) metformin 24 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda mitotraker ve DAPI floresan boyası hücreler üzerine eklenmiş ve 30 dakika inkübasyon yapılmış ve floresan mikroskopunda görüntülenmiştir.

### **3.2.5. Koloni Oluşumu**

MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri ve BH+ hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkisini belirlemek amacıyla koloni oluşumu tekniği kullanılmıştır. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece yapışması beklenen hücrelere 24 saat boyunca ilaç uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda her bir kuyucukta bulunan besiyeri normal besiyeri ile değiştirilmiştir. Hücreler 10-15 gün boyunca büyümeye bırakıldıktan sonra hücreler soğuk %100 metanol ile fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrasında kristal viyole ile boyama yapılmıştır.

### **3.2.6. Yara İyileşme Yöntemi**

MDA-MB-231 doğal tip ve büyüme hormonu meme kanseri hücrelerinde yara iyileşme potansiyeli üzerine etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrilere  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücreler ilaçlanır 200 µl'lık steril pipet ucu ile petri kabında bir yara oluşturulur. 0, 24 ve 48 saat boyunca yara uzunluğunun değişimi ölçülmüştür.

### 3.2.7. Asılı Damla Modeli Tekniği

Asılı Damla metodu ile 3B speroid hücre kültürü MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ hücreler 60 mm' lik petrilere her damlacıkta  $2,5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde kontrol ve ilaçlı olarak 4 farklı petriyen damlacık halinde ekilir. Kontrol hücreleri, 20 nM triptolid, 2 mM metformin ve ilaçların kombinesi ile ilaçlı hücreler ışık mikroskobunda 3 gün boyunca gözlenmekte ve damlacık çapı kaydedilmektedir. 3. günün sonunda damlacıklar DAPI ve DIOC<sub>6</sub> floresan boya ları ile boyanıp 24 saat inkübe edilmektedir. 24 saat sonunda floresan mikroskobu ile damlacıklar gözlenmektedir.

### 3.2.8. Yumuşak Agar Analizi

Triptolid ve Metformin'in MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde yumuşak agarın altında koloni oluşumu üzerine etkisini belirlemek amacıyla yumuşak agar koloni oluşumu yapılmıştır. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 2.500 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece yapışması beklenen hücrelere 20 nM triptolid ve 2 mM metformin 24 saat boyunca uygulanmıştır.

### 3.2.9. Total Protein İzolasyonu

60 mm'lik hücre kültürü petrilere  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca yapışmaları beklendikten sonra hücrelere ilaç 24 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler 1x PBS içerisinde kazıyıcı yardımıyla kazınarak toplandıktan sonra 2 dakika 13200 rpm'de çöktürülmüştür. Bu işlem petrideki bütün hücreler toplanana kadar tekrarlanmıştır. Santrifüjle çöktürülen hücrelere lizis tamponu eklenmiştir. Örnekler 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildikten sonra 20 dakika 13200 rpm'de +4°C'de santrifüj yapılmıştır. Üst faz yeni ependorfa alınarak miktar tayini yapılmıştır.

### 3.2.10. İmmünoblotlama Yöntemi

1 mm kalın ve ince camlar distile su ile yıkanır ve kurulanır. Camlar yönlerine dikkat edilerek birleştirilir ve aparata eklenir. Kenarları kilitlenir. Aparat sisteme yerleştirilir. Alt ve üst jel içerikleri Tablo 1'de verilmiştir. Alt jel hazırlanır ve homojen bir karışım elde etmek için pipetaj yapılır. Jel hızlı bir şekilde iki cam arasına aktarılır. Alt jeli hizalamak için üzerine izopropanol eklenir. Alt jelin donması için beklenir. Alt jel donduktan sonra izopropanol dökülür ve distile su ile yıkanır. Kurutma kâğıdı ile camlar arasındaki bölme kurutulur. Üst jel hazırlanır, pipetaj yapılır ve camların

arasına eklenir. 1 mm'lik tarak jelin üzerine konur. Jelin donması beklenir. Proteinlerin Hazırlanması ve SDS-PAGE'de yürütülmesi: İmmünoablota yöntemi için 30 ug protein ile Laemli tamponu (5X) 1:4 oranda karıştırılarak 95°C'de 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. %4 yükleme ve %12'lik ayırma SDS-PAGE hazırlanarak, sistemde ilk kuyuda protein belirteci olacak şekilde proteinler bu jelde yüklenmişlerdir. Jel yürütme tamponu içinde 80 V'de 4 saat boyunca yürütülmüştür. Membrana Transfer ve Bloklama Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra yükleme jeli kesilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ayırma jeli büyüklüğünde poliviniliden florid (PVDF) membran jelin altına koyulmuştur. Membranın altına ve jelin üstüne transfer tamponu ile ıslatılmış filtre kağıtları olacak şekilde hazırlanan bu sistem transfer kasetine yerleştirilmiştir. 2,5 miliamper 25 voltta transfer gerçekleştirilmiştir. Büyük kilodalton proteinler 5-9 dakika arası, küçük kilodalton proteinler ise 2,5-4 dakika arasında olacak şekilde transfer yapılmıştır. Transfer işlemi sonunda membranlar %5'lik yağsız süt (%0,1 tween 20 içeren 1X TBS) içerisinde 1-1,5 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilerek bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Primer ve Sekonder Antikor İşaretlemeleri ve Bantların Görüntülenmesi Süt içerisinden alınan membranlar, primer antikorlarla gece boyu +4°C sıcaklıkta bekletilmiştir. Birincil antikorlar %5'lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween20 içeren 1X TBS) içinde belirlenen primer antikorlar 1:1000 oranında hazırlanmıştır. STAT1, STAT5, PERK, BİP, IRE1 $\alpha$ , Bcl-2, Bax, Kaspaz-7, PARP, Bad, Erol-L $\alpha$ , Calnexin, Calreticulin, PDI, GAPDH,  $\beta$ -actin primer antikorları kullanılmıştır. Primer antikorların uygulanmasının ardından membranlar 1X TBS-Tween ile 10 dakika olmak üzere oda sıcaklığında 3 kez yıkanmıştır. Yıkama sonunda, membranlar anti-tavşan ve anti-fare ikincil antikorlar (1:3000) ile gece boyu +4°C sıcaklıkta bekletilmiştir. İkincil antikor uygulamasının ardından, 15'er dakikalık 2 TBS-Tween20 ve 15 dakikalık TBS yıkaması sonrasında, örnekler kemiluminisans tampon (A ve B çözeltilerinin 1:1 karışımı) ile 1 dakika boyunca muamele edilmiştir. Membranlar kemiluminisans tamponu ile bekletildikten sonra, transluminatör aletinde görüntülenmiştir.

### **3.2.11. Hücre Akış Sitometresinde PI Analizi**

Triptolid ve Metformin'in MDA-MB-231 doğal tip ve büyüme hormonu meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkisini belirlemek amacıyla PI boyaması sonrasında akış sitometresi gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrilere  $2 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere 20 nM Triptolid ve 2 mM Metformin'in birlikte ve tek olarak 24 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler tripsin yardımıyla kaldırıldıktan sonra %70 soğuk etanol ile muamele edilip fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fikse edilen hücreler 1-2 hafta boyunca  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda etanol uzaklaştırılarak 1ml 1X PBS içerisinde  $1 \mu\text{l}$  PI (1 mg/ml) boyası olacak şekilde boyama yapılmıştır. Hücreler karanlıkta 30 dakika boyunca bekletildikten sonra akış sitometresi aletinde okutma yapılmıştır.

### **3.2.12. CHOP Biyolojik Aktivitesinin Plazmit Aracılı Floresan Mikroskopunda Gösterilmesi**

Bakterileri 2 gün boyunca kanamisin ile seçim yaparak  $37^{\circ}\text{C}$  de büyütülmüştür. Plazmit izolasyonu Thermo Scientific™ GeneJET Plasmid Miniprep kit (kat no: K0503) kullanarak yapılmıştır. Hücreler 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisi içerisine her kuyucuğa 150 bin hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin bir gece boyunca hücre kültürü petrisine yapışmaları beklenmiştir. İki ayrı mikrofüj tüpü içerisine 100  $\mu\text{l}$  hacimde negatif DMEM (FBS içermeyen) konulmuştur. Transfeksiyon oranı 1:3 olacak şekilde CHOP promotor (649/+136) pmCherry-1 plazmitlerinin her biri için lipozomal ajan olan iNtRON BIOTECHNOLOGY iN-fect™ (kat no: 15081) transfeksiyon ajanı kullanılmıştır. İki ayrı mikrofüj tüpüne hazırlanan plazmitler ve transfeksiyon ajanı 5 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında iki mikrofüj tüpü birleştirilerek 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bir gece önceden ekimi gerçekleştirilmiş olan hücreler üzerine hazırlanan süspansiyon damla damla olacak şekilde verilmiştir. Transfeksiyondan 24 saat sonra ilaçlama gerçekleştirilmiştir. İlaçlamadan 1 gün sonra floresan çekimi yapılmıştır.



### 3.5.13. İstatiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar en az üç deney tekrarının ortalamasıdır. Deneylerden elde edilen tüm sayısal sonuçlar GraphPad Prism 6 kullanılarak grafik haline dönüştürülmüş ve istatistiksel olarak analizleri bu program sayesinde gerçekleştirilmiştir. Anlamlı değişimler için p değeri sırasıyla \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , olarak verilmiştir.

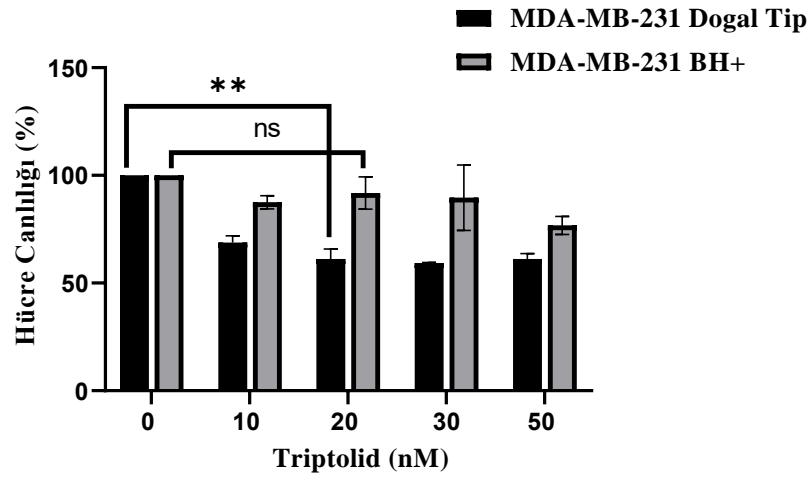


## BÖLÜM IV

### 4.1. SONUÇLAR

#### 4.1.1. MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Hücre Canlılığı Üzerinde Etkisini Doza Bağlı Triptolid Uygulanmasının Gösterilmesi

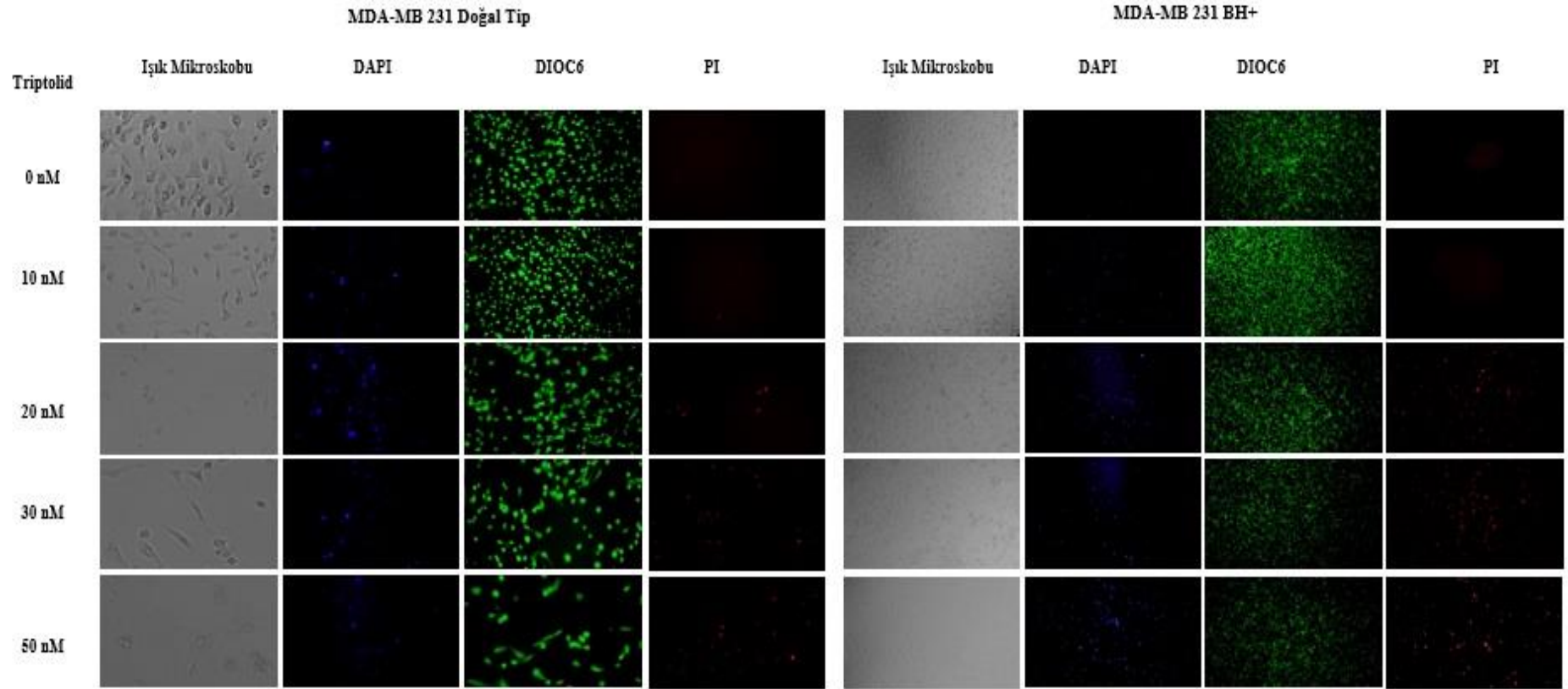
Triptolid'in MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücreleri hücre canlılığını belirlemek amacıyla doza bağlı olarak (0, 10, 20, 30 ve 50 nM) MTT analizi gerçekleştirilmiştir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücreleri 24 saat 10 nM triptolid uygulandığında kontrol grubuna göre hücre canlılığını %30 azalmış, 20 nM triptolid uygulandığında %40 bir azalma göstermiştir. 30 nM triptolid uygulanması hücre canlılığında %40 bir azalma göstermişken 50 nM triptolid uygulanması hücre canlılığını %45 bir azalma göstermiştir. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücreleri 24 saat 10 nM triptolid uygulaması kontrol grubuna göre hücre canlılığı %20 bir azalma göstermişken 20 nM triptolid uygulandığında %10, 30 nM %10, 50 nM %25 azalma gösterilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücreleri hatlarında doza bağlı triptolidin hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi (\*\*p<0.01)

#### **4.1.2. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ hatları üzerinde doza bağlı triptolid uygulanmasını hücre ölümü ve Mitokondri Membran Potansiyeli üzerine etkisinin gösterilmesi**

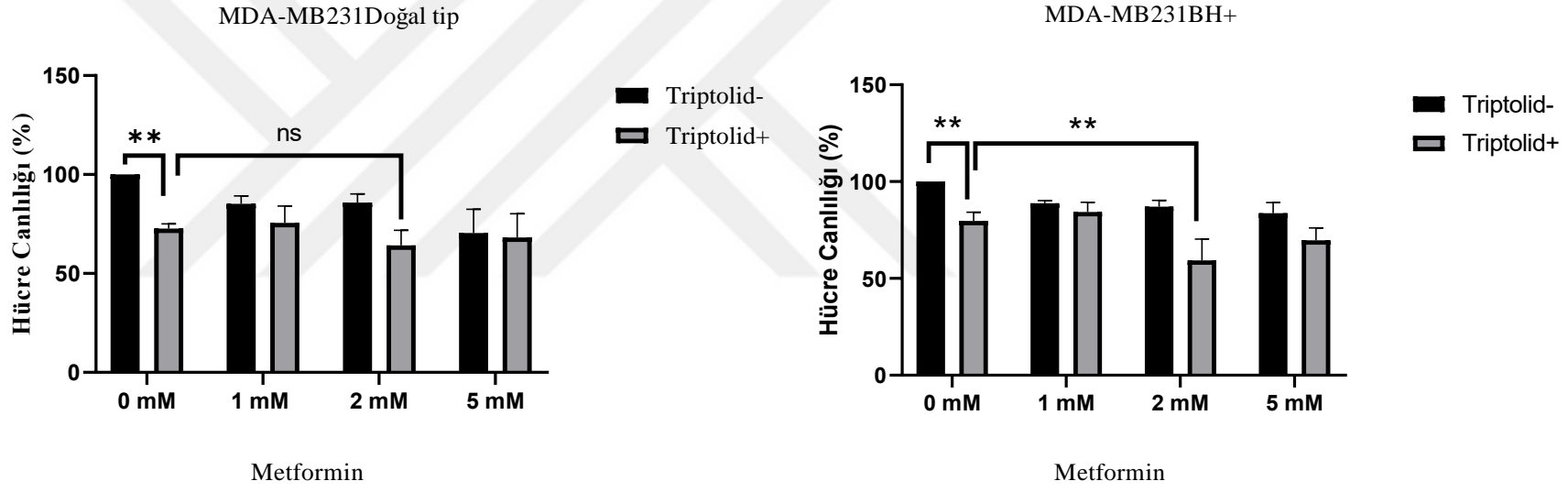
Triptolid'in MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücreleri ölümü, hücre canlılığının ve DNA kırıklarının belirlenmesi amacıyla doza bağlı olarak (0- 50 nM) floresan boyamaları analizi gerçekleştirilmektedir. Apoptotik ölüm ile karakterize edilen DNA kırıklarını gösteren DAPI boyamasında Triptolid uygulamasının doza bağlı olarak boyanan hücre sayısını kontrol grubuna göre arttırdığı gösterilmiştir. Özellikle 20 nM ve 50 nM Triptolid uygulamasında kontrol grubuna göre DNA kırıklarının önemli ölçüde arttığı gözlenmektedir. Ölü hücre membranlarından girerek DNA'ya bağlanan PI ile Triptolid uygulamasında doza bağlı olarak kontrol grubuna göre boyanan hücre sayısının arttığı gösterilmiştir. Canlı hücrenin mitokondri membran potansiyel gösteren DIOC<sub>6</sub> boyamasında Triptolid uygulamasının doza bağlı olarak boyanan hücre sayısını kontrol grubuna göre azalttığını gösterilmiştir (Şekil 11).



**Şekil 11. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ hücre hattı üzerinde doza bağlı triptolid uygulanmasını (0- 50nM) hücre ölümünü ve Mitokondri Membran Potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyaması ile gösterilmesi**

#### **4.1.3. MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Hücre canlılığı Üzerinde Etkisinin Doza Bağlı Triptolid ile Metforminin Beraber Uygulanmasının Etkisinin Gösterilmesi**

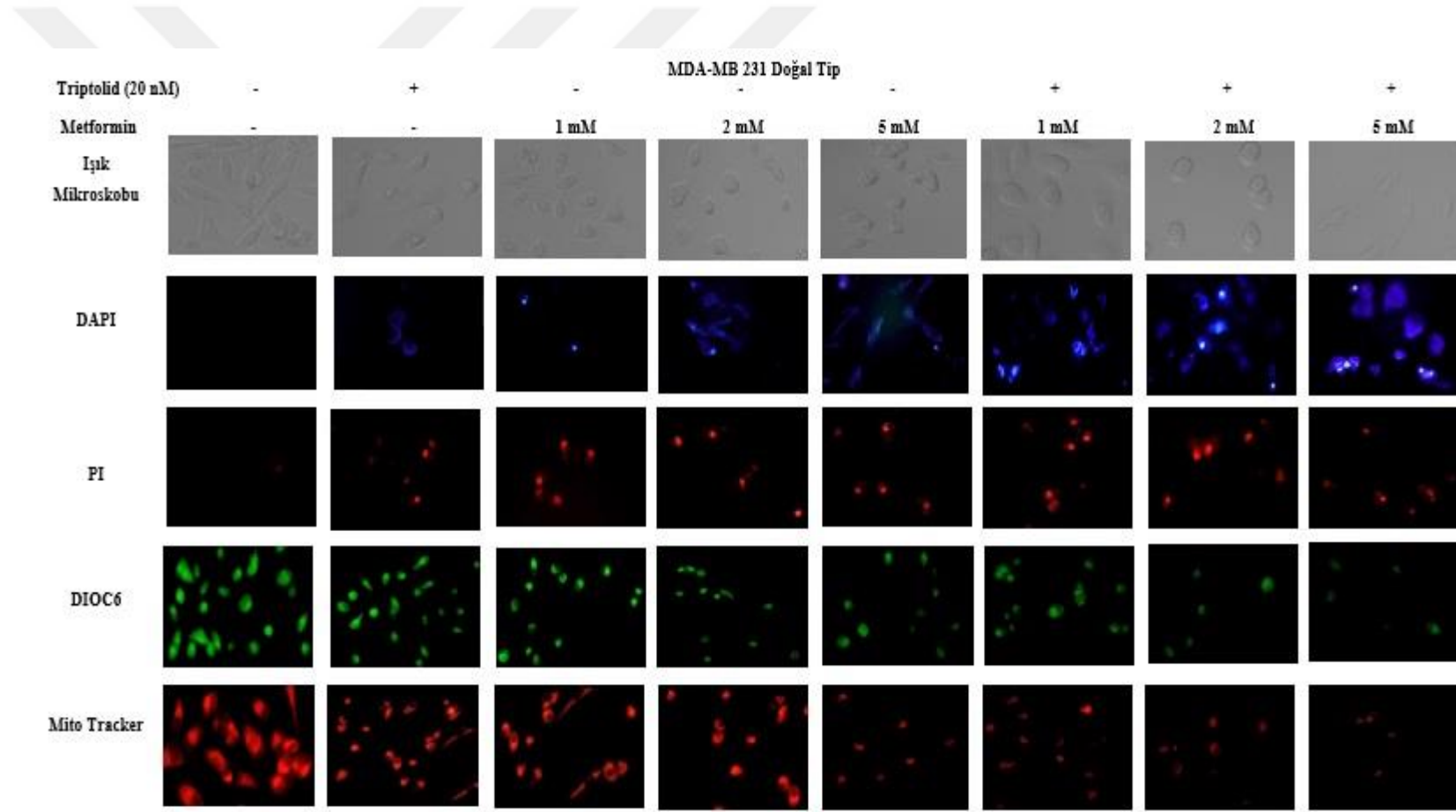
Triptolid ile Metformin kombine ederek MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücreleri canlılığının belirlenmesi hücre canlılığını belirlemek amacı ile doza bağlı olarak (0, 1, 2 ve 5mM) MTT analizi gerçekleştirilmiştir. MDA-MB-231 doğal tip hücrelere sadece triptolid (20 nM) uygulanmasının hücre canlılığı %30 ket vurmuşken (20 nM) triptolid ile (2 mM) Metformin uygulanmasının hücre canlılığı %40 ket vurmuştur. MDA-MB-231 BH+ sadece (20 nM) triptolid uygulanmasının hücre canlılığı %20 ket vurmuşken triptolid (20 nM) ile metformin (2 mM) uygulanmasının hücre canlılığına %45 ket vurmuştur (Şekil 12).



**Şekil 12. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ Meme Kanseri Hücreleri Hattında Triptolid ve Metforminin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Gösterilmesi (\*\*p<0.01)**

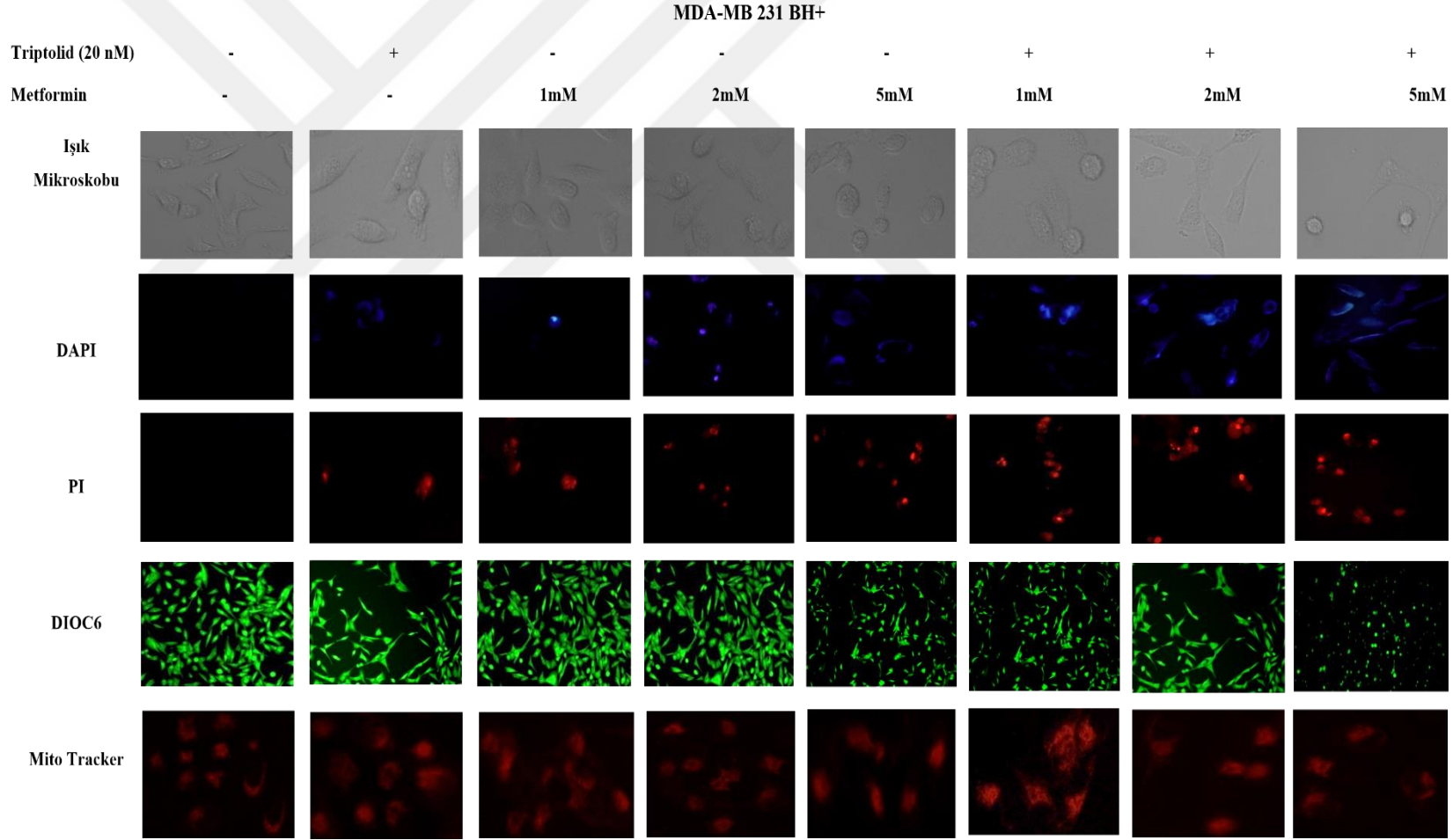
#### **4.1.4.MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Hatları Üzerinde Triptolid ve Metformin'in Doza Bağlı Olarak (0 Mm-5 Mm) DNA Kırıklarını, Mitokondri Membran Potansiyeli, Hücre Canlılığına etkisinin Gösterilmesi**

Triptolid ile Metformin'in kombine olarak MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ meme kanseri hücreleri ölümü, hücre canlılığının ve DNA kırıklarını belirlenmesi amacıyla doza bağlı olarak (0 -5 mM) floresan boyamaları analizi gerçekleştirilmektedir. Apoptotik ölüm ile karakterize edilen DNA kırıklarını gösteren DAPI boyamasında kombine uygulamasının doza bağlı olarak boyanan hücre sayısını sadece Triptolid uygulanan grubuna göre arttırdığı belirlenmiştir. Özellikle 2 mM ve 5 mM uygulamasında Triptolid uygulanan grubuna göre DNA kırıklarının büyük oranda arttığı gözlenmektedir. Ölü hücre membranlarından girerek DNA'ya bağlanan PI ile kombine uygulamasında doza bağlı olarak Triptolid uygulanan grubuna göre boyanan hücre sayısının arttığını gösterilmiştir. Canlı hücrenin mitokondrinin gösteren DIOC<sub>6</sub> boyamasında kombine uygulamasının doza bağlı olarak boyanan hücre sayısını Triptolid uygulanan grubuna göre azalttığını gösterilmiştir. Canlı hücrelerde mitokondri boyamak için Mito Tracker boyamasında kombine uygulanmasının doza bağlı olarak boyanan hücre sayısını Triptolid uygulanan grubuna göre azalttığını gösterilmiştir (Şekil 13) ve (Şekil 14).



Şekil 13. MDA-MB-231 doğal tip hücre hattı üzerinde triptolid ile metforminin uygulanmasını hücre ölümü ve Mitokondri Membran Potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyamalar ile gösterilmesi

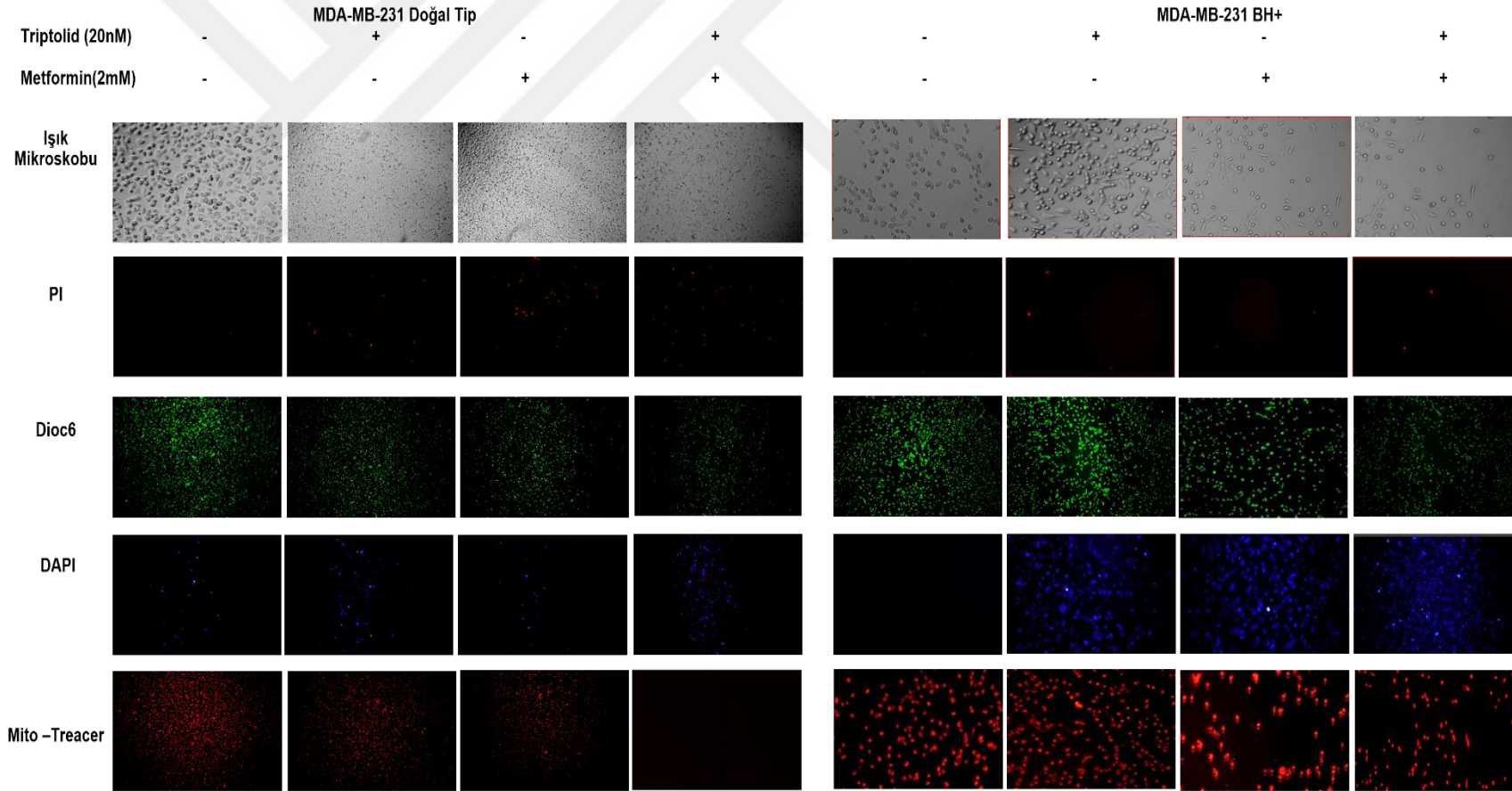




**Şekil 14. MDA-MB-231 BH+ hücre hattı üzerinde triptolid ile metforminin uygulanmasını hücre ölümü ve Mitokondri Membran Potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyamalar ile gösterilmesi**

#### **4.1.5. MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Hücreleri Üzerinde Triptolid ve Metformin Kombine'nin Doza Bağlı Olarak DNA Kırıklarını, Mitokondri Membran Potansiyeli, Hücre Canlılığına etkisinin Gösterilmesi**

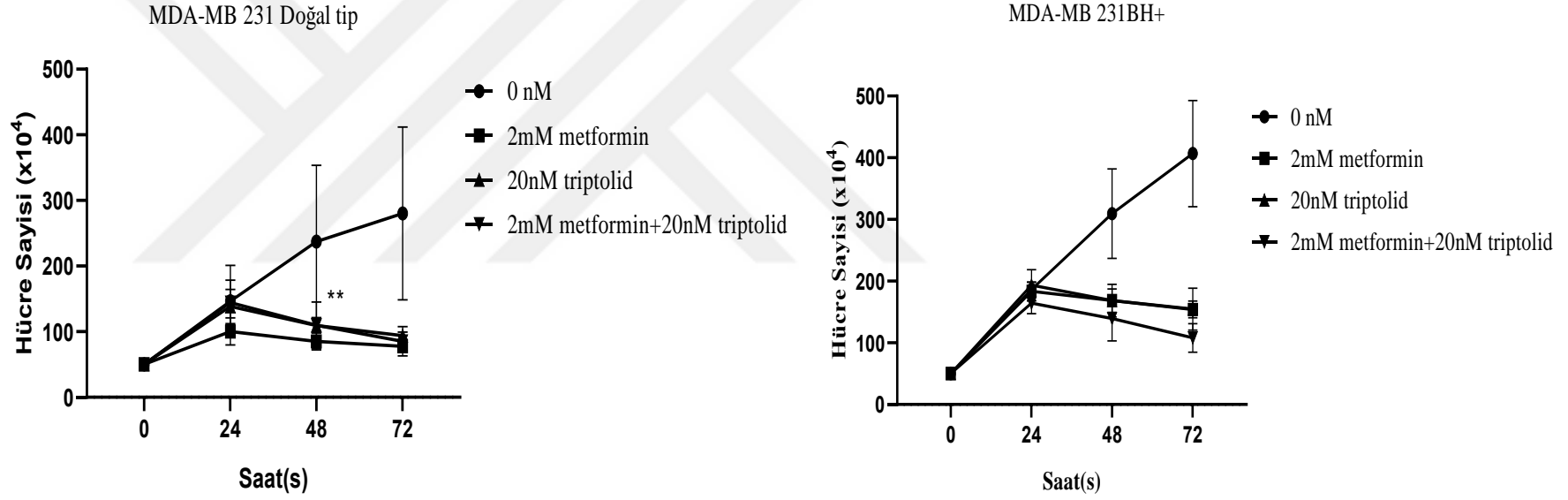
MDA-MB-231 doğal tip ve büyüme hormonu meme kanseri hücreler üzerinde 20 nM Triptolid ve 2 mM Metformin ve kombinenin doza bağlı olarak ölümü, hücre canlılığının ve DNA kırıklarını belirlenmesi floresan boyamaları analizi gerçekleştirilmektedir. Apoptotik ölümle karakter edilen DNA kırıklarını gösteren DAPI boyamasında kombine uygulanmasının boyanan hücre sayısını sadece Triptolid uygulanan grubuna göre önemli oranda arttırdığı gösterilmiştir. Ölü hücreler membranlarından girerek DNA'ya bağlanan PI ile uygulanmasında kombine uygulanmasının boyanan hücre sayısını sadece Triptolid uygulanan grubuna göre arttırdığı gösterilmiştir. Canlı hücreleri gösteren DIOC<sub>6</sub> ve Mito Tracker boyamalarında kombine uygulamasında triptolid uygulanan grubuna göre büyük oranda azalttığını gösterilmiştir (Şekil 14).



**Şekil 15. MDA-MB-231Doğal tip BH+ hücre hattı üzerinde triptolid ile metforminin uygulanmasını hücre ölümünü ve Mitokondri Membran Potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyamalar ile gösterilmesi**

#### **4.1.6. Triptolid ve Metformin'in Kombine Uygulanmasının MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Hücrelerinin Bölünmesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi Hücre Sağ Kalım Analizi ile Gösterilmesi**

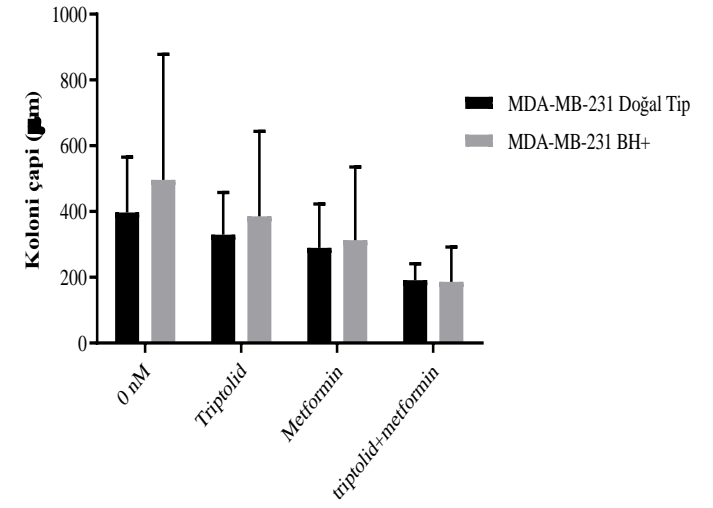
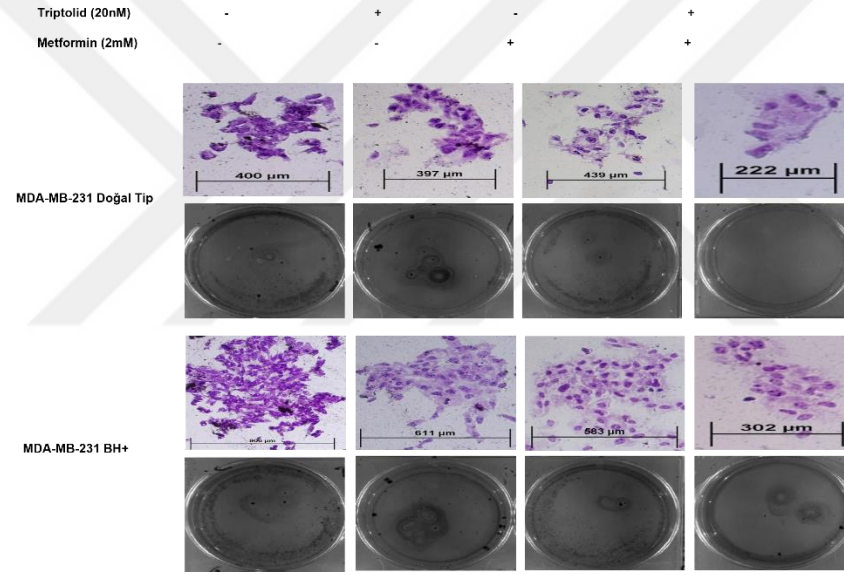
Triptolid ve metforminin MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücreleri hücre canlılığını belirlemek amacıyla zamana bağlı olarak hücre sağ kalım analizi gerçekleştirilmektedir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücreleri kontrol grubu 3.günde 300 bin hücreye çıktığını görülmüşken triptolid grubu 100 bine kadar düştüğü görülmüştür. Triptolid ile Metformin uygulanan hücreler ise 90 bin hücreye geri çektiğini görülmüştür. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücreleri kontrol grubu 3.günde 400 bin hücreye çıktığı 3.günde triptolid uygulandığında büyüme BH+ hücrelerinde 200 bin hücreye kadar azalttığını görülmüşken kombine uygulandığında 100 bine gerildiğini gösterilmiştir (Şekil 15).



**Şekil 16. Hücre Sağ kalım Analizi ile Zamana Bağlı MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Hücre hatları üzerinde Triptolid ve kombinenin Hücre Canlılığına Etkisinin Gösterilmesi (\*\*p<0.01)**

#### **4.3.1. Kombine İlaç Uygulamasının Koloni Oluşumu Üzerine Etkisinin MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Meme Kanseri Hücrelerinde Gösterilmesi**

MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında kombine uygulanmasını koloni oluşumu üzerine etkisini belirlemek amacı ile koloni formasyon tekniği gerçekleştirilmiştir. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hattında sadece triptolid uygulamasının kombine uygulana gruba kıyasla koloni oluşumunu tetiklediği saptanmıştır. Ayrıca kombine koloni oluşumu üzerine baskılayıcı etkisi hem doğal tip hem de büyüme hormonu meme kanser hücre hatlarında gösterilmiştir. Triptolid (20 nM) uygulaması tek başına koloni oluşumu üzerine azaltıcı etki göstermiş Metformin ile beraber uygulaması koloni oluşumu üzerine ciddi bir baskılayıcı etki göstererek hücre canlılığını azaltmasını gösterilmiştir (Şekil 16).

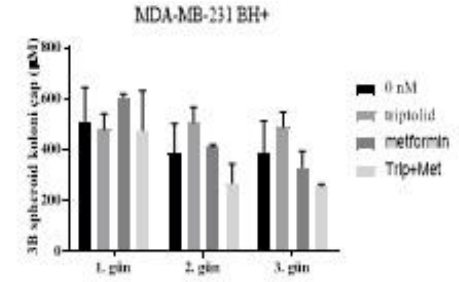
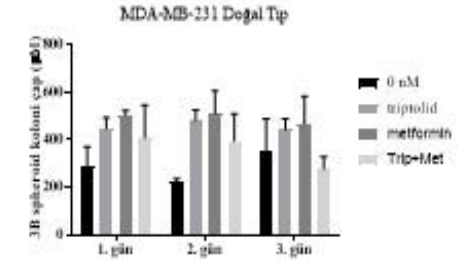
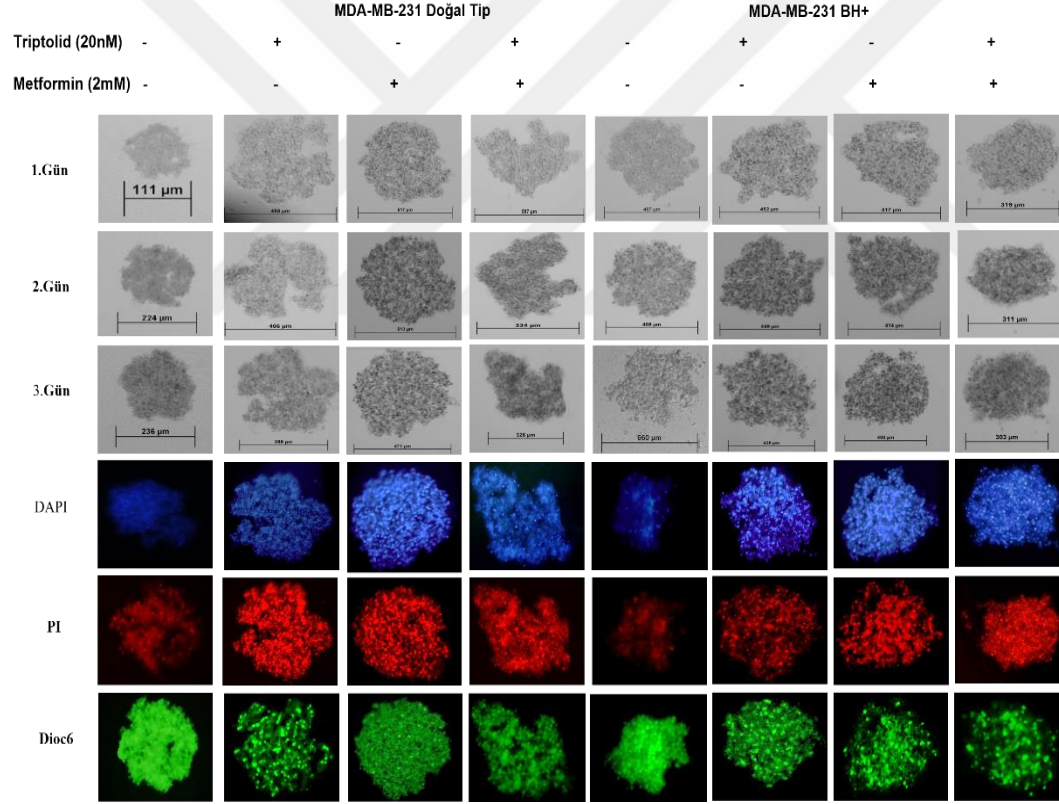


Şekil 17. Kombine Uygulamasının Koloni Oluşumu Üzerine Etkisinin MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Meme Kanseri Hücreleri

#### **4.3.2. Zamana Bağlı Kombine İlaç Uygulamasının MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisinin Asılı Damla Modeli Analizi ile Gösterilmesi**

Kombine ilaç uygulanmasının MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinin 3D hücre kültürü modellerinde koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi gerçekleştirilmiştir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücreleri asılı damla modeli tekniği ile sağlıklı kontrol hücrelerde 3 gün boyunca kolonilerin çapının  $534 \mu\text{m}$ 'a çıkmış olduğu tespit edilmiştir. Ancak 20 nM triptolid uygulaması ile 3. günde sağlıklı kontrol hücrelere kıyasla asılı damla modeli ile gerçekleştirilen 3D kültürlerde MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinin çapının  $396 \mu\text{m}$ 'a gerilediği tespit edilmiştir. Metformin 2 mM uygulanan hücrelerde ise koloni çapının 3. günün sonunda  $471 \mu\text{m}$  olduğu görülmüştür. Ancak hem triptolid hem de metforminin beraber uygulandığı durumda 3. günün sonunda MDA-MB-231 doğal tip hücrelerin çapının  $326 \mu\text{m}$ 'a ulaşmış olduğu görülse de ikili ilaç uygulamasının koloni oluşumunu dağıttığı ve hücreleri ölüme yönlendirdiği tespit edilmiştir. Aynı model sistem otokrin BH anlatımı kazandırılmış MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde incelendiğinde; sağlıklı kontrol hücrelerde 3. günün sonunda koloni çapının 111'den  $236 \mu\text{M}$ 'a çıktığı gözlemlenmiştir. Ancak 20nM triptolid uygulaması ile bu etkinin 2. günden gerilediği tespit edilmiştir. Metformin 2 mM uygulanan hücrelerde ise koloni çapının 3. günün sonunda  $400 \mu\text{M}$ 'a ulaştığı görülmüştür. Ancak hem triptolid hem de metforminin beraber uygulandığı durumda ise 3. günün sonunda MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerin çapının  $303 \mu\text{M}$ 'a ulaşmış olduğu görülse de ikili ilaç uygulamasının koloni oluşumunu dağıttığı ve hücreleri ölüme yönlendirdiği tespit edilmiştir. 3. gün sonunda triptolid uygulaması MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde kolonilerin büyüklüklerine azaltıcı yönde etki yaparken otokrin BH anlatımı kazandırılmış hücreler triptolid'e karşı direnç mekanizmasını aktive ettiği için koloni çapını  $436 \mu\text{M}$ 'a çıkardığı gösterilmiştir (Şekil 17).

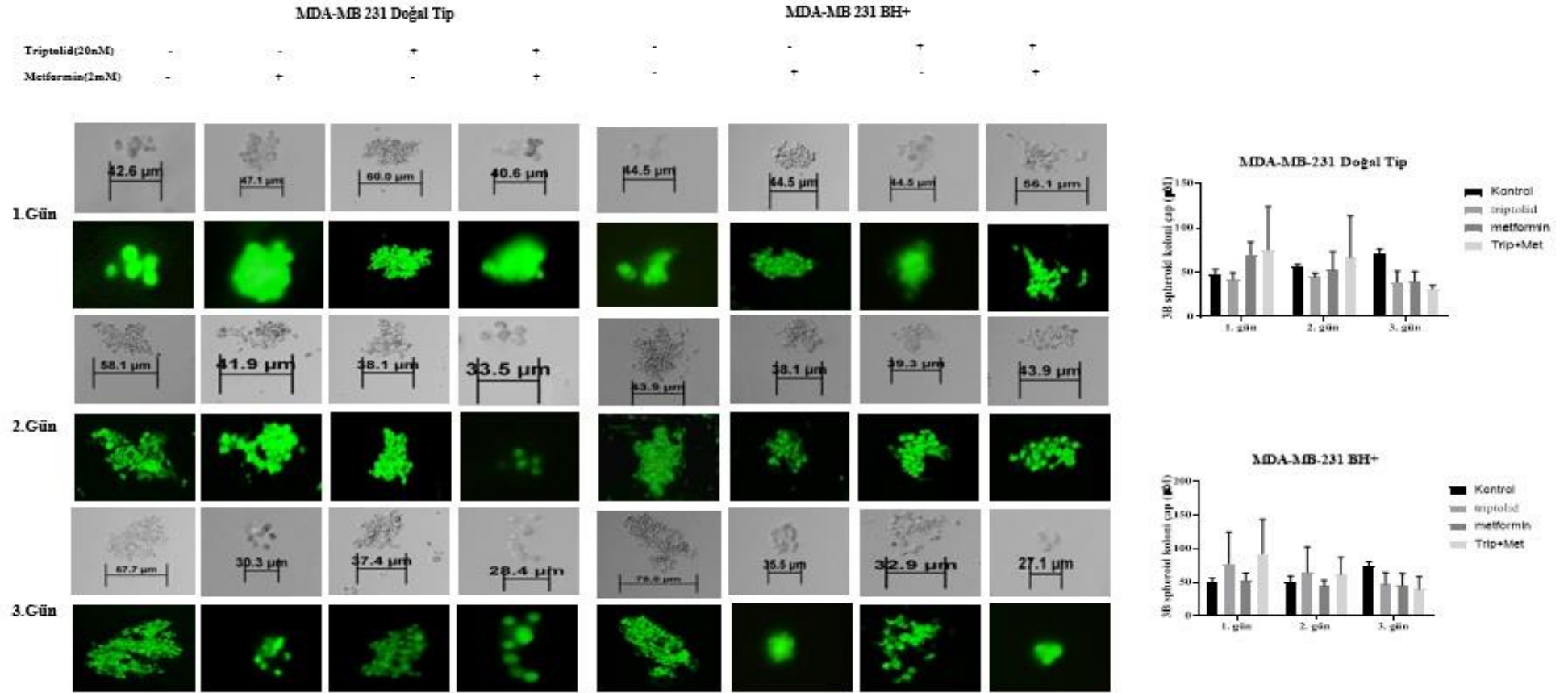




Şekil 18. Zamana Bağlı Kombine Uygulamasının MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisinin Asılı Damla Modeli Analizi ile Gösterilmesi

#### **4.4.2. Zamana Bağlı Kombine Uygulamasının MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Meme Kanseri Hücresi Üzerine Etkisinin Yumuşak Agar ile koloni oluşumu Gösterilmesi**

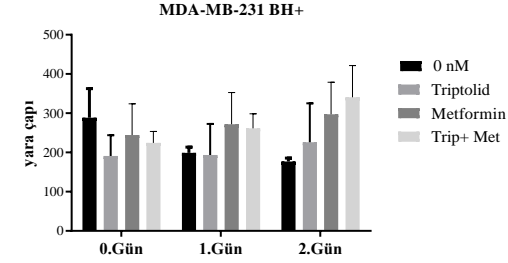
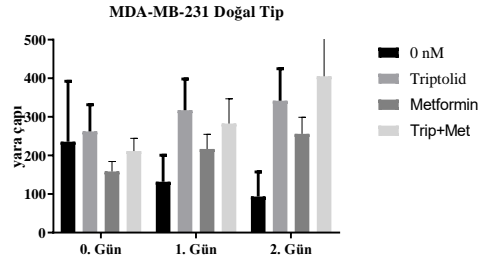
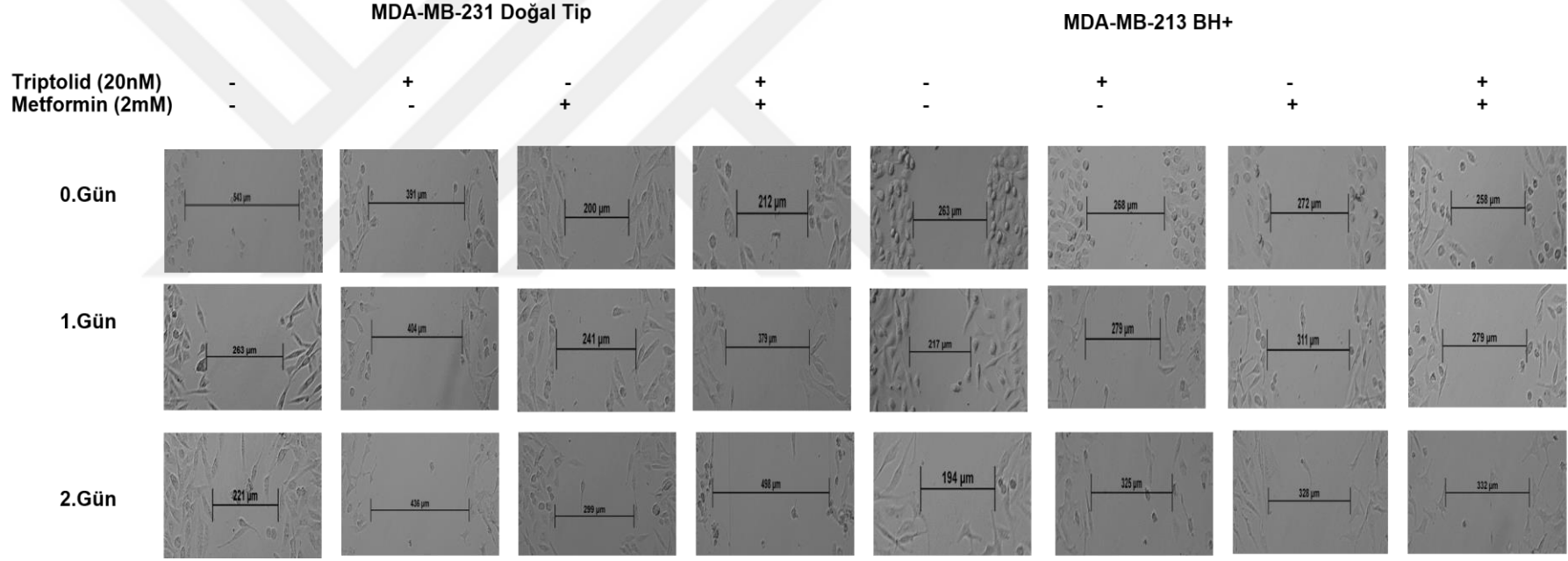
MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında kombinelenin agar ortamda koloni oluşumu üzerine etkisini belirlemek amacıyla yumuşak agar koloni formasyon tekniği gerçekleştirilmiştir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücreleri kontrol grubunda 3.günün sonunda koloninin çapının 67.7  $\mu\text{M}$ 'a ulaştığını görülmüştür. (20 nM) Triptolid uygulanan hücreleri ise koloninin çapının 30.3  $\mu\text{M}$ 'a gerilediğini gösterilmişken (20 nM) triptolid ile beraber (2 mM) metformin uygulandığında koloninin çapının 28.4  $\mu\text{M}$ 'a gerildiğini görülmüştür. Bununla birlikte MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücreleri kontrol grubunda 3.günde 78.9  $\mu\text{M}$ 'a çıktığını görülmüştür. (20 nM) triptolid uygulanan hücreleri oluşumunu 35.5  $\mu\text{M}$ 'a tetiklediği saptanmıştır. (20 nM) triptolid ile birlikte (2 mM) metformin uygulandığında 27.1  $\mu\text{M}$ 'a gerildiğini gösterilmiştir (şekil 18).



Şekil 19. Zamana Bağlı Kombine Uygulanmasının MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisinin A Yumuşak Agar Koloni Oluşumu Deneyi ile Gösterilmesi

#### **4.5.1. Zamana Bağlı Kombine İlaç Uygulamasının MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisinin yara iyileşme Modeli Analizi ile Gösterilmesi**

MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde yara iyileşme potansiyeli üzerine etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücreleri yara deneyi ile sağlıklı kontrol hücrelerde 3 gün boyunca yara çapının 317'den 152  $\mu\text{m}$ 'a gerilediğini tespit edilmiştir. Triptolid 20 nM uygulana hücrelerde yara çapının 3. günde 413  $\mu\text{m}$ 'a ulaşmış olduğu görülmüştür. Metformin 2mM uygulanan hücrelerde ise yara çapının 3.günde 299  $\mu\text{m}$ 'a ulaşmış olduğu görülmüştür. Ancak hem 20 nM triptolid hem de 2 mM metforminin beraber uygulandığı durumda 3.günde 513  $\mu\text{m}$ 'a ulaştığını görülmüştür. MDA-MB-231 büyüme hormonu meme kanseri hücreleri yara deneyi ile sağlıklı kontrol hücrelerde 3 gün boyunca yara çapının 172  $\mu\text{m}$ 'a gerilediğini tespit edilmiştir. Triptolid 20 nM uygulana hücrelerde yara çapının 3. günde 325  $\mu\text{m}$ 'a ulaşmış olduğu görülmüştür. Metformin 2mM uygulanan hücrelerde ise yara çapının 3.günde 421  $\mu\text{m}$ 'a ulaşmış olduğu görülmüştür. Ancak hem 20 nM triptolid hem de 2 mM metforminin beraber uygulandığı durumda 3.günde 485  $\mu\text{m}$ 'a ulaştığını görülmüştür (Şekil 19).



**Şekil 20. Zamana Bağlı Kombine Uygulamasının MDA-MB-231 Doğal Tip ve Büyüme Hormonu Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisinin yara iyileşme Modeli Analizi ile Gösterilmesi**

#### **4.6.1. MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Meme Kanseri Hücre Hattında Triptolid ve Metforminin Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerinde Etkisinin Zamana Bağlı Gösterilmesi**

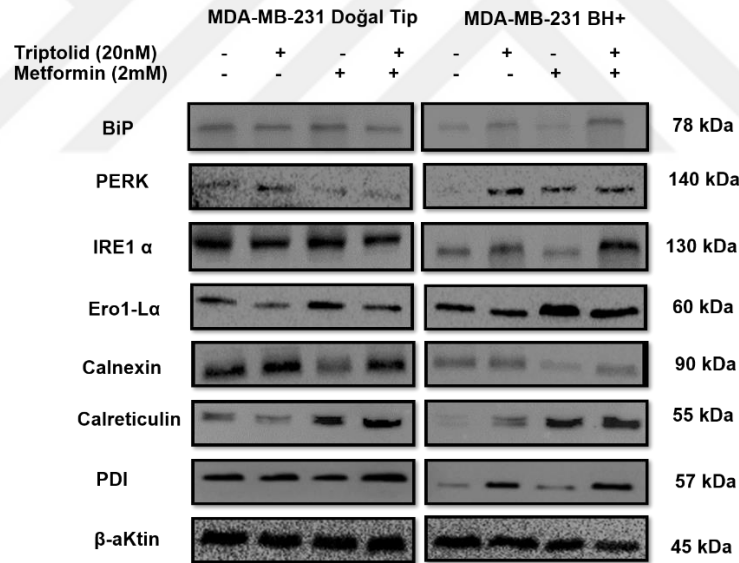
Triptolid ve metforminin MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında ER stres üzerine etkisini belirlemek amacıyla immünoiblotlama tekniği kullanılmıştır. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücre hattında ER stres anahtarı olan PERK ve BiP'in anlatımı 24 saat triptolid (20 nM) uygulamasıyla kontrole göre bir artış göstermemiştir. BiP'in anlatımı 24 saat triptolid (20 nM) uygulanmasıyla kontrole göre bir artış göstermişken triptolid (20 nM) ile birlikte (2mM) metformin uygulandığında triptolide bu etkiyi geri çekilmiştir. Bununla birlikte MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücre hattında ER stres anahtarı olan BiP'in anlatımı 24 saat triptolid (20 nM) uygulamasıyla kontrole göre bir artış göstermişken triptolid (20 nM) ile birlikte Metformin (2 mM) uygulandığında sadece triptolide göre önemli bir artış göstermiştir. Ancak MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücre hattında ER stres anahtarı olan PERK'in anlatımı 24 saat triptolid (20 nM) uygulamasıyla kontrole göre artış göstermiştir. Triptolid ile metformin uygulandığında bu etki geri çekilmiştir. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücre hattında PERK'in anlatımı 24 saat triptolid (20 nM) uygulamasıyla kontrole göre bir artış göstermişken triptolid (20 nM) ile metformin (2 mM) birlikte uygulanmasıyla triptolide göre önemli bir değişiklik göstermemiştir.

MDA-MB-231 doğal tip kanser hücreleri 24 saat triptolid (20 nM) uygulandığında calnexin anlatımını kontrole göre arttırdığını görülmüşken kombininin uygulanmasıyla bu etkiyi geri çekildiğini görülmüştür. MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde Canlexin anlatımını kombininin uygulanması triptolid uygulanan hücrelere göre bir değişik göstermemiştir.

IRE1 $\alpha$ , ER'nin yeni sentezlenmiş ve katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerini parçalama kapasitesini yükselten bileşenleri düzenleyen proksimal sensör görevi görmektedir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde 24 saat triptolid (20 nM) uygulandığında IRE1 $\alpha$ 'in anlatımı kontrole göre bir artış göstermemesine rağmen triptolid ile metformin sadece triptolid uygulandığında bir azalma göstermiştir. Ancak MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücreleri IRE1 $\alpha$ 'in anlatımı triptolidin uygulanmasıyla kontrole göre önemli bir artış görülmüşken triptolid (20 nM) ve metformin (2 mM) uygulanmasıyla sadece triptolide göre önemli bir artış göstermiştir.

Calreticulin yanlış katlanmış proteinlere bağlanır ve endoplazmik retikulumdan Golgi aparatına verilmesini önlemektedir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde (20 nM) triptolid uygulanan hücreler Calreticulin anlatımı kontrole göre önemli bir değişiklik görülmemişken (20 nM) triptolid ile metformin uygulandığında tek başına triptolid uygulanan hücrelere göre anlamlı bir artış gösterilmiştir. Bununla birlikte MDA-MB-231 büyüme hormonu meme kanseri hücrelerinde benzer bir sonuç görülmüştür.

PDI, katlanmamış ve yanlış katlanmış protein cevabı (UPR) sırasında PERK'nin temel bir redoks duyarlı aktivatörü olarak görev almaktadır. MDA-MB-231 doğal tip ve büyüme hormonu meme kanseri hücreleri triptolid (20 nM) ve metformin (2mM) uygulamasıyla PDI 'in anlatımı kontrole ve triptolid uygulanan hücrelere göre bir değişiklik göstermemişken metformin ile triptolid uygulanmasıyla bir artış görülmüştür. Bununla birlikte, MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücreleri sadece triptolid uygulanmasıyla bir artış görülmüşken triptolid ile metformin uygulanması triptolide göre önemli bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 20).

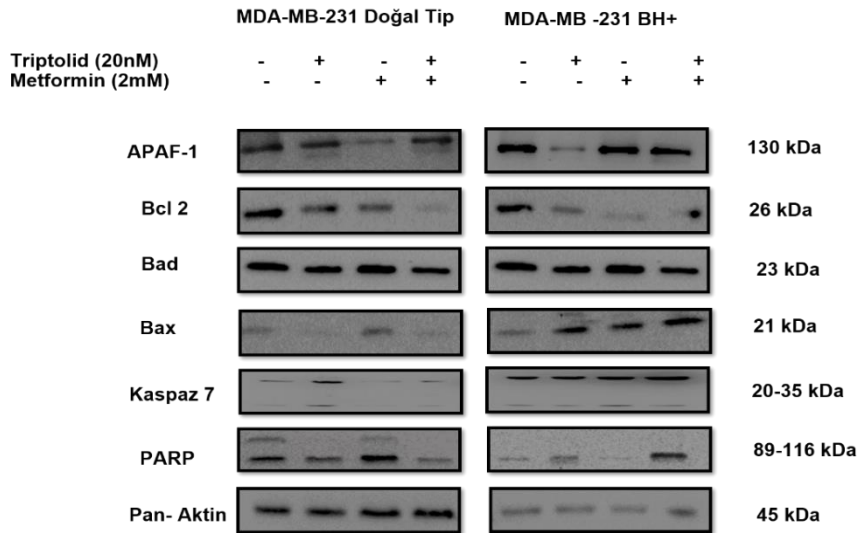


Şekil 21 MDA-MB-231 doğal tip ve büyüme hormonu meme kanseri hücre hattında triptolid ve metforminin endoplazmik retikulum stresi üzerinde etkisinin zamana bağlı gösterilmesi.

Proapoptotik üyeler Bad, kaspaz ve APAF-1 gibi serbestleşmesini uyarmakta ve mitokondri zarının geçiş porlarının açıklığını değiştirerek sitokrom-c'yi serbestleştirmekte ve böylece apoptozu etkilenmektedir. Bad'ın anlatımı MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde triptolid uygulanan hücreleri kontrole göre Bad anlatımını anlamlı bir artış gözlenmemiştir.

MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücreleri tek başına triptolid uygulanan hücreleri kontrole göre kaspazın anlatımında önemli bir artış göstermemişken ikili ilaç uygulanan hücreleri sadece triptolid uygulanan hücrelere göre anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. APAF-1'in anlatımı ise MDA-MB231 doğal tip meme kanseri hücreleri tek başına triptolid uygulan hücrelerinde kontrole göre değişiklik gözlemlenmemiş. İkili ilaç uygulanan hücrelerin APAF-1'nin anlatımı sadece triptolid uygulanan hücrelere göre önemli bir artış göstermiştir. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde triptolid uygulanan hücreleri, ikili ilaç uygulanan grubu sadece triptolid uygulanan hücrelere göre anlamlı bir artış göstermiştir.

Antiapoptik üyeleri Bcl-2 gibi, Bcl-2'nin MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde sadece triptolid uygulandığında anlatımı indüklenirken triptolid ile metformin kombin uygulandığında bu etkiyi geri çekilmiştir. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde de Bcl-2 anlatımı için yakın bir etki görülmüştür. PARP (ADP-riboz) polimeraz, DNA onarımı, genomik stabilite ve apoptozunda yer alan bir proteindir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde PARP'ın anlatımında önemli bir sonuç alınmamışken BH+ hücrelerinde triptolid uygulanan hücreleri kontrol grubuna göre artış gözlemlenmiştir. Bununla ilgili olarak PARP'ın anlatımı triptolid grubu ikili ilaç uygulanan grubuna göre önemli bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 21).

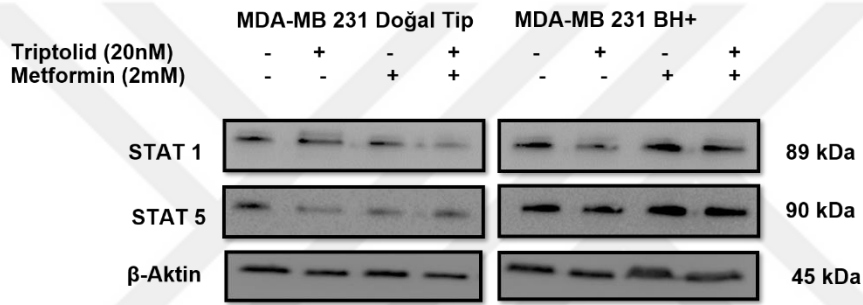


**Şekil 22. MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Meme Kanseri Hücre Hatlarında Triptolid ve Metforminin Apoptotik Proteinlerin Anlatımı Üzerine Etkisinin Gösterilmesi**



Janus kinaz (JAK) sinyal transdüseri ve transkripsiyon (STAT) yolağının aktivatörü, hücre canlılığı ve sağ kalımında önemli roller oynamaktadır [126]. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde STAT 1'in anlatımı triptolid uygulanan hücrelerinde kontrol grubuna göre bir artış gözlemlenmiştir. Triptolid ile metformin uygulandığında STAT1'in anlatımı triptolid uygulanan hücrelere göre bir azalma gösterdiğini görülmüştür.

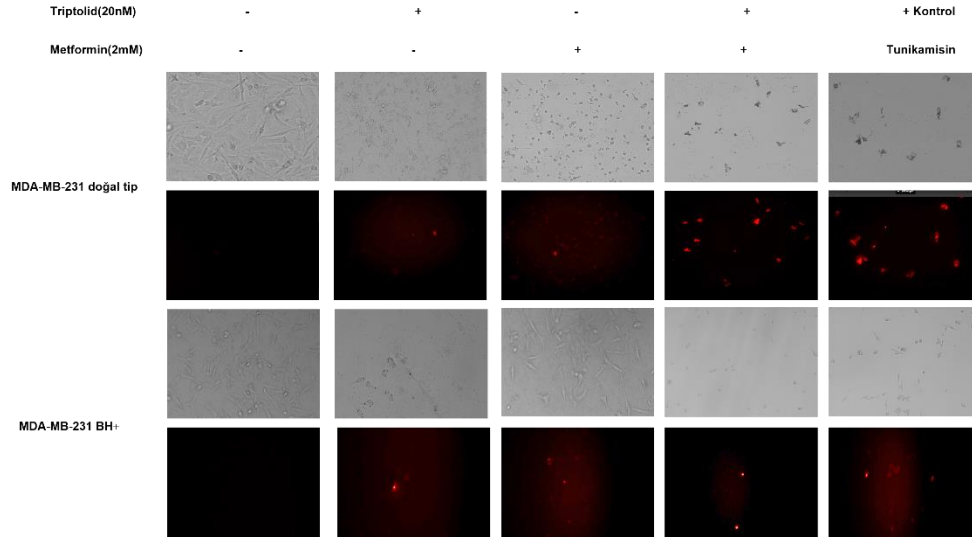
MDA-MB-231BH+ meme kanseri hücrelerinde STAT1'in anlatımı ikili ilaç uygulanan hücreleri triptolid grubuna göre bir artış görülmüştür. STAT5'in anlatımına bakıldığında doğal tipte kombinenin uygulanmasıyla triptolid grubuna göre artış göstermiştir. BH+ hücrelerinde ikili ilacın uygulanan hücreleri triptolid grubuna göre önemli bir artış görülmüştür (Şekil 22).



**Şekil 23. MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Meme Kanseri Hücre Hatlarında Triptolid ve Metforminin Jak-STAT Yolların Gösterilmesi.**

#### 4.6.2.CHOP promotör (-649/+136)-pmCherry Plazmit Transfeksiyon

MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerine m-cherry CHOP plazmiti transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmit CHOP promotör (-649/+136)-pmCherry promotörü takılmış olan bu plazmiti hücrelerde ER stresi göstermektedir. Plazmiti içine alan hücrelerde ER strese sokulduğunda kırmızı bir ışığa göstermektedir. Pozitif kontrol olarak hücrelere tunikamisini uygulanmaktadır. Tunikamisini, ER (endoplazmik retikulum) stresi indüklemek ve hücre ölümünü indüklemek için katlanmamış protein cevabı (UPR) aktive etmek üzere yaygın olarak kullanılan bir antibiyotiktir. Triptolid uygulanan MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ kanser hücrelerindeki ışığa kontrole göre artırılmıştır. Ayrıca MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ kanser hücrelerine triptolid ile birlikte metformin uygulandığında ışığa triptolid uygulanan hücrelere göre önemli bir artış göstermiştir (Şekil 21).



**Şekil 24. MDA-MB-231Doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde CHOP aktivasyonu floresan gösterilmesi.**

#### **4.6.3. MDA-MB-231doğal tip ve BH+ Meme Kanseri Hücrelerinde Metformin ile Triptolid Uygulamasının Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin Gösterilmesi**

MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde (20 nM) triptolid ile (2 mM) metforminin uygulanmasıyla hücre döngüsü gösterilmiştir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücre hatlarında triptolid (20 nM) uygulanmasıyla S popülasyonunda kontrole göre anlamlı artış göstermiştir. MDA-MB-231meme kanseri BH+ hücre hatlarında (20 nM) triptolid popülasyonunda ise yine S popülasyonunda anlamlı bir artış gösterilmiştir. Triptolid ile her iki hücre hatlarında S popülasyonunun artışı hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu sonuçlar doğrultusunda triptolid'in hem MDA-MB-231 doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü üzerinde S fazını durdurucu etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bununla birlikte G2/M popülasyonunda ise düşüşe sebep olmaktadır. Metformin (2 mM) ve triptolid (20 nM) uygulanmasının MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında G1 popülasyonunda kontrole göre anlamlı bir artış göstermiştir. Metforminin (2 mM) ve triptolid ile birlikte uygulanması sonucunda ise MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde %1,6 SubG1 popülasyonu, %58,1 G1 ve 16.6% G2/M popülasyonu görülürken, BH+ hücrelerinde %1,4 SubG1 popülasyonu ve %57,2 G1 ve G2/M %28,1 popülasyonunun varlığı belirlenmiştir (Şekil 24).



## BÖLÜM V

### 1.1 TARTIŞMA

Meme kanseri, dünya çapında kadınlarda en sık görülen kanser tipidir [127]. Meme kanseri genellikle lobüllerde (süt bezleri) veya lobları meme ucuna bağlayan kanallarda başlamaktadır [128]. Teşhis edilen meme kanserinin çoğu, hormona bağlı olduğunu tespit edilmektedir [49]. Bu hormonların meme kanserlerinin büyümesini yönlendiren bir sebep olduğu görülmektedir [129].

Büyüme hormonu, plasental laktojen ve prolaktin ile beraber peptid hormonu ailesine aittir. Bu hormonlar, meme kanseri gelişimi ve büyümesinde etki edebilmektedir [130]. Fresno ve arkadaşlarının 2000 yılında yapılan çalışmaya göre Prolactin Janus kinaz (JAK) / Sinyal transdüseri ve transkripsiyon (STAT) ve Ras-Raf-mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yollarını etkilediği görülmüştür [131]. Meme kanserinde BH+ rolünü araştırmak üzere bir klinik çalışmada 48 meme kanserli hastayı analiz edilmiştir. Bu analizin sonucu büyüme hormonu ve reseptörünü meme kanserinde normal meme hücreleriyle kıyaslatıldığında yukarı doğru indüklediği görülmüştür [132]. Bununla ilgili olarak birçok büyüme faktörünün (örneğin, VEGF) ve hormonların (östrojen) meme kanserinin gelişimini etkilediği bilinmektedir. Ayrıca meme kanserli hastaların serumunda büyüme hormonu (BH) ile birlikte reseptörü (GHR) de artış gösterilmiştir [6]. Otokrin büyüme hormonu üzerine yapılan bir çalışmada tümör büyümesini, hücre proliferasyonu, metastazı ve sürekli direnç gösterdiği görülmüştür [7]. BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücreleri (MCF10) invazyon ve metastazın indüklendiği ispat edilmiştir [8]. Daha önce laboratuvarımızda yapılan araştırmalar sonucunda, BH+ T47D meme kanseri hücrelerinde kurkumini kullanılarak NF- $\kappa$ B sinyal yolu aktive edilmiş ve böylelikle, otokrin BH direncini önlediği ispat edilmiştir [63]. BH+ MCF-7, MDA -MB-453 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde zamana bağlı olarak kurkumin uygulanmasıyla hücrelerin ilaca karşı direnci azaltılmıştır [7]. Çin'de 2012 yılında yapılan bir çalışmada BH+ MDA-MB-435S ve T47D kanser hücrelerinde büyüme hormonunun IR ile birlikte radyoterapide kullanılarak arttırıldığı ispat edilmiştir [64]. 2019 yılında BH+ ve IGF-1+ MCF-7 meme kanseri hücrelerinde kemoterapötik ilaçlara direnç gösterdiğini ve ölüm oranını arttırdığını ispat edilmiştir [65]. Chiesa ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmaya göre hGH+ hepatosellüler kanser hücrelerinde hGH+ hücelere göre daha hızlı çoğalmasını indüklediği görülmüşken,

hGH+ antagonizmi kullanarak bu çoğalmayı inhibe ettiği ispat edilmiştir [66]. 2008 yılında yapılan bir çalışmaya göre MCF-7 BH+ hücrelerinde MAPK sinyal yolağı aktive ettiğini ve JAK/STAT sinyal yolağını inhibe ettiği görülmüştür [67]. MCF-7 Meme tümörlerindeki BH ifadesini, tümörün büyümesini, apoptozu azalttığını ve hücre çoğalmasını indüklediği görülmüştür [68]. Karmal ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmaya göre, MCF-7 meme kanseri hücrelerine eksojen olarak ilave edilmiş ve hGH apoptozu inhibe edildiği görülmüştür [69]. 2018 yılında VEGFA (vasküler endotel büyüme faktörü A) MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmaya göre *in vivo* olarak triptolid uygulanmasıyla kontrole göre tümörün baskıladığı ispat edilmiştir [70]. Bununla ilgili olarak BH+ meme kanseri hücrelerinin bazı kemoterapötik ajanlara karşı dirençli olduğu görülmüştür. Tamoksifen [62], doksorubisin [133] ve mitomisin C [134] gibi değişik kemoterapötik ilaçlara karşı olan direncin otokrin BH anlatımından kaynaklı olduğu meme kanseri *in vitro* modellerinde tespit edilmiştir. Buna karşı olarak meme kanseri üzerine yapılan bazı çalışmalar büyüme hormon ve reseptörü varlığı meme kanserin önlenmesi ve tedavi için yararlı bir rolü olabileceğini düşünülmüştür [135]. Hipofiz hormonları ve reseptörleri, meme kanserinde tek başlarına veya farklı tedavi yöntemleri ile birlikte önemli bir terapötik rol oynadığını düşünülmüştür [49]. Ancak BH, meme ve kolon kanserinde tümör büyümesini arttırdığı kanıtlanmıştır [136]. Otokrin BH karsinom hücre proliferasyonunu, sağ kalımını, büyümeyi ve göçmeyi / invazyonu arttırabildiği görülmüştür [137]. Hormonlar, meme kanseri gelişiminde ve büyümesinde önemli bir etken olduğu bilinmiştir [138-139].

Bu tezdeki amacımız otokrin BH alımını kazandırılmış meme kanseri hücrelerindeki ilaç direncinin ER stres apoptotik ölüm sürecinde rol alan hücre sinyalleriyle ilişkisini göstermektir. Bu kapsamda öncelikle literatürdeki bilgiler ışığında ER stres sürecinin modellenebilmesi için zamana bağlı triptolid uygulamasının MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerine etkisi gösterilmesidir. Tez çalışması sonucuna göre otokrin BH anlatımı yapan MDA-MB-231 hücrelerinde triptolid hücre canlılığı üzerine ket vurucu etkisi doğal tipe kıyasla 24 saatten sonra belirgin olarak görülmüştür.

Anti kanser ilaçların tersine, bitki kaynaklı ilaçlar, yan etkilerin azaldığını göstermiş ve kombinasyon ve ilaç tedavisine bağlı ters terapi direncindeki etkinliği artış göstermiştir [119-120]. Bununla ilgili olarak, Çin otunun kök ekstraktından izole edilen dippen tri-epoksit olan triptolid, Celastraceae ailesinin *Tripterygium wilfordii*'sinin en az yan etkileri olan etkili bir anti kanser ilacı olarak önemi

aratılmıştır. Triptolid, Çin'de, romatoid artrit, lupus, Behçet hastalığı, sedef hastalığı ve merkez sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır [140]. Triptolidin *in vitro* pankreatik kanser hücrelerinin büyümesini inhibe etmesi ve *in vivo* tümör büyümesini önlediği tespit edilmiştir [141]. Çin'de Multipl myeloma (MM) üzerinde yapılan araştırmada Triptolid, RIZ1'in protein ekspresyonunu arttırmıştır. Böylece hücre proliferasyonu inhibe etmiştir. Ayrıca, U266 hücrelerinde kaspaz bağımlı apoptozu indüklediği gösterilmiştir [142]. Pankreas kanseri hücreleri üzerinde *in vivo* yapılan bir çalışmada triptolid apoptotik ve otofajik yollarını indükleyerek hücre ölümüne gittiği ispat edilmiştir [143]. Triptolid'in, G1/S fazında ESCC hücre döngüsü durmasını, siklin D1-CDK4/6 düzenlemesi ve kaspazların aktivasyonu yoluyla apoptozu indüklediği gözlemlenmiştir. Ek olarak, triptolidin sırasıyla p53 ve MAPK / ERK sinyal yolu ile hücre apoptozisini ve metastazını düzenlediğini ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte, triptolid'in ESCC üzerindeki inhibitör etkisi, fare ksenograft modelinde doğrulanmıştır [144]. İnsan meme kanseri ER $\alpha$ -pozitif MCF-7 hücreleri ve ER $\alpha$ -negatif MDA-MB-231 hücrelerinde Triptolid antikanser mekanizmalarını, insan meme kanseri hücrelerine ve özellikle östrojen reseptör- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) kaynaklı sinyal yolunun tutulumuna karşı araştırılmıştır [145]. MDA-MB-231 hücreler üzerine yapılan bir çalışmada MDA-MB-231 hücrelerinde triptolid uygulanması ile kaspaz-3 aktivasyonu, ilişkili apoptotik yolu otofaji sinyal yollarını modüle ederek hücre ölümünü teşvik ettiği ispat edilmiştir. Bu nedenle, MDA-MB-231 hücrelerinde, apoptozis ve otofaji yolları arasındaki farklılıklar, triptolid kaynaklı hücre ölümünde önemli bir rol oynamaktadır [146]. Birçok kanserde koruyucu bir mekanizma olan artan otofaji yolağı süreci, uygun kemoterapötik ajanların müdahalesiyle proapoptotik bir olay olarak yeniden programlanabilmektedir. Triptolid'in TNBC hücre proliferasyonunu teşvik eden ve hücre ölümünü / apoptozu önleyen yollar üzerindeki etkisini değerlendirmek için daha fazla hücre bazlı, *in vivo* çalışmalar terapötik etkinliği gösterilmiştir [83]. 2014 yılında yapılan bir çalışmaya göre ER $\alpha$ + MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde triptolid uygulanması ERK1/2 fosforilasyonu inhibe ederek, hücrelerin büyümesini inhibe ettiği ispat edilmiştir [145]. Başka bir çalışmada MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde triptolidin uygulanmasıyla PERK, eIF2 $\alpha$  anlatımı ve ROS oluşumu arttırdığı görülmüştür [84]. Triptolid, MCF-7 meme kanseri hücreleri fokal adezyon kinazı yoluyla, doza bağlı olarak hücrenin büyümesini azalttığı ispat edilmiştir [85]. Farklı kanser hücre hatlarında triptolidin uygulanması apoptozu p53 yolu aktive

ederek teşvik ettiği kanıtlanmıştır [86]. 2018 yılında yapılan bir çalışmada triptolid uygulanması kanser hücrelerindeki DNA hasarına neden olmuştur [87]. Başka bir çalışmada farklı doğal ürünlerden izole edilen ilaçları triptolid dahil olmak üzere kullanarak meme kanseri hücreleri çoğalması, gösterdiği direnci ve metastazı büyük ölçüde inhibe ettiği ispat edilmiştir [88]. 2018 yılında MCF-7 meme kanseri hücreleri triptolid uygulanması Erk1/2 aktifleşerek otofojiyi ve apoptozu indüklemiştir [80]. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A kontrol olarak kullanarak spesifik olmayan MKP-1 inhibitörü triptolid ile tedavi ederek meme kanseri hücre büyümesini azaltmıştır [89]. MDA-MB-231, BT-474 ve MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine triptolid uygulanmasıyla Wnt /  $\beta$ -katenin sinyal yolu ile apoptozu teşvik edilmiştir [90].

Farelerden elde edilmiş 4T1 meme kanseri hücreleri ve *in-vivo* olarak triptolid uygulanması apoptozu indüklemiş ve hücre çoğalmasını azaltmıştır [91]. 2014 yılında yapılan bir çalışmada BALB/ c fare modelinde triptolid uygulanması mock ilacına göre tümör büyümesini önemli derecede inhibe ettiği görülmüştür [92]. Triptolid, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde NF $\kappa$ B aktive ederek PLD1 anlatımının arttığı ve hücre çoğalmasını inhibe ettiği görülmüştür [93]. Prostat kanseri ve meme kanserinde triptolid uygulanması apoptozu indüklediği ispat edilmiştir [79]. 1991 yılında yapılan bir çalışmada koloni, meme ve mide kanserinde koloni oluşum potansiyelinin azalttığı görülmüştür [94]. Triptolid tedavisi akciğer [9], prostat [147], mide [79], pankreas [148], yumurtalık [149] ve lösemi [150] tedavisinde etkili olduğunu gösterilmiştir. 2012 yılında yapılmış bir çalışmada triptolid tedavisinin uygulanmasıyla üç farklı maligan hücrelerinde MDA-MB-231, BT-474 ve MCF7 cleaved kaspaz 3 ve kaspaz 9'ünde artış göstererek apoptozun indüklediğini kanıtlanmıştır [83]. MIA PaCA-2 ve S2-VP10 pankreas kanser hücrelerinde 24 saat 100 nM triptolid uygulandığında PERK-eIF2a eksenine ve Ire1 $\alpha$ -XBP1 bu iki farklı ER stres yolunu indüklediği görülmüştür [151]. MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerine (40 ng) triptolid uygulanan bir çalışmada zamana bağlı olarak endoplasmic reticulum stresine ve pro apoptozu bakıldığında triptolid grubunun IRE1 $\alpha$  ve BiP'in anlatımı 24 saatte kontrole göre önemli bir artış göstermişken, 48 saat benzer bir sonuç görülmüştür. Bununla birlikte Bax ve Bcl-x 'e bakıldığında Bax'in anlatımı 24 saat triptolid uygulanan grubu kontrole göre anlamlı bir artış göstermişken, 48 saat uygulanan grubu 24 saat uygulanan grubuna göre önemli bir artış göstermemiştir [84].Yapılan birkaç çalışmaya göre triptolid'in *in vivo* olarak yüksek dozla

kullanılması toksik olma ihtimali varmış [152] diye triptolid'in proformasını takviye etmek üzere triptolid ile birlikte bir ilaç daha uygulanmıştır [145].

Metformin (1,1-dimetil biguanid) hepatik glukoz çıkışını azaltarak ve insülin duyarlılığını artırarak etki edebilen bir ilaçtır [153]. Tip 2 diyabet tedavisinde çok yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Son zamanlarda potansiyel ve iyi bir anti kanser ajanı olarak daha fazla dikkat çekmiştir [154].

Hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalardan elde edilen laboratuvar sonuçları, metforminin apoptozu indüklediğini, bazı kanser hücrelerinde doza bağlı olarak tek başına metforminin kullanılması tümör büyümesini engellediğini göstermiştir. Bununla birlikte [131, 132, 133] klinik çalışmalar metformin kullanımının bazı kanserlerde ve kansere bağlı ölüm riskinde anlamlı bir azalma gösterdiği kanıtlanmıştır [156].

MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri, hiperglisemik ve normoglisemik ortamda metformin ile muamle edilmiştir. 25 ve 5 mM glukozlu ortamda zamana ve doza bağlı olarak metformin uygulanıp ve MTT testi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak Metformin, sadece normoglisemikte koşullarda MDA-MB-231 hücre büyümesini inhibe edilmiştir [4].

Endoplazmik retikulum (ER) stresi kanser hücrelerinde ilaca bağlı hücre apoptotik ölümü hücrelerinde büyük rol oynamaktadır. Endoplazmik retikulumunda katlanmamış proteinler birikmesiyle ya da ilaca maruz kaldığında katlanmamış protein cevabını (UPR) aktif halle gelmektedir. BiP, katlanmamış protein cevabını aktif halle gelmesinden sorumludur. PERK ise ER lümeninde yeni sentezlenmiş proteinlerin birikmesini önleyen eIF2a'yı fosforile ederek transkripsiyonu düzenlemektedir. IRE1, bazı pro-apoptotik proteinlerin artırmasını sağlamaktadır [157]. Yapılan birkaç araştırmaya göre meme karsinomu hücre hatları MCF-7, MDA-MB231, HS578T ve HCC1500 hücrelerinde BiP'in anlatımında artış görülmüştür [158].

Metformin, diabetes 2'in tedavisinde kullanılan standart bir ilaçtır. Metformin, hepatik glukoneogenezi azaltarak, plazmadaki glukozun konsantrasyonu azaltmaktadır [159]. 2005 yılında Metformini kullanan diabetik hastalarda kanser oranı %23'e kadar düştüğü görülmüştür. Araştırmalar *in vivo* ve *in vitro* olarak Metformin apoptoz, otofaji ve hücre döngüsü durmasını indüklediğini göstermiştir [160]. Metformin, glukozun sentezini önleyen ve insülin duyarlılığını arttıran bir ilaçtır [161].

2009 yılında, MD kanser merkezinde Metformin, diyabetli hastalarda pankreas hastalığı riskini azalttığı ortaya koyulmuştur [162]. Ayrıca Metforminin hücre



proliferasyonunu inhibe ettiğini, DNA hasarını edebildiğini ve hücre döngüsü tutuklamasını indüklediği ispat edilmiştir [163]. *In vivo* ve *in vitro* olarak Triptolid ile birlikte pek çok ilaç kombine edilmiştir. 2019 yılında *in vitro* olarak MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 meme kanseri hücrelerin üzerinde triptolid ile birlikte AG1024 uygulanmış apoptoz etkisine bakıldığında triptolidin anti kanser etkisinde AG1024 ile uygulandığında sadece triptolid uygulanana bir artış gösterilmiştir [152]. 2015 yılında triptolidin antikanser mekanizmasını araştırmak amacıyla farklı kanser hücrelerine triptolid ile tripterin *in vivo* ve *in vitro* olarak araştırılmış ve sonuç olarak triptolidi başka ilaçlar ile kombine olarak kullanarak kanser hastaları için umut verici bir seçeneği olduğu düşünülmüştür [164]. Fakat literatürde Metformin ile triptolidin kombine uygulanmasının BH+ meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisi incelenmemiştir. Ayrıca 2018 yılında yapılan bir çalışmada MDA-MB-231 hücrelerine triptolid'in uygulandığında hücrelerin popülasyonunda G1 fazında büyük bir azalma görülmüştür [146]. Laboratuvarımızda yapılan daha önceki çalışmada otokrin MDA-MB-453 BH+ hücrelerinde doza bağlı olarak triptolidin uygulanmasıyla hücre canlılığını azaltmıştır. 24 saat sonra 20 nM triptolidin uygulamasıyla BH+ hücrelerinin Bcl-2 ailesini eksprese edildiğini görülmüştür.

Birkaç çalışmada triptolidin antienflamatuar etkisine ek olarak *in vitro* çeşitli kanser hücrelerinin çoğalmamasının inhibe edebildiğini ve *in vivo* tümörün büyümesini engellediği görülmüştür [165]. Triptolid'in etkisine fare modelinde bakılmış ve sonuç olarak farelerdeki tümörlerin küçülmesine neden olmuştur [166]. Bununla birlikte Çin'de yapılan klinik çalışmalar triptolidin lösemide %87 ve mononükleozitler %71'e kadar azalttığı görülmüştür. Triptolid, kanserli hücelere karşı proapoptotik etkilere sahip bir ilaç olduğunu saptanmıştır [167]. SW480 ve Caco 2 kolon kanseri hücreleri hatlarında 100 nM triptolid 72 saat boyunca uygulanarak yara iyileşme deneyi yapılmış ve sonuç olarak kontrol grubu triptolid grubuna göre yaranın kapanması görülmüştür. Aynı çalışmada Facs Hücre Akış Sitometre PI Analizi yapılmış ve sonuç olarak hücre popülasyonunu G1 fazında inhibe edilmiştir [168]. Farklı çalışmada triptolidin pankreas kanseri hücre hatlarında GRP78'in ekspresyonunu baskılayarak ER stresini indüklediği ispat edilmiştir [151]. Bununla birlikte 2013 park ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Wnt /  $\beta$ -katenin sinyalini inhibe ederek kaspazı indüklediği görülmüştür [169]. 2018 yılında Triptolidin VEGFA anlatımı MCF7, MDAMB231 ve T47D meme kanseri hücreleri proliferasyonunu ihibe ve (ERK)1/2 aktivasyonu inhibe edildiği görülmüştür [170]. Ayrıca meme kanseri

hücrelerinde triptolidin kısa süreli bir şekilde uygulandığında (3 saat) Paclitaxel, Fluorouracil ve Mitomycin C gibi kemoterapi ilaçlarından özellikle Doxorubicinini anlamlı bir artış göstermiş ve sonuç olarak triptolidin farklı kemoterapi ilaçlarıyla kullanmasını önermiştir [87]. MDA-MB 468 ve MCF7 meme kanseri hücre hatlarına Triptolidin MDM2/ Akt yeni sinyal yolunu etki ederek antikanser etkilerini de gösterilmiş ve hücreler proliferasyonu G1 fazında indüklediği görülmüştür [171]. Cheng ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada MDA-MB-231 ve MCF7 hücrelerine triptolidin farklı süreli ve farklı dozlar olarak muamelesiyle kaspaz 3'ü PARP'ı indükleyerek kB yoluyla hücrelerin apoptoza gitmesine yol açmıştır [172]. 2011 yılında MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine triptolidin doza bağlı olarak belirgin bir şekilde tümörün büyümesini azalttığını ve hücrelerin yapışma gücünü kayıp ettiği gözlemlenmiştir [85]. Birkaç çalışmada triptolidin *in vivo* ve *in vitro* olarak antiproliferatif etkilerini farklı kanser hücrelerinde gösterilmiştir [153-154]. Triptolidin farklı kanser çalışmalarında PDL'in etkisini ihibe ettiği görülmüştür [174]. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde triptolidin PLD'in büyük bir şekilde inhibe ettiği gözlemlenmiştir [175]. Ayrıca Triptolidin akciğer kanserine karşı antiapoptotik etkilerini gösterilmiştir [176]. Birkaç araştırmada 60'tan daha fazla tümörde anti-tümör ve baskılayıcı bir etkisi olduğu bulunmuştur [158-67]. Çalışmalar, triptolidin anti-tümör ilaçlardan daha güçlü bir ilaç ve ilaçlara duyarlı kanserlere karşı önemli bir etkiye sahip olduğu görülmüştür [178]. Triptolidin, *in-vivo* ve *in-vitro* çok sayılı çalışmalar ve gözlemlerde doğal bir anti-enflamatuar, immünosüpresif ve anti-tümör tesire sahip bir ilaç olduğunu bilinmiş ve ispat edilmiştir. Kanserli hücrelerin çoğalmasının baskılanmasında, apoptozu indüklemesinde ve anti-tümör olarak önemli bir rol oynamasını tespit edilmiştir [179]. 2019 yılında AML lösem kanseri hücrelerine düşük doz triptolidin uygulandığında STAT5'i ve FLT3'ü indükleyerek apoptoza gittiği görülmüştür [180]. MHCC-97H hücrelerinde NF-κB sinyal yolunu indükleyerek tümörjenezini baskıladığı görülmüştür [181].

Ma ve arkadaşları tarafından yapılmış bir araştırmaya göre triptolidin PANC-1 insan pankreas hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini ve tümörü apoptoza gittiği görülmüştür [182]. Çalışmalar, triptolidin tümörlere direnç gösteren kemoterapötik ilaçların duyarlılığında artış göstermiştir [183]. 2019 yılında yapılan bir araştırmada Triptolidin, TLR4 / NF-κB yolarını indükleyerek apoptoz ifadesini artırdığını göstermiştir [184]. 2019 yılında Ak ciğerinde triptolidin uygulanmasına bakılmış ve Bax'ın anlatımında artış gösterdiğini ve Bcl-2'in anlatımında azalma gösterdiğini

görülmüştür [185]. ABD’de triptolidin üzerinde yapılan bir klinik çalışmasında farklı kanser hücrelerinde güçlü bir anti-tümör ve in-vivo olarak bir umut verici bir ilaç olduğu ispat edilmiştir [186].

Ayrıca, çok sayılı araştırmalarda triptolid kanser hücrelerine karşı anti- proliferasyon ve anti-enflamatuar etkilerine sahip bir ilaç olduğunu tespit edilmiştir [162- 163]. Bununla ilgili olarak Triptolid farklı kanserlerde apoptozu indükleyerek anti-kanser ilaçlara duyarlılığını arttırdığını göstermiştir [188]. 2018 yılında akciğer hücrelerinde, kemoterapi tedavi ve ilaçlara karşı bir direnç gösteren bir kanser türü olduğu için hücrelere ilaç olarak 50 nM triptolid uygulanmış ve sonuç olarak Nrf2 yolunu indükleyerek direnci kırmayı gösterdiği görülmüştür [189]. Rahim ağzı kanserli hücrelerine triptolid bir tedavi olduğu görülmüştür [190].

Bununla birlikte *in-vitro* ve *in vivo* olarak Triptolidin akciğer kanseri, pankreas kanseri ve kolon kanserinde hücre metastazını, hücre gücünü ve tümörün büyümesini baskılayıcı olarak çok önemli bir rol oynadığını göstermiştir [191]. Triptolid, akciğer, karaciğer, meme, prostat ve yumurtalık kanserlerinde hücre apoptozu görüldüğü tespit edilmiştir. Son araştırmalar, meme kanseri ve özellikle de TNBC’in kemoterapik ajanlar ve ilaçlara karşı direnç gösterdiği araştırılmıştır [139]. MDA-MB-231 ve MCF7 meme kanseri hücre hatlarında triptolid zamana bağlı olarak uygulanmış 48 saat ve 72 saatten triptolidin apoptotik etkisini anlamlı bir şekilde görülmüştür [192]. Farklı bir çalışmada triptolidin 400 nM/L MCF-7 meme kanseri hücrelerinin %25’i apoptoza gitmesi bulunmuştur. Aynı çalışmada Beclin-1’in anlatımında 100 nM triptolidin uygulanmasıyla anlamlı bir artış gösterdiğini ve otofojiye ve ERK yolunu aktive ederek apoptoza gittiği ispat edilmiştir [80]. Başka bir çalışmada MDA-MB-231 doza bağlı olarak triptolidin uygulanmasıyla otofojiyi ve apoptozu indükleyerek hücre canlılığını azalttığı gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada fareler üzerinde triptolid uygulanmasıyla ölüm etkisi gösterilmiştir [193]. BGC-823 mide kanseri ve MCF-7 meme kanseri hücrelerine triptolid muamelesinde Western blot analizini yapılmış ve kaspaz3 ve c-kaspaz 3’e bakılmış, sonuç olarak apoptotik yolunun indüklediği görülmüştür [194] [195].

MDA-MB-231, MDA-MB-468 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları üzerinde doza bağlı ve zamana bağlı triptolidin uygulanmasıyla 25 nM konsantrasyonunda hücre canlılığında %50’e kadar bir azalma görülmüş ve PI analizi yapıldığında G0/G1 fazında ölümünü indüklediğini ve apoptozu gözlemlediğini göstermiştir [146].

2016 yılında yapılan bir çalışmada MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinin doza bağlı triptolid uygulandığında sağ kalım analizi gerçekleştirilmiş ve 50-200 nM triptolidin uygulanmasıyla hücre ölümünde büyük bir artış gözlenmiş ve kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozu indükleyebilmiştir [172]. Birkaç çalışmada meme kanserinde büyüme hormonu *in vivo* ve *in vitro* olarak kemoterapötik ilaçlara karşı direnç gösterdiği görülmüştür [196].

Çalışmalar *in vitro* ve *in vivo* otokrin büyüme hormonu tümörde metastazı, göç ve invazyonu indüklediği görülmüştür [197]. Son araştırmalar, otokrin büyüme hormonu meme kanserinin göçünü, epitelomesenkimal geçişini ve invazyonu indüklediği görülmüştür [52]. BH ve BHR meme kanserinde seviyesi yüksek olduğu ve meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu teşvik ettiği bulunmuştur [198]. Minoia ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmaya göre (TNBC) hücrelerinde BH+ olmasını apoptozu önlediği görülmüştür [133]. 2001 yılında yapılan başka bir çalışmada büyüme hormonu tümörün büyümesiyle ilgili olduğunu western blot analizi yaparak rapor edilmiştir [132].

Çalışmalar, Meme kanseri oranları ve gelişmesi dolaşımdaki büyüme hormonu ve prolaktin ile ilişkisi olduğunu görülmüştür. Bununla birlikte PRL ve GH meme kanserinde çok benzer yolları indükleyerek meme kanseri gelişiminde etken göstermiştir. JAK2/STAT3, JAK2/STAT5 ve ERK gibi aktifleştirerek hücre canlılığı, çoğalması ve metastazı indüklediği göstermiştir [65]. Normal meme hücrelerinde BH ifadesinde bir artış göstermesi, epitel hücre çoğalması ile ilişkilidir. Ancak meme karsinomu hücrelerinin en yüksek BH seviyesi sahip olduğu bilinmiştir [199]. *In vivo* çalışmada, farelerde serumdaki BH ve IGF'in oranı %10'e kadar düşürdüğünde meme kanseri hücrelerin büyümesinde önemli bir inhibe ettiği görülmüştür [200].

2001 yılında yapılmış bir çalışmada insanların boyu kanser riski ile ilişkili bir etken olup olmadığını araştırılmış ve sonuç olarak uzun boylu kadınlarda %22'e kadar artış görülmüştür [201]. BH tedavileri gören hastalarda bile kanserle ilişkili ölüm oranı daha yüksek olduğu görülmüştür [202].

Bu tezdeki amacın doğrultusunda BH anlatımı olan MDA-MB-231 hücrelerinde triptolid karşı ilaç direnç mekanizmasındaki ER stresin rolünü göstermesi hedeflenmiştir. BiP, PERK, IRE1 $\alpha$  gibi ER stresinde temel rol oynayan molekülerinin anlatımının imünoblotlama yaparak MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde indüklediği görülmüştür.

BiPin anlatımı 24 saat triptolid (20 nM) uygulamasıyla kontrole göre bir artış göstermişken triptolid (20 nM) ile birlikte Metformin (2 mM) uygulandığında sadece triptolide göre önemli bir artış göstermiştir. Ancak MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücre hattında ER stres anahtarı olan PERK'in anlatımı 24 saat triptolid (20 nM) uygulamasıyla kontrole göre artış göstermiştir. Triptolid ile metformin uygulandığında bu etki geri çekilmiştir. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücre hattında PERK'in anlatımı 24 saat triptolid (20 nM) uygulamasıyla kontrole göre bir artış göstermişken triptolid (20 nM) ile metformin (2 mM) birlikte uygulanmasıyla triptolide göre önemli bir değişiklik göstermemiştir. IRE1 $\alpha$ , katlanmamış protein cevabında önemli bir algılayıcı olarak sayılmaktadır [203]. Triptolid uygulana MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde IRE1 $\alpha$ 'nın anlatımının baskıladığı görülmüşken MDA-MB-231 triptolid ile metforminin uygulanması triptolide göre bir değişiklik gözlenmemiştir. Bununla birlikte MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde IRE1 $\alpha$ 'nın anlatımında triptolid uygulanması kontrole göre anlamlı bir indüklemeye gözlemlenmiştir. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde triptolid ile Metformin uygulandığında triptolide göre anlamlı bir indüklemeye görülmüştür.

MDA-MB-231 doğal tip kanser hücreleri 24 saat triptolid (20 nM) uygulandığında calnexin anlatımını kontrole göre arttırdığını görülmüşken kombinelerin uygulanmasıyla bu etkiyi geri çekildiği görülmüştür. MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde Canlexin anlatımı kombinelerin uygulanması triptolid uygulanan hücrelere göre bir değişiklik göstermemiştir.

Calreticulin yanlış katlanmış proteinlere bağlanır ve endoplazmik retikulumdan Golgi aparatına verilmesini önlemektedir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde (20 nM) triptolid uygulanan hücreler Calreticulin anlatımı kontrole göre önemli bir değişiklik görülmemişken (20 nM) triptolid ile metformin uygulandığında tek başına triptolid uygulanan hücrelere göre anlamlı bir artış gösterilmiştir. Bununla birlikte MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde benzer bir sonuç görülmüştür. MDA-MB-231 doğal tip ve büyüme hormonu meme kanseri hücreleri triptolid (20 nM) ve metformin (2 mM) uygulamasıyla PDI 'in anlatımı kontrole ve triptolid uygulanan hücrelere göre bir değişiklik göstermemişken metformin ile triptolid uygulanmasıyla bir artış görülmüştür.

Bununla birlikte, MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücreleri sadece triptolid uygulanmasıyla bir artış görülmüşken triptolid ile metformin uygulanması triptolide göre önemli bir artış gözlemlenmiştir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri

hücrelerinde STAT1'in anlatımı triptolid uygulanan hücrelerinde kontrol grubuna göre bir indüklenme görülmüştür. Triptolid ile metformin uygulandığında STAT1'in anlatımı triptolid uygulanan hücrelere göre bir azalma gösterdiği görülmüştür. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde STAT1'in anlatımı ikili ilaç uygulanan hücreleri triptolid grubuna göre bir indüklenme görülmüştür. STAT5'in anlatımına bakıldığında doğal tipte kombinenin uygulanmasıyla triptolid grubuna göre indüklenme göstermiştir. BH+ hücrelerinde ikili ilacın uygulanan hücreleri triptolid grubuna göre önemli bir artış görülmüştür.

Bu tezdeki verilen bilgiler ışığında amacımız; laboratuvarımızda yaratılmış otokrin BH anlatımı yapan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında seçilmiş dozlarla (Triptolid 20 nM) triptolidin uygulanmasıyla apoptotic etkisini arttırmak amacıyla anti-proliferasyon etkisi olan Metformin ile birlikte kombine ederek BH+ sinyaline bağlı ilaç direncini kırmayı hedeflemiştir. Bu amaç doğrultusunda Metforminin triptolid bağlı hücre canlılığında triptolid karşı direnç gösteren BH+ anlatımı yapan MDA-MB-231 hücrelerinde metforminin triptolid ile uygulanması sonucunda hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı baskılayıcı etki saptanmıştır. Bununla ilgili olarak BH+ anlatımı yapan MDA-MB-231 hücrelerin triptolid ile metforminin uygulanmasıyla sağ kalım analizinin sonucunda triptolide göre önemli bir artış gösterdiği ispat edilmiştir. Triptolid ile beraber metforminin uygulanmasının triptolide karşı direnç gösteren BH+ anlatımı yapan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklendiği gösterilmiştir.

Metforminin otokrin BH anlatımı kaynaklı triptolidin direnci üzerine etkisi koloni oluşum deneyinde ket vurucu etkisi MDA-MB-231 hücrelerinde MTT ve floresan boyamalarını destekler nitelikte sonuç verilmiştir.

Bax, apoptozu indükleyebilen bir protein olduğu bilinmiş ve Bax'ın ekspresyonu apoptoza giden hücrelerde artış göstermektedir [204]. Ayrıca, triptolid ve metforminin kombine uygulanmasının MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ hücrelerinde pro-apoptotik protein Bax ekspresyonunun anlatımını sadece triptolidin varlığında kontrole göre anlamlı bir indüklenme görülmemiştir. Ancak Triptolid ile Metforminin uygulanmasıyla kontrol ve sadece triptolid uygulanan grubuna göre Bax'ın anlatımı anlamlı bir artış göstermiştir.

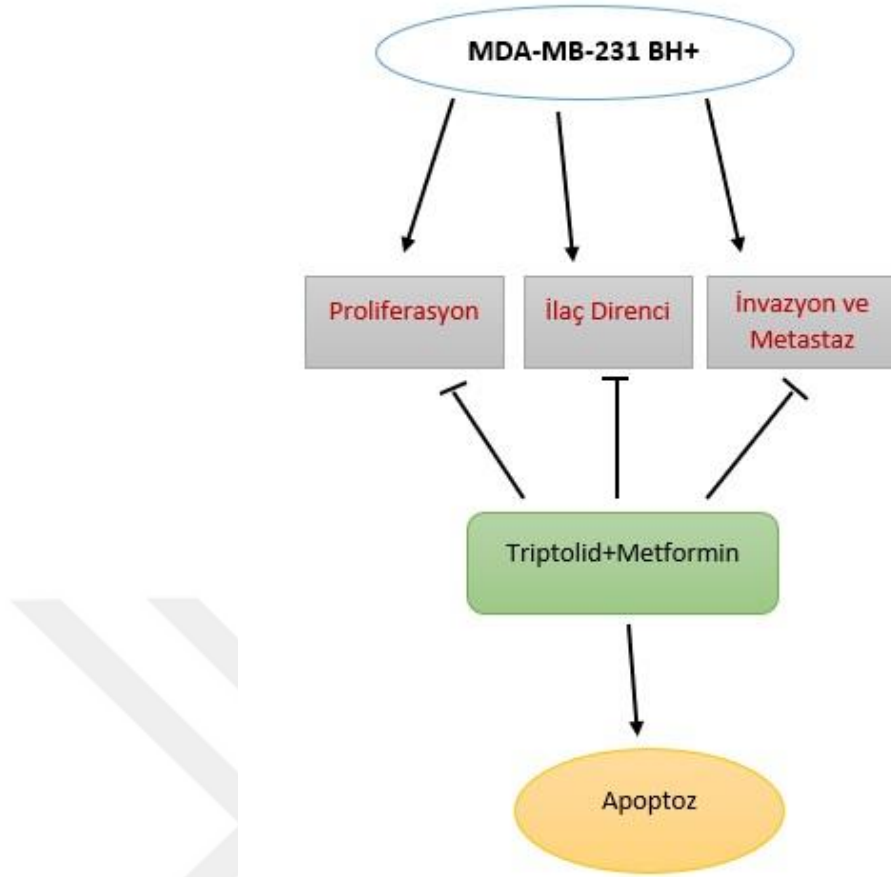
Kaspazlar, apoptozu geçirmeyen hücrelerde inaktif olmaktadır. Fakat aktif halle gelmesi için proteolitik parçalanması gerekmektedir [205]. Kaspaz 7' anlatımında MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde triptolid uygulandığında [205]

kontrole göre bir artış göstermişken kombine bu artışı geri çekilmiştir. Ancak MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde triptolidin uygulanmasıyla büyük bir değişiklik gösterdiği görülmüşken, triptolid ile Metformin birlikte uygulandığında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.

APAF-1'in anlatımı ise MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücreleri tek başına triptolid uygulan hücrelerinde kontrole göre değişiklik gözlemlenmemiş. İkili ilaç uygulanan hücrelerin APAF-1'nin anlatımı sadece triptolid uygulanan hücrelere göre önemli bir artış göstermiştir. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde triptolid uygulanan hücreleri, ikili ilaç uygulanan grubu sadece triptolid uygulanan hücrelere göre anlamlı bir artış göstermiştir.

PARP-1'in fragmanları farklı hücre ölümünde bir role sahip olduğu tartışılmaktadır [206]. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde PARP'ın anlatımına bakıldığında triptolid uygulanmasıyla kontrole göre anlamlı bir artış göstermiştir. Metformin ile triptolid uygulandığında bu etkiyi geri çekilmesi görülmüştür. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinin PARP'ın anlatımı triptolidin uygulanmasıyla kontrole göre bir artış göstermişken kombinelerin uygulanmasıyla anlamlı ve belirgin bir artış göstermiştir.

Bununla birlikte anti-apoptotic olarak Bcl-2 anlatımına bakılmıştır. Bcl-2, tümör gelişimindeki önemli bir rol oynayan bir proteindir, hücre canlılığını arttıran ve apoptozu bloke edebilmektedir [186- 187]. Bununla ilgili olarak Bcl-2 anlatımı arttırılmış kanser hücrelerinde otofajiyi baskıladığı ve apoptozu engellediği görülmüştür [208]. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde Bcl-2'in anlatımı triptolidin uygulanmasıyla kontrole göre bir azalma göstermişken, ikili ilacın uygulanmasıyla daha büyük bir azalma görülmüştür. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücreleri Bcl-2 'in anlatımı triptolid uygulandığında kontrole göre bir azalma göstermişken triptolid ile metformin uygulandığında triptolide göre anlamlı bir azalma göstermiştir.



**Şekil 26. Triptolid ve Metforminin Kombin Uygulanmasının MDA-MB-231 Doğal Tip ve BH+ Meme Kanseri Hücrelerinde İnvazyon ve Metastatik Profil, İlaç Direnci, Hücre Proliferasyonu, Apoptoz Etkisi.**

Triptolid üzerinde yapılan araştırmalar, SW480 ve Caco 2 kolon kanseri hücreleri hatlarında 100 nM triptolid 72 saat boyunca uygulandıktan sonra PI Boyaması ve Facs Hücre Akış Sitometre Analizi yapılmış ve sonuç olarak hücre popülasyonunu G1 fazında ihibe edilmiştir [168]. MDA-MB 468 ve MCF7 meme kanseri hücre hatlarına Triptolidin MDM2/ Akt yeni sinyal yolunu etki ederek antikanser etkilerini de gösterilmiş ve hücreler proliferasyonu G1 fazında indüklediği görölmüştür [171] Bununla birlikte triptolidin MDA-MB-231 hücrelerinde G0/G1 fazında hücre döngüsüne ket vurduğu görölmüştür [146]. Ayrıca triptolide uygulamasının BiP, PERK ve PDI gibi ER stres anahtar moleküllerin anlatımını indüklediği hem doğal tip hem de BH+ MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde gösterilmiştir. Bununla birlikte metformin ve triptolide ikili ilaç uygulamasının G1 fazında hücrelere ket vurduğu görölmüştür.



Bu tezde ile ilk defa metformin ve triptolid beraber uygulamasının otokrin GH anlatımı kazandırılarak invaziv-metastatik profili artırılmış TNBC meme kanseri modeli MDA-MB-231 hücrelerinde ER stresinin rolü ve ilaçların apoptotik etkisi gösterilmiştir.

Gelecekte yapılacak fare modellerinde, *in vivo* ve pre- klinik çalışmalar için bu veriler ışığıyla meme kanserinde ve özellikle hormonlara karşı direnç üzerinde kombine ilacın uygulanmasını önerilmektedir.



## KAYNAKLAR

- [1] A. Sudhakar, "History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods," *J. Cancer Sci. Ther.*, 2009.
- [2] G. M. Cooper and R. E. Hausman, "The Development and Causes of Cancer," *Cell A Mol. Approach*, 2007.
- [3] G. A. Colditz, K. A. Kaphingst, S. E. Hankinson, and B. Rosner, "Family history and risk of breast cancer: Nurses' health study," *Breast Cancer Res. Treat.*, 2012.
- [4] B. N. M. Zordoky, D. Bark, C. L. Soltys, M. M. Sung, and J. R. B. Dyck, "The anti-proliferative effect of metformin in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells is highly dependent on glucose concentration: Implications for cancer therapy and prevention," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 2014.
- [5] M. Parton, M. Dowsett, and I. Smith, "Studies of apoptosis in breast cancer," *British Medical Journal*. 2001.
- [6] F. Fang, G. Antico, J. Zheng, and C. V. Clevenger, "Quantification of PRL/Stat5 signaling with a novel pGL4-CISH reporter," *BMC Biotechnol.*, 2008.
- [7] A. Coker-Gurkan *et al.*, "Curcumin inhibits autocrine growth hormone-mediated invasion and metastasis by targeting NF- $\kappa$ B signaling and polyamine metabolism in breast cancer cells," *Amino Acids*, 2018.
- [8] T. Zhu *et al.*, "Oncogenic transformation of human mammary epithelial cells by autocrine human growth hormone," *Cancer Res.*, 2005.
- [9] C. Meng *et al.*, "Targets and molecular mechanisms of triptolide in cancer therapy," *Chinese Journal of Cancer Research*. 2014.
- [10] N. Mussin *et al.*, "Sunitinib and metformin synergistically inhibits colon cancer in vitro and in vivo," *J. Korean Med. Sci.*, 2017.
- [11] S. C. Dolfi *et al.*, "The metabolic demands of cancer cells are coupled to their size and protein synthesis rates," *Cancer Metab.*, 2013.
- [12] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, 2018.
- [13] The Union International Cancer Control, "New Global Cancer Data: GLOBOCAN 2018 | UICC," *Geneva, Switzerland, 12 Sept. 2018*, 2018.
- [14] R. Nall, "Cancer: Overview, causes, treatments, and types," *Medical News Today*. 2018.
- [15] World Health Organisation, *Global Health TB Report*. 2018.
- [16] Y. Feng *et al.*, "Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis," *Genes and Diseases*. 2018.
- [17] M. Kamińska, T. Ciszewski, K. Łopacka-Szatan, P. Miotła, and E. Starosławska, "Breast cancer risk factors," *Przegląd Menopauzalny*. 2015.
- [18] P. G. Tsoutsou, M. C. Vozenin, A. D. Durham, and J. Bourhis, "How could breast cancer molecular features contribute to locoregional treatment decision making?," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017.
- [19] P. Boykx *et al.*, "An investigation of public knowledge of the link between alcohol and cancer," *Univ. Sheff. Cancer Res. UK*, 2015.
- [20] L. M. Starita and J. D. Parvin, "The multiple nuclear functions of BRCA1:

- Transcription, ubiquitination and DNA repair,” *Current Opinion in Cell Biology*. 2003.
- [21] S. A. Narod and W. D. Foulkes, “BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond,” *Nature Reviews Cancer*. 2004.
- [22] E. A. Rakha, J. S. Reis-Filho, and I. O. Ellis, “Basal-like breast cancer: A critical review,” *Journal of Clinical Oncology*. 2008.
- [23] S. K. Hanks, A. M. Quinn, and T. Hunter, “The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains,” *Science* (80-. ), 1988.
- [24] P. Wee and Z. Wang, “Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways,” *Cancers*. 2017.
- [25] M. Kaleko, W. J. Rutter, and A. D. Miller, “Overexpression of the human insulinlike growth factor I receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation.,” *Mol. Cell. Biol.*, 2015.
- [26] V. P. Eswarakumar, I. Lax, and J. Schlessinger, “Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2005.
- [27] W. Ruan and D. L. Kleinberg, “Insulin-like growth factor I is essential for terminal end bud formation and ductal morphogenesis during mammary development,” *Endocrinology*, 1999.
- [28] R. Sarfstein *et al.*, “Insulin-like Growth Factor-I Receptor (IGF-IR) translocates to nucleus and autoregulates IGF-IR gene expression in breast cancer cells,” *J. Biol. Chem.*, 2012.
- [29] H. Macias and L. Hinck, “Mammary gland development,” *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 2012.
- [30] H. Yu, “Role of the Insulin-Like Growth Factor Family in Cancer Development and Progression,” *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000.
- [31] P. F. Christopoulos, P. Msaouel, and M. Koutsilieris, “The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer,” *Molecular Cancer*. 2015.
- [32] Y. Oka *et al.*, “M6P/IGF2R tumor suppressor gene mutated in hepatocellular carcinomas in Japan,” *Hepatology*, 2002.
- [33] W. M. Grady *et al.*, “Mutational inactivation of transforming growth factor  $\beta$  receptor type II in microsatellite stable colon cancers,” *Cancer Res.*, 1999.
- [34] G. V. Sherbet, “The TGF- $\beta$  Family Accessory Type III Receptor Function in Cancer Progression,” in *Molecular Approach to Cancer Management*, 2017.
- [35] J. H. Harmey, A. M. Duffy, D. J. Bouchier-Hayes, and J. H. Harmey, “Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF,” in *VEGF and Cancer*, 2004.
- [36] J. W. Walter *et al.*, “Somatic mutation of vascular endothelial growth factor receptors in juvenile hemangioma,” *Genes Chromosom. Cancer*, 2002.
- [37] J. Yu, C. Ustach, and H. R. C. Kim, “Platelet-derived growth factor signaling and human cancer,” *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2003.
- [38] W. Craig Clark, J. T. Robertson, and I. Unnisa Ali, “Amplification and/or Overexpression of Platelet-derived Growth Factor Receptors and Epidermal Growth Factor Receptor in Human Glial Tumors,” *Cancer Res.*, 1992.
- [39] M. Presta, P. Dell’Era, S. Mitola, E. Moroni, R. Ronca, and M. Rusnati, “Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2005.
- [40] I. Damjanov, “Growth factor receptors.,” *Current topics in pathology*. 1991.
- [41] C. Carter-Su, J. Schwartz, and L. S. Argetsinger, “Growth hormone signaling pathways,” *Growth Horm. IGF Res.*, 2016.

- [42] F. Fang, M. A. Rycyzyn, and C. V. Clevenger, "Role of c-Myb during prolactin-induced signal transducer and activator of transcription 5a signaling in breast cancer cells," *Endocrinology*, 2009.
- [43] D. D. Patel *et al.*, "Node negative breast carcinoma: Hyperprolactinemia and/or overexpression of p53 as an independent predictor of poor prognosis compared to newer and established prognosticators," *J. Surg. Oncol.*, 1996.
- [44] H. Wennbo and J. Törnell, "The role of prolactin and growth hormone in breast cancer," *Oncogene*. 2000.
- [45] N. J. Lanning and C. Carter-Su, "Recent advances in growth hormone signaling," *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2006.
- [46] C. S. Reh and M. E. Geffner, "Somatotropin in the treatment of growth hormone deficiency and Turner syndrome in pediatric patients: A review," *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*. 2010.
- [47] V. S. Bonert and S. Melmed, "Growth Hormone," in *The Pituitary: Fourth Edition*, 2017.
- [48] J. Ayuk and M. C. Sheppard, "Growth hormone and its disorders," *Postgraduate Medical Journal*. 2006.
- [49] R. Subramani, S. B. Nandy, D. A. Pedroza, and R. Lakshmanaswamy, "Role of growth hormone in breast cancer," *Endocrinology*. 2017.
- [50] C. V. Clevenger, S. L. Gadd, and J. Zheng, "New mechanisms for PRLr action in breast cancer," *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2009.
- [51] J. T. Emerman, M. Leahy, P. W. Gout, and N. Bruchofsky, "Elevated growth hormone levels in sera from breast cancer patients," *Horm. Metab. Res.*, 1985.
- [52] S. Mukhina, H. C. Mertani, K. Guo, K. O. Lee, P. D. Gluckman, and P. E. Lobie, "Phenotypic conversion of human mammary carcinoma cells by autocrine human growth hormone," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004.
- [53] E. S. Sokol, D. H. Miller, A. Breggia, K. C. Spencer, L. M. Arendt, and P. B. Gupta, "Growth of human breast tissues from patient cells in 3D hydrogel scaffolds," *Breast Cancer Res.*, 2016.
- [54] R. Basu, Y. Qian, and J. J. Kopchick, "Lessons from growth hormone receptor gene-disrupted mice: Are there benefits of endocrine defects?," *European Journal of Endocrinology*. 2018.
- [55] M. P. Kawa *et al.*, "The impact of growth hormone therapy on the apoptosis assessment in CD34+ hematopoietic cells from children with growth hormone deficiency," *Int. J. Mol. Sci.*, 2017.
- [56] Z. S. Wu *et al.*, "Tumor expression of human growth hormone and human prolactin predict a worse survival outcome in patients with mammary or endometrial carcinoma," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2011.
- [57] M. J. Van Den Eijnden and G. J. Strous, "Autocrine growth hormone: Effects on growth hormone receptor trafficking and signaling," *Mol. Endocrinol.*, 2007.
- [58] S. Martinkovich, D. Shah, S. L. Planey, and J. A. Arnott, "Selective estrogen receptor modulators: Tissue specificity and clinical utility," *Clinical Interventions in Aging*. 2014.
- [59] K. I. Matsuda *et al.*, "Expression and intracellular distribution of the G protein-coupled receptor 30 in rat hippocampal formation," *Neurosci. Lett.*, 2008.
- [60] Z. W. *et al.*, "Autocrine/paracrine human growth hormone-stimulated microRNA 96-182-183 cluster promotes epithelial-mesenchymal transition and invasion in breast cancer," *J. Biol. Chem.*, 2015.
- [61] S. Lin *et al.*, "P2-03-05: Attenuation of TGF-beta Signaling Suppresses Premature Senescence in a p21-Dependent Manner and Promotes Oncogenic

- ras-Mediated Metastatic Transformation in hTERT-Immortalized Basal-Like Human Mammary Epithelial Cells.,” 2011.
- [62] M. Mojarrad *et al.*, “Autocrine human growth hormone expression leads to resistance of MCF-7 cells to tamoxifen,” *Med. Oncol.*, 2010.
- [63] A. Coker-Gurkan, D. Bulut, R. Genc, E. D. Arisan, P. Obakan-Yerlikaya, and N. Palavan-Unsal, “Curcumin prevented human autocrine growth hormone (GH) signaling mediated NF- $\kappa$ B activation and miR-183-96-182 cluster stimulated epithelial mesenchymal transition in T47D breast cancer cells,” *Mol. Biol. Rep.*, 2019.
- [64] N. M. Bougen *et al.*, “Autocrine human GH promotes radioresistance in mammary and endometrial carcinoma cells,” *Endocr. Relat. Cancer*, 2012.
- [65] M. C. Zatelli *et al.*, “Growth hormone excess promotes breast cancer chemoresistance,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2009.
- [66] J. Chiesa *et al.*, “Autocrine proliferative effects of hGH are maintained in primary cultures of human mammary carcinoma cells,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2011.
- [67] M. Coskun, M. Salem, J. Pedersen, and O. H. Nielsen, “Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease,” *Pharmacological Research*. 2013.
- [68] C. Gil-Puig, M. Blanco, T. García-Caballero, C. Segura, and R. Pérez-Fernández, “Pit-1/GHF-1 and GH expression in the MCF-7 human breast adenocarcinoma cell line,” *Journal of Endocrinology*. 2002.
- [69] K. K. Kaulsay, T. Zhu, W. F. Bennett, K. O. Lee, and P. E. Lobie, “The effects of autocrine human growth hormone (hGH) on human mammary carcinoma cell behavior are mediated via the hGH receptor,” *Endocrinology*, 2001.
- [70] K. Hu, Z. Liu, and D. Liu, “Triptolide inhibits vascular endothelial growth factor expression and production by endothelial cells,” *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2001.
- [71] R. C. Olney, “Regulation of bone mass by growth hormone,” in *Medical and Pediatric Oncology*, 2003.
- [72] A. J. Brooks and M. J. Waters, “The growth hormone receptor: Mechanism of activation and clinical implications,” *Nature Reviews Endocrinology*. 2010.
- [73] G. Di Bella, B. Colori, and R. Scanferlato, “The over-expression of GH/GHR in tumour tissues with respect to healthy ones confirms its oncogenic role and the consequent oncosuppressor role of its physiological inhibitor, somatostatin: A review of the literature,” *Neuroendocrinology Letters*. 2018.
- [74] C. Laban, S. A. Bustin, and P. J. Jenkins, “The GH-IGF-I axis and breast cancer,” *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2003.
- [75] A. Flores-Morales, C. J. Greenhalgh, G. Norstedt, and E. Rico-Bautista, “Negative Regulation of Growth Hormone Receptor Signaling,” *Mol. Endocrinol.*, 2005.
- [76] J. Van De Steene, G. Soete, and G. Storme, “Adjuvant radiotherapy for breast cancer significantly improves overall survival: The missing link,” *Radiother. Oncol.*, 2000.
- [77] M. B. Antonoff *et al.*, “Triptolide therapy for neuroblastoma decreases cell viability in vitro and inhibits tumor growth in vivo,” *Surgery*, 2009.
- [78] X. J. Li, Z. Z. Jiang, and L. Y. Zhang, “Triptolide: Progress on research in pharmacodynamics and toxicology,” *Journal of Ethnopharmacology*. 2014.
- [79] W. Huang *et al.*, “Triptolide inhibits the proliferation of prostate cancer cells and down-regulates SUMO-specific protease 1 expression,” *PLoS One*, 2012.

- [80] H. Gao *et al.*, “Triptolide induces autophagy and apoptosis through ERK activation in human breast cancer MCF-7 cells,” *Exp. Ther. Med.*, 2018.
- [81] C. E. DeSantis *et al.*, “Cancer treatment and survivorship statistics, 2014,” *CA. Cancer J. Clin.*, 2014.
- [82] M. Huang, H. Zhang, T. Liu, D. Tian, L. Gu, and M. Zhou, “Triptolide inhibits MDM2 and induces apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells through a p53-independent pathway,” *Mol. Cancer Ther.*, 2013.
- [83] C. R. Tate *et al.*, “Targeting triple-negative breast cancer cells with the histone deacetylase inhibitor panobinostat,” *Breast Cancer Res.*, 2012.
- [84] B. J. Tan and G. N. C. Chiu, “Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and ERK activation in triptolide-induced apoptosis,” *Int. J. Oncol.*, 2013.
- [85] B. J. Tan, B. H. Tan, and G. N. C. Chiu, “Effect of triptolide on focal adhesion kinase and survival in MCF-7 breast cancer cells,” *Oncol. Rep.*, 2011.
- [86] M. E. Messina and R. Halaby, “Does triptolide induce lysosomal-mediated apoptosis in human breast cancer cells?,” *Med. Hypotheses*, 2011.
- [87] Y. Deng *et al.*, “Triptolide sensitizes breast cancer cells to Doxorubicin through the DNA damage response inhibition,” *Mol. Carcinog.*, 2018.
- [88] S. B. Ateba *et al.*, “Natural Terpenoids Against Female Breast Cancer: A 5-year Recent Research,” *Curr. Med. Chem.*, 2018.
- [89] B. S. Patel *et al.*, “Repression of breast cancer cell growth by proteasome inhibitors in vitro: Impact of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1,” *Cancer Biol. Ther.*, 2015.
- [90] H. Shao, J. Ma, T. Guo, and R. Hu, “Triptolide induces apoptosis of breast cancer cells via a mechanism associated with the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway,” *Exp. Ther. Med.*, 2014.
- [91] G. F. Pan, J. L. Gao, Q. Zhang, G. Y. Lv, and S. H. Chen, “Triptolide inhibits cell proliferation by downregulating phosphorylation of estrogen reporters in 4T1 tumor-bearing mice,” *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 2013.
- [92] J. Li *et al.*, “Triptolide-induced in vitro and in vivo cytotoxicity in human breast cancer stem cells and primary breast cancer cells,” *Oncol. Rep.*, 2014.
- [93] W. K. Dong *et al.*, “Triptolide-induced suppression of phospholipase D expression inhibits proliferation of MDA-MB-231 breast cancer cells,” *Exp. Mol. Med.*, 2009.
- [94] Y. S. Wei and I. Adachi, “Inhibitory effect of triptolide on colony formation of breast and stomach cancer cell lines,” *Acta Pharmacol. Sin.*, 1991.
- [95] R. A. Lockshin and C. M. Williams, “Programmed cell death-II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms,” *J. Insect Physiol.*, 1964.
- [96] M. Bizjak, P. Malavašič, K. Dolinar, J. Pohar, S. Pirkmajer, and M. Pavlin, “Combined treatment with Metformin and 2-deoxy glucose induces detachment of viable MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro,” *Sci. Rep.*, 2017.
- [97] V. Anisimov, “Metformin for prevention and treatment of colon cancer: a reappraisal of experimental and clinical data,” *Curr. Drug Targets*, 2015.
- [98] X. Cao, Z. S. Wen, X. D. Wang, Y. Li, K. Y. Liu, and X. Wang, “The clinical effect of metformin on the survival of lung cancer patients with diabetes: A comprehensive systematic review and meta-analysis of retrospective studies,” *J. Cancer*, 2017.
- [99] V. N. Anisimov, “Metformin for Prevention and Treatment of Colon Cancer: A Reappraisal of Experimental and Clinical Data,” *Curr. Drug Targets*, 2016.
- [100] S. A. Hawley, A. E. Gadalla, G. S. Olsen, and D. Grahame Hardie, “The

- antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism,” *Diabetes*, 2002.
- [101] N. Mujumdar *et al.*, “Triptolide induces cell death in pancreatic cancer cells by apoptotic and autophagic pathways,” *Gastroenterology*, 2010.
- [102] U. Krishnamurti and J. F. Silverman, “HER2 in breast cancer: A review and update,” *Advances in Anatomic Pathology*. 2014.
- [103] E. van Anken and R. Sitia, “The Endoplasmic Reticulum,” in *Encyclopedia of Cell Biology*, 2016.
- [104] B. D. Roussel, A. J. Kruppa, E. Miranda, D. C. Crowther, D. A. Lomas, and S. J. Marciniak, “Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease,” *The Lancet Neurology*. 2013.
- [105] J. L. Brodsky and W. R. Skach, “Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems,” *Current Opinion in Cell Biology*. 2011.
- [106] N. Naidoo, “Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum,” in *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, 2011.
- [107] A. Walczak, K. Gradzik, J. Kabzinski, K. Przybylowska-Sygut, and I. Majsterek, “The role of the ER-induced UPR pathway and the efficacy of its inhibitors and inducers in the inhibition of tumor progression,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019.
- [108] J. Han *et al.*, “ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death,” *Nat. Cell Biol.*, 2013.
- [109] S. J. Marciniak *et al.*, “CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum,” *Genes Dev.*, 2004.
- [110] M. Maurel, E. Chevet, J. Tavernier, and S. Gerlo, “Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation,” *Trends in Biochemical Sciences*. 2014.
- [111] D. Y. A. Dadey *et al.*, “The ATF6 pathway of the ER stress response contributes to enhanced viability in glioblastoma,” *Oncotarget*, 2016.
- [112] K. M. A. Rouschop *et al.*, “The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5,” *J. Clin. Invest.*, 2010.
- [113] S. Z. Hasnain, J. B. Prins, and M. A. McGuckin, “Oxidative and endoplasmic reticulum stress in  $\beta$ -cell dysfunction in diabetes,” *Journal of Molecular Endocrinology*. 2016.
- [114] A. Walczak, K. Gradzik, J. Kabzinski, K. Przybylowska-Sygut, and I. Majsterek, “The Role of the ER-Induced UPR Pathway and the Efficacy of Its Inhibitors and Inducers in the Inhibition of Tumor Progression,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2019.
- [115] P. Saikumar, Z. Dong, V. Mikhailov, M. Denton, J. M. Weinberg, and M. A. Venkatachalam, “Apoptosis: Definition, mechanisms, and relevance to disease,” *Am. J. Med.*, 1999.
- [116] P. C. A. Kam and N. I. Ferch, “Apoptosis: Mechanisms and clinical implications,” *Anaesthesia*. 2000.
- [117] S. Elmore, “Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death,” *Toxicologic Pathology*. 2007.
- [118] F. H. Igney and P. H. Krammer, “Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis,” *Nature Reviews Cancer*. 2002.
- [119] K. Sadowski-Debbing, J. F. Coy, W. Mier, H. Hug, and M. Los, “Caspases - Their Role in Apoptosis and Other Physiological Processes as Revealed by Knock-Out Studies,” *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*.

- 2002.
- [120] S. Goldar, M. S. Khaniani, S. M. Derakhshan, and B. Baradaran, "Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment," *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015.
- [121] J. M. Adams and S. Cory, "The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets," *Cell Death Differ.*, 2018.
- [122] S. Y. Jeong and D. W. Seol, "The role of mitochondria in apoptosis," *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2008.
- [123] D. L. Vaux and J. Silke, "Mammalian mitochondrial IAP binding proteins," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003.
- [124] P. A. Ellis *et al.*, "Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer," *Int. J. Cancer*, 1997.
- [125] S. W. Lowe and A. W. Lin, "Apoptosis in cancer," *Carcinogenesis*. 2000.
- [126] D. A. Harrison, "The JAK/STAT pathway," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2012.
- [127] American Cancer Society, "Facts & Figures 2019," 2019.
- [128] American Cancer Society, "Breast Cancer Facts & Figures 2019-2020," 2019.
- [129] M. Raccurt *et al.*, "High stromal and epithelial human GH gene expression is associated with proliferative disorders of the mammary gland," *Journal of Endocrinology*. 2002.
- [130] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2016," *CA. Cancer J. Clin.*, 2016.
- [131] J. Á. F. VARA, M. V. CARRETERO, H. GERÓNIMO, K. BALLMER-HOFER, and J. MARTÍN-PÉREZ, "Stimulation of c-Src by prolactin is independent of Jak2," *Biochem. J.*, 2000.
- [132] M. Gebre-Medhin, L. G. Kindblom, H. Wennbo, J. Törnell, and J. M. Meis-Kindblom, "Growth hormone receptor is expressed in human breast cancer," *Am. J. Pathol.*, 2001.
- [133] M. Minoia *et al.*, "Growth hormone receptor blockade inhibits growth hormone-induced chemoresistance by restoring cytotoxic-induced apoptosis in breast cancer cells independently of estrogen receptor expression," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2012.
- [134] N. M. Bougen, T. Yang, H. Chen, P. E. Lobie, and J. K. Perry, "Autocrine human growth hormone reduces mammary and endometrial carcinoma cell sensitivity to mitomycin C," *Oncol. Rep.*, 2011.
- [135] J. Divisova *et al.*, "The growth hormone receptor antagonist pegvisomant blocks both mammary gland development and MCF-7 breast cancer xenograft growth," *Breast Cancer Res. Treat.*, 2006.
- [136] M. Lu, J. U. Flanagan, R. J. Langley, M. P. Hay, and J. K. Perry, "Targeting growth hormone function: strategies and therapeutic applications," *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2019.
- [137] V. Pandey *et al.*, "Autocrine human growth hormone stimulates oncogenicity of endometrial carcinoma cells," *Endocrinology*, 2008.
- [138] D. L. Kleinberg, "Early mammary development: Growth hormone and IGF-1," *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 1997.
- [139] E. Varghese, S. M. Samuel, M. Abotaleb, S. Cheema, R. Mamtani, and D. Büsselberg, "The 'Yin and Yang' of natural compounds in anticancer therapy of triple-negative breast cancers," *Cancers*. 2018.
- [140] S. Sarkar and S. Paul, "Triptolide mediated amelioration of breast cancer via modulation of molecular pathways," *Pharmacogn. J.*, 2014.



- [141] D. Glick, S. Barth, and K. F. Macleod, "Autophagy: Cellular and molecular mechanisms," *Journal of Pathology*. 2010.
- [142] F. Zhao *et al.*, "Effects of triptolide on RIZ1 expression, proliferation, and apoptosis in multiple myeloma U266 cells," *Acta Pharmacol. Sin.*, 2010.
- [143] X. Li *et al.*, "Pharmacokinetics and tissue distribution study in mice of triptolide-loaded lipid emulsion and accumulation effect on pancreas," *Drug Deliv.*, 2016.
- [144] M. Yanchun *et al.*, "Triptolide prevents proliferation and migration of Esophageal Squamous Cell Cancer via MAPK/ERK signaling pathway," *Eur. J. Pharmacol.*, 2019.
- [145] H. Li, G. F. Pan, Z. Z. Jiang, J. Yang, L. X. Sun, and L. Y. Zhang, "Triptolide inhibits human breast cancer MCF-7 cell growth via downregulation of the ER $\alpha$ -mediated signaling pathway," *Acta Pharmacol. Sin.*, 2015.
- [146] E. Varghese, S. M. Samuel, S. Varghese, S. Cheema, R. Mamtani, and D. Büsselberg, "Triptolide decreases cell proliferation and induces cell death in triple negative MDA-MB-231 breast cancer cells," *Biomolecules*, 2018.
- [147] T. A. Reno, J. Y. Kim, and D. J. Raz, "Triptolide inhibits lung cancer cell migration, invasion, and metastasis," *Ann. Thorac. Surg.*, 2015.
- [148] C. J. Li *et al.*, "Synergistic anticancer activity of triptolide combined with cisplatin enhances apoptosis in gastric cancer in vitro and in vivo," *Cancer Lett.*, 2012.
- [149] J. E. Shepherd, "Current strategies for prevention, detection, and treatment of ovarian cancer," *J. Am. Pharm. Assoc. (Wash.)*, 2000.
- [150] A. Pigneux *et al.*, "Triptolide cooperates with chemotherapy to induce apoptosis in acute myeloid leukemia cells," *Exp. Hematol.*, 2008.
- [151] N. Mujumdar *et al.*, "Triptolide activates unfolded protein response leading to chronic ER stress in pancreatic cancer cells," *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, 2014.
- [152] H. Wu, T. Sun, and R. U. I. Bi, "Inhibition of insulin-like growth factor 1 signaling synergistically enhances the tumor suppressive role of triptolide in triple-negative breast cancer cells," *Oncol. Lett.*, 2019.
- [153] M. H. Roshan, Y. K. Shing, and N. P. Pace, "Metformin as an adjuvant in breast cancer treatment," *SAGE Open Med.*, 2019.
- [154] H. Liu *et al.*, "Metformin and the mTOR inhibitor everolimus (RAD001) sensitize breast cancer cells to the cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs in vitro," *Anticancer Res.*, 2012.
- [155] H. Lee *et al.*, "Response of breast cancer cells and cancer stem cells to metformin and hyperthermia alone or combined," *PLoS One*, 2014.
- [156] F. M., L. G., L. E., S. G.F.M., P. F., and N. A., "Metformin Therapy and Risk of Cancer in Patients with Type 2 Diabetes: Systematic Review," *PLoS One*, 2013.
- [157] M. Schröder and R. J. Kaufman, "ER stress and the unfolded protein response," *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005.
- [158] S. Hooshmand, A. Ghaderi, K. Yusoff, K. Thilakavathy, R. Rosli, and Z. Mojtahedi, "Differentially Expressed Proteins in ER+ MCF7 and ER- MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells by RhoGDI- $\alpha$  Silencing and Overexpression," *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 2014.
- [159] N. Wollen and C. J. Bailey, "Inhibition of hepatic gluconeogenesis by metformin. Synergism with insulin," *Biochem. Pharmacol.*, 1988.

- [160] F. Bost, I. Ben Sahra, Y. Le Marchand-Brustel, and J. F. Tanti, "Metformin and cancer therapy.," *Current opinion in oncology*. 2012.
- [161] B. Viollet *et al.*, "AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: From physiology to therapeutic perspectives," in *Acta Physiologica*, 2009.
- [162] C. J. Currie, C. D. Poole, and E. A. M. Gale, "The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes," *Diabetologia*, 2009.
- [163] I. Ben Sahra *et al.*, "Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1," *Cancer Res.*, 2011.
- [164] Q. W. Jiang *et al.*, "Synergistic anticancer effects of triptolide and celastrol, two main compounds from thunder god vine," *Oncotarget*, 2015.
- [165] T. Tengchaisri, R. Chawengkirttikul, N. Rachaphaew, V. Reutrakul, R. Sangsuwan, and S. Sirisinha, "Antitumor activity of triptolide against cholangiocarcinoma growth in vitro and in hamsters," *Cancer Lett.*, 1998.
- [166] P. A. Phillips *et al.*, "Triptolide induces pancreatic cancer cell death via inhibition of heat shock protein 70," *Cancer Res.*, 2007.
- [167] M. Liang and J. Fu, "Triptolide inhibits interferon- $\gamma$ -induced programmed death-1-ligand 1 surface expression in breast cancer cells," *Cancer Lett.*, 2008.
- [168] Z. Wang, H. Jin, R. Xu, Q. Mei, and D. Fan, "Triptolide downregulates Rac1 and the JAK/STAT3 pathway and inhibits colitis-related colon cancer progression," *Exp. Mol. Med.*, 2009.
- [169] S. W. Park and Y. Il Kim, "Triptolide induces apoptosis of PMA-treated THP-1 cells through activation of caspases, inhibition of NF- $\kappa$ B and activation of MAPKs," *Int. J. Oncol.*, 2013.
- [170] H. Liu, L. Tang, X. Li, and H. Li, "Triptolide inhibits vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis in human breast cancer cells," *Exp. Ther. Med.*, 2018.
- [171] J. Xiong *et al.*, "Triptolide has anticancer and chemosensitization effects by down-regulating Akt activation through the MDM2/REST pathway in human breast cancer," *Oncotarget*, 2016.
- [172] X. Cheng *et al.*, "Triptolide sensitizes human breast cancer cells to tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis by inhibiting activation of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway," *Mol. Med. Rep.*, 2016.
- [173] L. A. Shamon *et al.*, "Evaluation of the mutagenic, cytotoxic, and antitumor potential of triptolide, a highly oxygenated diterpene isolated from *Tripterygium wilfordii*," *Cancer Lett.*, 1997.
- [174] J. H. Exton, "Phospholipase D-structure, regulation and function.," *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 2002.
- [175] Y. Chen, V. Rodrik, and D. A. Foster, "Alternative phospholipase D/mTOR survival signal in human breast cancer cells," *Oncogene*, 2005.
- [176] S. Yang *et al.*, "Triptolide Mitigates Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis," *Radiat. Res.*, 2015.
- [177] R. Li *et al.*, "Triptolide suppresses growth and hormone secretion in murine pituitary corticotroph tumor cells via NF-kappaB signaling pathway," *Biomed. Pharmacother.*, 2017.
- [178] J. M. Yi, X. J. Huan, S. S. Song, H. Zhou, Y. Q. Wang, and Z. H. Miao, "Triptolide induces cell killing in multidrug-resistant tumor cells via CDK7/RPB1 Rather than XPB or p44," *Mol. Cancer Ther.*, 2016.
- [179] J. F. Shi *et al.*, "Research progress on anti-tumor effects and mechanisms of triptolide and its combined application," *Zhongguo Zhong yao za zhi =*

- Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica.* 2019.
- [180] X. Wang, L. M. Ma, T. Wang, W. W. Tian, and Y. J. Lu, "Effect of Low-Dose Triptolide and Sorafenib Alone and Their Combination on AML Cell Line MV411 and the Pathway of STAT5," *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi*, 2019.
- [181] H. Wang, D. Ma, C. Wang, S. Zhao, and C. Liu, "Triptolide inhibits invasion and tumorigenesis of hepatocellular carcinoma MHCC-97H cells through NF- $\kappa$ B signaling," *Med. Sci. Monit.*, 2016.
- [182] J. X. Ma, Y. L. Sun, Y. Q. Wang, H. Y. Wu, J. Jin, and X. F. Yu, "Triptolide induces apoptosis and inhibits the growth and angiogenesis of human pancreatic cancer cells by downregulating COX-2 and VEGF," *Oncol. Res.*, 2013.
- [183] Y. Liu, E. Xiao, L. Yuan, and G. Li, "Triptolide synergistically enhances antitumor activity of oxaliplatin in colon carcinoma in vitro and in vivo," *DNA Cell Biol.*, 2014.
- [184] J. X. Ma, Y. L. Sun, Y. Yu, J. Zhang, H. Y. Wu, and X. F. Yu, "Triptolide enhances the sensitivity of pancreatic cancer PANC-1 cells to gemcitabine by inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling," *Am. J. Transl. Res.*, 2019.
- [185] X. Tong *et al.*, "Combined treatment with triptolide and tyrosine kinase inhibitors synergistically enhances apoptosis in non-small cell lung cancer H1975 cells but not H1299 cells through EGFR/Akt pathway," *Chem. Pharm. Bull.*, 2019.
- [186] P. Noel, D. D. Von Hoff, A. K. Saluja, M. Velagapudi, E. Borazanci, and H. Han, "Triptolide and Its Derivatives as Cancer Therapies," *Trends in Pharmacological Sciences.* 2019.
- [187] Si-Xun Yang, Han-Lin Gao, Shu-Sheng Xie, Wen Ren Zhang, and Zhen-Zhou Long, "Immunosuppression of triptolide and its effect on skin allograft survival," *Int. J. Immunopharmacol.*, 1992.
- [188] S. Banerjee *et al.*, "Triptolide-induced cell death in Pancreatic cancer is mediated by O-GlcNAc modification of transcription factor Sp1," *J. Biol. Chem.*, 2013.
- [189] J. Zhu *et al.*, "Triptolide enhances chemotherapeutic efficacy of antitumor drugs in non-small-cell lung cancer cells by inhibiting Nrf2-ARE activity," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2018.
- [190] M. Frumovitz *et al.*, "Lymphadenectomy in Locally Advanced Cervical Cancer Study (LiLACS): Phase III Clinical Trial Comparing Surgical With Radiologic Staging in Patients With Stages IB2-IVA Cervical Cancer," *J. Minim. Invasive Gynecol.*, 2014.
- [191] P. Yan and X. Sun, "Triptolide: A new star for treating human malignancies," *Journal of Cancer Research and Therapeutics.* 2018.
- [192] R. Soundararajan, R. Sayat, G. S. Robertson, and P. A. Marignani, "Triptolide: An inhibitor of a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) in cancer cells," *Cancer Biol. Ther.*, 2009.
- [193] X. X. Li, F. Y. Du, H. X. Liu, J. B. Ji, and J. Xing, "Investigation of the active components in Tripterygium wilfordii leading to its acute hepatotoxicity and nephrotoxicity," *J. Ethnopharmacol.*, 2015.
- [194] M. Hasanpourghadi, N. A. Majid, and M. R. Mustafa, "Activation of autophagy by stress-activated signals as a cellular self-defense mechanism against the cytotoxic effects of MBIC in human breast cancer cells in vitro," *Biochem. Pharmacol.*, 2018.
- [195] L. Vera-Ramirez, S. K. Vodnala, R. Nini, K. W. Hunter, and J. E. Green, "Autophagy promotes the survival of dormant breast cancer cells and metastatic

- tumour recurrence,” *Nat. Commun.*, 2018.
- [196] K. E. Friend, “Cancer and the potential place for growth hormone receptor antagonist therapy,” *Growth Hormone and IGF Research*. 2001.
- [197] S. E. Brunet-Dunand *et al.*, “Autocrine human growth hormone promotes tumor angiogenesis in mammary carcinoma,” *Endocrinology*, 2009.
- [198] D. T. Lincoln, P. K. Singal, and A. Al-Banaw, “Growth hormone in vascular pathology: Neovascularization and expression of receptors is associated with cellular proliferation,” *Anticancer Res.*, 2007.
- [199] S. Seoane, M. Alonso, C. Segura, and R. Pérez-Fernández, “Localization of a negative vitamin D response sequence in the human growth hormone gene,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002.
- [200] X. F. Yang, W. G. Beamer, H. Huynh, and M. Pollak, “Reduced growth of human breast cancer xenografts in hosts homozygous for the lit mutation,” *Cancer Res.*, 1996.
- [201] D. Gunnell, M. Okasha, G. Davey Smith, S. E. Oliver, J. Sandhu, and J. M. P. Holly, “Height, Leg Length, and Cancer Risk: A Systematic Review,” *Epidemiol. Rev.*, 2001.
- [202] A. J. Swerdlow, C. D. Higgins, P. Adlard, and M. A. Preece, “Risk of cancer in patients treated with human pituitary growth hormone in the UK, 1959-85: A cohort study,” *Lancet*, 2002.
- [203] Y. Chen and F. Brandizzi, “IRE1: ER stress sensor and cell fate executor,” *Trends in Cell Biology*. 2013.
- [204] N. Rampino *et al.*, “Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype,” *Science (80-. )*, 1997.
- [205] M. Lamkanfi, N. Festjens, W. Declercq, T. Vanden Berghe, and P. Vandenameele, “Caspases in cell survival, proliferation and differentiation,” *Cell Death and Differentiation*. 2007.
- [206] G. V. Chaitanya, J. S. Alexander, and P. P. Babu, “PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration,” *Cell Communication and Signaling*. 2010.
- [207] D. Hockenbery, G. Nuñez, C. Milliman, R. D. Schreiber, and S. J. Korsmeyer, “Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death,” *Nature*, 1990.
- [208] S. Pattingre *et al.*, “Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy,” *Cell*, 2005.

## EKLER

**Tablo 4. Alt ve üst jel içerikleri**

dH <sub>2</sub> O	3,4 ml
1,5M Tris-HCl	2,5 ml
% 10 SDS	0,1 ml
Akrilamid	4 ml
%10 Amonyum Persülfat	75 µl
TEMED	10 µl

### Alt jel

dH <sub>2</sub> O	3,075 ml
0,5 M Tris-HCl	1,25 ml
% 10 SDS	0,05 ml
Akrilamid	0,67 ml
%10 Amonyum Persülfat	0,04 ml
TEMED	0,01 ml

**Tablo 5. Kullanılan cihazların listesi**

<i>ADI</i>	<i>ÜRÜN KODU</i>	<i>FİRMA ADI</i>
UV-Transluminatör	GelDOC	BioRad
Santrifüj	5417R	Eppendorf
Spin mini spin plus	SN0708	LabNet
Yatay elektroforez sistemi	Gel XL ultra V-2	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EH52836	Thermo
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo
Mikropipet (200µl-1000µl)	T27274	Thermo
Otoklav	OTO32	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab

Distile Su Cihazı	TANKPE030	Millipore Direct Q- 5UV
pH Metre	N315	SEM/Mettler Toledo
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
Dry heat sterilizer	FN120	Nüve
Spektrofotometre	Ultraspec 2100 pro	Biosciences
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Inverted Mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
İnkübatör	Heracell	Thermo
Floraslan Mikroskobu	Model: 1X71	Olympus
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer, U725 innova	New Brunswick Scientific
Elektroforez Aletleri	BioRad	
Facs Flow Cihazı	AC6531180147	BD ACURI C6

**Tablo 6. Hücre kültürü donanımları**

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
12 kuyucuklu petri	92012	TPLP
6 kuyucuklu petri	92006	TPLP
96 kuyucuklu petri	92096	TPLP
75cm <sup>2</sup> hücre büyütme kapları	90076	TPLP
25cm <sup>2</sup> hücre büyütme kapları	90026	TPLP
100mm hücre büyütme kapları	93100	TPLP

60mm hücre büyütme kapları	93060	TPLP
Steril pipetler (5ml)	94005	TPLP
Steril pipetler (10ml)	94010	TPLP
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPLP
Enjektör seti	21G Yeşil uç iğneli	ASTRAJECT
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Fetal Bovine Serum	10500-064	Gibco
DMEM Medium	41966-029	Gibco
MCF-7 hücreleri	61062004	ATCC
MDA-MB-231 hücreleri	61093072	ATCC

**Tablo 7. Kullanılan kimyasalların listesi**

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Etanol	CAS 64-17-5	ALKO MED
Saf Etanol	32221	SIGMA-ALDRICH
Metanol	24229	SIGMA-ALDRICH
İzopropanol	K44518295 321	MERCK
2-merkaptotanol	S4805940 517	MERCK

Akrilamid / Bis-Akrilamid 30% çözelti	A9099	SIGMA-ALDRICH
Amonyum persülfat	A2941	Applichem
Coomassie Blue Belirteci	A3480	Applichem
DMSO	K46505343 517	MERCK
DMSO	D2650	SIGMA-ALDRICH
EDTA	A2937	Applichem
DIOC <sub>6</sub> Boya	2129966	Fluka

DCFH-DA Boya	C6827	Invitrogen
4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride	D1306	Thermo Scientific
PI Boya	P4170-100MG	SIGMA-ALDRICH
Fetal Bovine Serum (FBS)	P290310	Pan Biotech
Laemli Tamponu	S3401-1V	SIGMA
p-Coumaric Asid	C9008-1G	SIGMA-ALDRICH
Luminol	A2185	Applichem
MTT Solüsyonu	M2128-5G	SIGMA-ALDRICH
Phosphate buffered saline (PBS)	BE17-51-5F	LONZA
Sığır Serum Albumin (PSA)	A2153-10G	SIGMA-ALDRICH
SDS (Sodyum dedosil sülfat)	UN1888	Applichem
Protein İzolasyonu Tamponu	78501	Thermo
Page Ruller Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fermentas
Agaroz	A9539	SIGMA-ALDRICH
Tris Baz	648310	CALBIOCHEM
Asetik Asid	27225	SIGMA-ALDRICH
Ethidium Bromide	E1510	SIGMA-ALDRICH
Tris-HCl	648317	CALBIOCHEM
1 kb Marker	SM1163	Fermentas
6X yükleme Tamponu	R0631	Fermentas



Amonyum Asetat	1,110115,1000	MERCK
Fenol Kloroform	A2279,0250	Appllichem

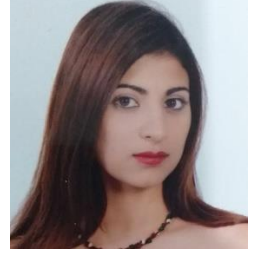
Triptolid	C1386-10G	SIGMA-ALDRICH
Sodyum Klorür	A2941	Appllichem
Tween 20	S6740684 348	MERCK
TEMED	A1148,0100	Appllichem
Yağsız Süt Tozu	SC-2325	Santa Cruz Biotechnology
Glisin	3570	CALBIOCHEM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hidrojen peroksi	K39218400838	MERCK
ExPrime Taq PCR Kiti	G-4000	Genet Bio
Trizol	10296010	Thermo
Tripure	11 667 165 001	Roche
Rnase Free Water	42480093	QIAGEN
iScript cDNA Sentez Kiti	1708891	Bio Rad
Human GH ELISA	GR180572-1	Abcam
Millipore Falcon Centrifugal Filters	4FC901024	MERCK
Neomisin	G8168	SIGMA-ALDRICH
Invasion Chamber	354483	BD Bioscience
Super Block T20 Blocking Buffer	37536	Thermo
FuGENE® 6 Transfection Reagent	E2692	Promega
Ponceau Read Belirteci	A1405	Appllichem
Hidroklorik Asit	K43804717 239	MERCK
Kloroform	UN1888	Appllichem
Kristal Viyole	FN1048735	MERCK

**Tablo 8. %12'lik SDS-PAGE Jel içeriği**

<b>Alt Jel</b>	<b>Üst Jel</b>	
<b>Distile su</b>	3,4 ml	3,075 ml
<b>Tris-HCl</b>	2,5ml (1,5M, pH: 8,8)	1,125ml (0,5M, pH: 6,8)
<b>%10 SDS</b>	0,1 ml	0,05ml
<b>Akrilamid/Bis-Akrilamid</b>	4 ml	0,67 ml

<b>Amonyum Persulfat (APS)</b>	0,05 ml	0,025ml
<b>TEMED</b>	0,005ml	0,005ml
<b>TOPLAM</b>	10,005 ml	5,05ml

# ÖZGEÇMİŞ



## KİŞİSEL BİLGİLERİ

Adı-Soyadı: Amani BDULMUNEM

Uyruğu: Irak.

Doğum Tarihi: 21/04/1992.

Doğum Yeri: Bağdat

Medeni Durum: Bekâr

## İLETİŞİM BİLGİLERİ

Tel: +90 5379481808

E-posta: [ghnoalshikhly@gmail.com](mailto:ghnoalshikhly@gmail.com)

Adres: Hürriyet Mahallesi, Papağan Sokak No:2 D:1 Esenyurt/ İstanbul

## EĞİTİM BİLGİLERİ

2017-2019

T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik- Yüksek Lisans

2014-2015

T.C. İstanbul Aydın Üniversitesi -TÖMER

2010-2014

Bengazi Üniversitesi -Fen fakültesi- kimya bölümü- Lisans (Libya)

2006-2009

28<sup>th</sup> March Okulu- lise (Libya)

2003- 2006

11<sup>th</sup> June Okulu- Orta öğretim (Libya)

1997-2003

11<sup>th</sup> June okulu – İlköğretimi (Libya)

## **YAYINLAR**

### **Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler**

1. **Amani Abdulmunem**, Pınar Obakan Yerlikaya, Elif Damla Arısan, Ajda Coker Gurkan. “Autocrine Growth Hormone mediated triptolide resistance overcome by metformin co treatment in MDA MB 231 breast cancer cells through ER stress pathway” 3rd NPCPT Congress, Kayseri-TURKEY, 18-20 December 2019

## **LABORATUVAR DENEYİMİ**

Cihazlar: Mikroskop, Santrifüj cihazları, PCR, PI Fax Flow cihazları (Hücre Kültürü, RealTime PCR- qRT PCR, Transfection, Western Blot).

## **YABANCI DİL BLGİSİ**

Arapça Ana dil

İngilizce Okuma, yazma, konuşma, dinleme ileri seviyede

Türkçe Okuma, yazma, konuşma, dinleme ileri seviyede

Almanca Okuma, yazma, konuşma, dinleme başlangıç seviyede

## **REFERANSLAR**

Prof. Dr. Ajda Çoker GÜRKAN- İstanbul Kültür Üniversitesi Öğretim Üyesi Tel: 0212498 4565

Prof. Dr. El-Hashani ASHRAF Bengazi Üniversitesi Öğretim Üyesi

Tel: 05535655701 E-Posta: [aiiya600@yahoo.co.uk](mailto:aiiya600@yahoo.co.uk)

Dr. Fariha Getlawi Bengazi Üniversitesi Öğretim Üyesi

E-Posta: [farihagetlavi@gmail.com](mailto:farihagetlavi@gmail.com)