



**FARE MEME KANSER HÜCRELERİNDE TAXİFOLİN VE
EPİRUBİCİN'İN EPİTELYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞ ÜZERİNE İN
VİTRO VE İN VİVO ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Muhammet OCAK

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

NİSAN 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Muhammet OCAK

02/04/2024

FARE MEME KANSER HÜCRELERİNDE TAXİFOLİN VE EPİRUBİCİN'İN
EPİTELYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞ ÜZERİNE İN VİTRO VE İN VİVO
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ
(Doktora Tezi)

Muhammet OCAK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Nisan 2024

ÖZET

Kadınlarda dünyada en sık insidansa sahip kanser türü olan meme kanseri, ölüm riski kanserin metastaz sürecinin akıbetine göre artabilmektedir. Metastazın en önemli mekanizması olan Epitelyal-mezenkimal geçiş sürecinin anlaşılması ve buna bağlı olarak tedavi yöntemleri geliştirilmesi çok önemlidir. Epirubisin günümüzde kanser tedavisinde kullanılan antrasiklin ailesine mensup bir kemoterapi ilacıdır. Kanser hücrelerinde DNA moleküllerine interkalasyon yaparak bağlanarak işlev görürler. Yapılan son çalışmalarda epirubisin gibi kemoterapi ilaçlarının etkisini indükleyici ajan olarak fitokimyasallar ilgi çekmiştir. Bir fitokimyasal ailesi olan Flavonoidlerin bir üyesi olan taksifolinin kanser üzerindeki rolü henüz tam anlaşılamamıştır. Bu çalışmada epitelyal-mezenkimal geçiş sürecinde taksifolinin üçlü negatif meme kanserinin in vitro ve in vivo modellerinde tek başına, ya da epirubisin ile kombine olarak uygulanmasıyla ortaya çıkan gen-protein düzeyine olan etkileri araştırılmıştır. Çalışmalarda ilaçların tek başına ya da kombine kullanımının in vitro düzeyde hücre canlılığı ve sitotoksik etkisi 4T1 fare meme kanser hücre hatlarında araştırılmıştır. Taksifolinin hücre canlılığını epirubisin ile kombine uygulamada anlamlı bir şekilde azalttığı görülürken, sitotoksiteyi de tekil uygulamalara göre azalttığı saptanmıştır. In vivo modellerde ise, 4T1 fare meme kanser hücreleri kullanılarak meme kanseri modeli oluşturulan balb/c farelerinden oluşan gruplarda taksifolinin yalnız ve kombine bir şekilde uygulandığında epitelyal-mezenkimal geçiş sürecinde rol alan genler olan N-kaderin, Vimentin, Slug, Snail, β -katenin, Zeb1, Zeb2 genlerinde önemli ölçüde ifadenmeyi azalttığı E-kaderin geninde ise artırdığı bulunmuştur. Bununla birlikte protein düzeyinde yapılan çalışmalarda taksifolinin epirubisin ile kombine uygulandığı gruplarda, tekil muamele edilen gruplara oranla gen ifadenmesine benzer sonuçlar bulunmuştur. Bu çıktılar, taksifolin flavonoidinin epirubisin kemoterapi ilacı ile uygulanmasının üçlü negatif meme kanserine karşı in vitro ve in vivo çalışmalarda korelasyon göstererek gen-protein düzeyinde hastalığın tedavisine olumlu bir etkisi olduğunu göstermiştir. Bu sebeple taksifolin potansiyel bir terapötik ilaç ve kemoterapi yardımcı ajanı olarak ileriye dönük çalışılabilir.

Bilim Kodu : 1055.1
Anahtar Kelimeler : Epirubisin, Taksifolin, Epitelyal-Mezenkimal Geçiş, Üçlü Negatif Meme Kanseri, Metastaz
Sayfa Adedi : 57
Danışman : Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM

DETERMINATION OF IN VITRO AND IN VIVO EFFECTS OF TAXIFOLIN AND
EPIRUBICIN ON EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN MOUSE BREAST
CANCER CELLS

(Ph D. Thesis)

Muhammet OCAK

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

April 2024

ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of cancer in women in the world, and the risk of death may increase according to the outcome of the metastasis process of the cancer. It is very important to understand the epithelial-mesenchymal transition process, which is the most important mechanism of metastasis, and to develop treatment methods accordingly. Epirubicin is a chemotherapy drug belonging to the anthracycline family, which is currently used in cancer treatment. They function by intercalating with DNA molecules in cancer cells. In recent studies, phytochemicals have attracted attention as an inducing agent of chemotherapy drugs such as epirubicin. The role of taxifolin, a member of a family of phytochemicals, the Flavonoids, on cancer is not yet fully understood. In this study, the effects of taxifolin on the gene-protein level in the epirubicin-mesenchymal transition process in in vitro and in vivo models of triple negative breast cancer, either alone or in combination with epirubicin, were investigated. In the studies, cell viability and cytotoxic effects of the use of drugs alone or in combination in vitro were investigated in 4T1 mouse breast cancer cell lines. Taxifolin was found to significantly reduce cell viability in combination with epirubicin, while it was found to reduce cytotoxicity compared to single applications. In in vivo models, it was found that when taxifolin was administered alone or in combination in groups of balb/c mice in which breast cancer model was created using 4T1 mouse breast cancer cells, it significantly decreased the expression of N-cadherin, Vimentin, Slug, Snail, β -catenin, Zeb1, Zeb2 genes, which are the genes involved in the epithelial-mesenchymal transition process. However, in studies conducted at the protein level, similar results were found in gene expression in groups where taxifolin was administered in combination with epirubicin compared to groups treated individually. These outputs showed that the co-administration of the taxifolin flavonoid with epirubicin chemotherapy drug had a positive effect on the treatment of the disease at the gene-protein level by correlating in vitro and in vivo studies against triple negative breast cancer. Therefore, taxifolin can be studied further as a potential therapeutic drug and chemotherapy adjuvant.

Science Code : 1055.1

Key Words : Epirubicin, Taxifolin, Epithelial-Mesenchymal Transition, Triple Negative Breast Cancer, Metastasis

Page Number : 57

Supervisor : Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM

TEŞEKKÜR

Başta eğitimime katkıları, yadsınamaz ilgisi, ilham verici eğitimi ve bana verdiği emekleri için ve ardından tez konumun seçilmesinden sonlandırılmasına kadar olan vakitte bana herşeyin yolunu göstererek, beni yalnız bırakmadığı için danışman hocam Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a,

Doktora eğitimim süresince bilgi ve birikimini benimle paylaşan, doktora tez izleme komitemde yer alan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ece KONAÇ'a ve doktora tez izleme komitemde yer alan ve desteklerini benden esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU'na,

Doktora eğitimim süresince bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan Anabilim Dalımız değerli öğretim üyelerine,

Tez projemi bitirmemde ve tezimi yazmamda değerli yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, yol gösteren Dr. Duygu Deniz USTA SALİMİ'ye

Doktora eğitimim süresince desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Arş. Gör. Ayşe AKSOY'a,

Doktora eğitimi sürecimde her zaman beni destekleyen ve yanımda olan eşim Hale Nur SOFUOĞLU OCAK'a, bana manevi desteğini esirgemeyen oğlum Melikşah OCAK ve hali hazırda dünyaya gelmek üzere olan evladımıza,

Doktora eğitimim ve bütün hayatım boyunca yanımda olup beni maddi ve manevi ne olursa olsun destekleyen babam Kasım OCAK, annem Fahriye OCAK, kız kardeşlerim Özge OCAK, Hatice OCAK BABUŞ ve eşi Dt. Doğukan BABUŞ'a, teşekkürü bir borç bilir, minnettarlığımı sunarım.

Bu tez çalışması, TDK-2021-7081 proje kodu ile Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından desteklenmiş olup, desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2. Meme Kanseri	3
2.3. Üçlü Negatif Meme Kanseri	4
2.4. Epitelial-Mezenkimal Geçiş.....	4
2.5. EMT ve Kanser İlişkisi	5
2.6. Antrasiklinler.....	7
2.7. Epuribicin.....	7
2.8. Flavonoidler	8
2.9. Taksifolin	9
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	11
3.1. Kullanılan Gereçler	11
3.1.1. Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler	11
3.1.2. Kullanılan kitler ve hücre hattı	12
3.1.3. Kullanılan kimyasallar.....	12

Sayfa

3.1.4. Kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanışı	13
3.2. Metod ve Yöntemler	17
3.2.1. In vitro deneyler.....	17
3.2.2. In Vivo deneylerde kullanılacak singeneik tümör modeli ve ilaç tedavisi	18
4. BULGULAR	27
4.1. Tax ve EPI'nin Hücre Canlılığına Etkisi	27
4.2. Tax ve EPI'nin Sitotoksosite Üzerine Etkisi.....	28
4.3. Vücut Ağırlıkları ve Tümör Hacimlerinin Değerlendirilmesi.....	29
4.4. Tax ve EPI'nin Kaspaz-3/7 seviyelerine In Vivo Etkisi	31
4.5. Hematoksilen- Eozin Sonuçları.....	32
4.6. Tax ve EPI'nin EMT ilişkili Genlerin In vivo mRNA Seviyelerine Etkisi	33
4.7. Tax ve EPI'nin EMT ilişkili Proteinlerin Protein Seviyelerine Etkisi.....	34
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	45
EKLER.....	53
EK-1. Etik Kurul Onayı	54
ÖZGEÇMİŞ	56

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Farklı yüzdelerde hazırlanan yığılma ve ayırma jellerinin madde miktarları	17
Çizelge 3.2. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları	23
Çizelge 3.3. Gen spesifik qPCR primer dizileri.....	23
Çizelge 3.4. GAPDH, E-kaderin, N-kaderin, β -katenin, Vimentin, Snail, Slug, Zeb1 ve Zeb2 Real-time PCR tepkime karışımı	24
Çizelge 3.5. PCR amplifikasyon programı	24

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. 1-500 μ M Tax (a), 0.1-100 μ M EPI uygulanmış 4T1 hücrelerinin (b) 24, 48 ve 72 saatlerde hücre canlılığı. 24 ve 48. saatlerde Tax ve EPI kombinasyonunun (c) seçilen konsantrasyonlarının 4T1 hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	27
Şekil 4.2. Tax ve EPI sinerjistik etkileri için kombinasyon indeksi (CI) analizi.....	28
Şekil 4.3. Tax ve/veya EPI'nin 4T1 hücrelerinde LDH salınımı ile belirlenen sitotoksite üzerindeki etkisi.	29
Şekil 4.4. Kontrol ve tedavi gruplarında haftada bir ölçülen tümör hacmi değişiminin gösterilmesi.	30
Şekil 4.5. BALB/c farelerinde Tax ve/veya EPI'nin vücut ağırlıkları (a) ve tümör hacimleri (b) üzerindeki etkileri.....	31
Şekil 4.6. Tax ve/veya EPI'nin tümör dokularındaki kaspaz-3/7 aktivite seviyeleri üzerindeki etkileri.	32
Şekil 4.7. Tax ve/veya EPI'nin tümör dokularında EMT ile ilişkili mRNA düzeyleri üzerindeki etkileri.....	34
Şekil 4.8. Tax ve/veya EPI'nin tümör dokularındaki EMT ile ilişkili protein seviyeleri üzerindeki etkileri.....	35

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. 4T1 hücresi taşıyan BALB/c farelerin farklı tedavilerle fotoğrafları (a). Deney sonunda gruptan çıkarılan tümör dokularının fotoğrafları (b). EPI: Epirubisin, Tax: Taksifolin.....	30
Resim 4.2. Her bir grup için (a) Kontrol grubu, (b) Tax ile tedavi edilen grup, (c) EPI ile tedavi edilen grup ve (d) Tax + EPI ile tedavi edilen grubu gösteren meme tümörü doku kesitleri.	33



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
-----------------	--------------------

⊙	İnfiltrasyon
%	Yüzde
μm	Mikrometre
cm	Santimetre
cm ²	Santimetrekare
CO ₂	Karbondioksit
dak	Dakika
M	Molarite
mg	Miligram
ml	Mililitre
mol	Mol sayısı
nm	Nanometre
°C	Santigrat
rpm	Dakikada devir
V	Volt
W	Watt

Kısaltmalar	Açıklamalar
--------------------	--------------------

APS	Amonyum Persülfat
BCA	Bikinkoninik Asit
BSA	Bovine Serum Albumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
Du	Duktus

Kısaltmalar	Açıklamalar
EBCTCG	Erken Meme Kanseri Araştırmacılarının İş Birliği Grubu
ECL	Enhance Kemülimünesans
ECM	Ekstrasellüler Matriks
EMT	Endotelial -Mezenkimal Transisyon
EPI	Epirubisin
ER	Östrojen Reseptörü
FBS	Fetal Bovine Serum
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
H₂O	Su
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HCL	Hidroklörik Asit
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HRP	Horseradish Peroxidase
İ.K.	İntrakardiyak
İ.V.	İntravenöz
LDH	Laktat Dehidrojenaz
MET	Mezenkimal Endotelial Transisyon
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroföresi
PBS	Phosphate Buffer Saline
pH	Asitlik Bazlık değeri
PMSF	Fenilmetilsülfonilflorid
PVDF	Polivinilidin Florür
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medyum
S.C.	Subkutan
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Tax	Taksifolin
TBS-T	Tris Buffer Saline – Tween 20
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
TEMED	Tetramethylethylenediamine

Kısaltmalar**Açıklamalar****TNBC**

Üçlü Negatif Meme Kanseri

UV

Ultraviyole

WHO

Dünya Sağlık Örgütü



1. GİRİŞ

Meme kanseri tüm dünyada görülme sıklığı en çok olan ve kadınlarda en sık tanı konan kanser olup, kanserden ölüm sebepleri arasında önemli bir yer tutmaktadır [1-4]. Üçlü negatif meme kanseri (TNBC), insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2), progesteron reseptörü (PR) ve östrojen reseptörü (ER) ekspresyonu içermeyen (ER-/PR-/HER2-) meme kanseri alt tipidir [5-8]. TNBC tüm invaziv meme kanseri hastalarının %15-20'sini oluşturmaktadır ve meme kanseri alt grupları içerisinde eşsiz aksiyon mekanizması, yüksek invaziv karakteri, benzersiz metastaz eğilimi ve hedefe yönelik tedavilere elverişli olmaması ile karakterizedir [4,5]. TNBC, neoadjuvan tedaviye diğer meme kanseri alt gruplarından daha iyi yanıt verse de genellikle kötü bir prognoza sahiptir. Ancak şu ana kadar TNBC için özel bir tedavi yaklaşımı geliştirilememiştir. [6-8].

Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT), hücrelerin morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere uğramasıyla, epitel hücrelerinin özelliklerini kaybedip mezenkimal özellikler kazandığı önemli bir süreçtir. [9]. EMT embriyonik gelişim, yara iyileşmesi ve tümör hücrelerinde görülen bir mekanizmadır. Tümör hücrelerinde, Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT), epitel hücrelerinden mezenkimal hücrelere farklılaşmayı teşvik eden transkripsiyon faktörlerinin salınımı ile başlar. Bu süreç sonucunda epitelyal hücreler, invazyon ve apoptoza direnç kapasitesine sahip mezenkimal türevlerine dönüşür [9-11]. EMT'yi başlatan uyarılar genellikle intrinsik (gen mutasyonları) veya ekstrinsik (büyüme faktörleri) olabilir. EMT sürecinde epitel hücreleri moleküler olarak yeniden programlanmaktadır ve bu süreçte görevli çeşitli belirteçler tanımlanmıştır. EMT, E-kaderin ve β -katenin gibi epitelyal fenotip belirteçlerinin kaybı ile vimentin ve N-kaderin gibi mezenkimal moleküllerin kazanımı sonucu hücre polaritesinin bozulması, hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi ve hücre göçü ile karakterizedir. Ayrıca, kanser hücrelerinde EMT'nin apoptotik hücre ölümünü tetikleyebilecek koşullar ile daha fazla ilişkili olduğu gösterilmektedir. Mezenkimal fenotipi sergileyen meme kanseri hücreleri, epitelyal fenotipe kıyasla kemoterapötik ajanlara nispeten daha dirençlidir [9-13].

Antineoplastik bir ajan olan epirubisin (EPI), doksorubisinin 4'-epimeri (4' epidoksorubisin) olup antrasiklin türevidir. EPI, doksorubisinin 4' pozisyonundaki hidroksil grubunun epimerizasyonu ile karakterize edilir [14,15,17]. Doksorubisin ve EPI'nin etki spektrumları birbirlerine benzer olmakla birlikte, doksorubisin'den daha iyi bir terapötik etkiye sahiptir.

Ayrıca, benzer dozlarda daha az hematolojik ya da kardiyak toksisiteye sahiptir. EPI, DNA baz çiftleri arasında interkalasyon yaparak heliks şeklindeki yapının değişmesine ve böylece nükleik asit (DNA ve RNA) sentezinin inhibisyonuna neden olur. DNA konformasyonundaki bu değişiklik, DNA polimerazın etkilenmesi sonucunda DNA zincirinin uzamasını engelleyebilir. Aynı zamanda, RNA polimerazın inhibe olmasıyla transkripsiyon süreci etkilenir ve bu da protein sentezini engelleyebilir [14,16]. Öte yandan, EPI, topoizomera II enziminin konfigürasyonel sıkışmasına, başlangıçtaki enzim-DNA kompleksinin stabil konformasyon kazanmasına ve çift zincir kırıklarına neden olabilir. EPI, aynı zamanda, çift iplikli DNA'nın enzimatik ayrılmasını önleyerek replikasyonu engeller ve DNA helikaz aktivitesini inhibe eder [15]. Ayrıca, EPI serbest radikaller üreterek oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarında da yer almaktadır. Bu nedenle meme, servikal, akciğer ve yumurtalık kanseri dahil olmak üzere geniş bir tümör yelpazesi için terapötik bir ajan olarak kullanılır. Ayrıca EPI, ROS oluşumunu indükleyebilir ve tümör hücrelerine karşı güçlü apoptotik etkiler sergiler [17]. EPI, etkili antikanser aktivitesi nedeniyle meme kanseri tedavi rejimlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Yapılan çalışmalarda fitokimyasalların kemoterapötik ajanlar ile birlikte uygulanmasının sinerjistik bir etki yaratarak etkin dozu düşürdüğü, toksisite ve yan etkileri azalttığı böylelikle terapötik cevabı artırdığı gösterilmiştir. Günümüzde, meme kanseri tedavisi için klasik kemoterapi ajanlarına destek olarak oksidatif süreci inhibe eden, anti-inflamatuvar ve anti-kanser özellik gösteren fitokimyasal ajanların birlikte uygulanması sonucu daha etkin tedavi seçenekleri belirlenmeye çalışılmaktadır. Flavonoidlerin alt sınıfından flavanon grubuna ait olan Taksifolin (Tax; 3,5,7,3,4-pentahydroxy flavanone veya dihydroquercetin) güçlü bir flavonoiddir. Turunçgiller ve soğan bol miktarda taksifolin içermektedir [18,19]. Tax'ın, anti-oksidan, anti-hiperürisemik, kardiyak korunum, anti-anjiyogenez ve benzeri dahil olmak üzere kapsamlı bir farmakolojik aktiviteye sahip olmasının yanı sıra anti-karsinojenik etkileri de yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [20-23]. Günümüzde Tax, meme, kolon, deri kanseri, osteosarkom, Ewing sarkomu ve prostat kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde potansiyel bir antineoplastik ajan olarak tanımlanmıştır [23-26].

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, küresel düzeyde en yaygın ölüm sebebidir. Erkeklerde kanser prevalansı en yüksek kanserler sırasıyla prostat, akciğer, kolon iken, kadınlarda meme, akciğer, kolon, uterin korpus ve tiroid'tir. İstatistikler, prostat kanserinin erkeklerde, meme kanserinin ise kadınlarda kanser vakalarının büyük bir oranını oluşturduğunu göstermektedir [3,4]. Kanser, birbirini izleyen bir dizi mutasyon sebebiyle oluşur ve bu mutasyonlar hücre işlevlerini değiştirir. Kimyasal bileşikler, çevresel şartlar, tüketilen yiyecekler, sigara gibi alışkanlıklar gen mutasyonlarına yol açarak kansere sebep olabilir [6-8]. Kanserojen nitelik taşıyan kimyasal maddeler, hücrelerin sitoplazma ve çekirdek gibi önemli bileşenlerini direkt veya dolaylı olarak etkileyerek genetik bozukluklara ve gen mutasyonlarına sebep olabilirler. [9] Virüsler, bakteriler ve radyasyon ışınları diğer kanserojen faktörlerdir ve tüm kanserlerin yaklaşık %7'sini oluşturur [10]. Genel olarak, kanser hücrel etkileşimleri değiştirir ve temel genleri işlevsiz hale getirir. Proto-onkogenler normalde hücre büyümesini ve bölünmesini desteklerken, mutasyon sonucu onkogenlere dönüşürler [10-13]. Yine mutasyon sonucu tümör baskılayıcı genler tarafından kontrolsüz hücre bölünmesi ve kanserleşme uyarılır [11].

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlarda en yaygın teşhis edilen kanserdir ve toplam kanser teşhislerinin %23'ünü oluşturmaktadır. Meme kanseri sıklığı tüm dünyada artmaktadır ve teşhis tekniklerindeki gelişmelere ve tedavi yöntemlerindeki iyileştirmelere rağmen kadınlarda kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir. Ölüm oranı birçok gelişmiş ülkede azalmakla birlikte farklı meme kanseri türleri, ortak bir orijin dokusuna rağmen önemli ölçüde heterojenlik gösterir [5-8]. Meme kanserini moleküler ve genetik düzeyde alt tiplendirmek ve tanı anında tedavi modalitelerinin seçimi ve hastalığın prognozu için çeşitli klinik, patolojik ve moleküler faktörleri belirlemek için kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Meme kanserleri, mevcut hedefli tedavileri yansıtan hücrel belirteçlere dayalı olarak üç ana gruba ayrılır: progesteron reseptörü (PR) ve östrojen reseptörü (ER) pozitif; ER ve PR pozitifliği olan veya olmayan insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) pozitif (erbB2 amplifikasyonu) ve ER/PR ekspresyonu ve HER2 amplifikasyonunun olmaması ile

tanımlanan üçlü negatif meme kanseri (TNBC). İlk iki kategori için hedefe yönelik tedavi mevcuttur, ancak TNBC için standart bir tedavi seçeneği yoktur. İmmünohistokimyasal belirteçler ve tamamlayıcı DNA (cDNA) mikrodizileri ile, prognoz ve ifade ettikleri terapötik hedefler açısından farklılık gösteren ve yukarıda bahsedilen histopatolojik kategorilere karşılık gelen meme kanserinin beş farklı alt tipi tanımlanmıştır; luminal A (ER pozitif ve/veya PR pozitif ve HER2 negatif), luminal B (ER pozitif ve/veya PR pozitif ve HER2 pozitif), HER2 aşırı ekspresyonu (ER ve PR negatif, HER2 pozitif), bazal benzeri (ER/ PR/HER2 negatif, sitokeratin 5/6 pozitif ve/veya epidermal büyüme faktörü reseptörü pozitif) ve normal meme benzeri [5,14].

2.3. Üçlü Negatif Meme Kanseri

TNBC, invaziv meme kanserlerinin %10-20'sini oluşturur ve birden fazla moleküler alt tipi kapsar. TNBC agresif bir fenotiptir, kötü bir prognoz taşır ve heterojen klinik sunum, davranış, patoloji ve tedaviye yanıt ile tutarlı bir meme kanseri alt grubunu temsil eder. Meme kanserinin temel özelliklerine bağlı olarak 3 ana alt-tip bulunur. Bunlar, tek başına östrojen/östrojen ve progesteron hormonları için reseptör içeren tipi (HR+), kanserin hızlı şekilde büyümesine sebep olan HER2 proteinini yüksek miktarda bulunduran (HER2+) ve son olarak bu 3 etmeni de negatif gösteren üçlü negatif meme kanseri [6-8].

2.4. Epiteliyal-Mezenkimal Geçiş

Epiteliyal-mezenkimal geçiş (EMT), bir epitel hücresinin polarize yapısının, bazal yüzey aracılığıyla bazal membranla etkileşime girerek, invazivlik, apoptoza karşı artan direnç ve hücre dışı matriks bileşenlerinin belirgin bir şekilde artan üretimi gibi çeşitli biyokimyasal değişikliklere uğradığı biyolojik bir süreçtir. Bu süreç, hücrenin gelişmiş göç yeteneği olan mezenkimal bir fenotipi benimsemesine olanak tanır [1,9,11]. EMT'nin tamamlanması, temeldeki bazal membranın zedelenmesi ve kaynaklandığı epitel tabakasından uzaklaşabilen bir mezenkimal hücrenin ortaya çıkmasıyla tanımlanabilir. EMT'yi başlatmak ve tamamlamak için çeşitli moleküler süreçler faaliyete başlar. Transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, spesifik hücre yüzeyi proteinlerinin ekspresyonu, hücre iskelet proteinlerinin yeniden düzenlenmesi ve ekspresyonu, ECM (Ekstraselüler Matriks)'yi parçalayan enzimlerin üretimi ve spesifik mikroRNA'ların ekspresyonundaki değişiklikler bu süreçlerden birkaçıdır [11-13]. Örneğin, Snail, Slug, Twist, ZEB-1 ve ZEB-2 gibi çeşitli

transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu EMT'nin başlatılmasında kritik bir rol oynar [27,28]. Bu transkripsiyon faktörleri, epitel hücrelerinin polarizasyonunu bozarak hücrelerin mezenkimal özellikler kazanmasını sağlar. Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi de EMT sürecinin önemli bir yönünü oluşturur. Bu süreçte, aktin filamentleri ve mikrotübüller gibi yapısal proteinlerin yeniden düzenlenmesi, hücrenin şeklinde ve migrasyon yeteneğinde değişikliklere yol açar. Ekstraselüler matriks (ECM) bileşenlerinin yeniden modellenmesi de EMT'nin önemli bir bileşenidir. Özellikle, metalloproteinazlar gibi enzimlerin ECM bileşenlerini parçalaması, hücrelerin invazivliğini artırır ve EMT'nin ilerlemesine katkıda bulunur [29,30]. EMT'nin klinik önemi, kanser metastazı gibi birçok patolojik süreçte ortaya çıkmasıyla vurgulanmaktadır. Özellikle, tümör hücrelerinin EMT yoluyla invaziv hale gelerek doku içinde ve dışında yayılması, kanserin ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Bu nedenle, EMT'nin anlaşılması ve hedeflenmesi, kanser tedavisindeki önemli bir alanı oluşturur. Son yıllarda yapılan çalışmalar, EMT'nin hücresel plastisiteyi düzenleyen çeşitli sinyal yolları aracılığıyla kontrol edildiğini ortaya koymuştur. Örneğin, Wnt, TGF- β , Notch ve Hedgehog gibi sinyal yolları, EMT'nin başlatılması ve ilerlemesinde kilit rol oynar [28,31]. Bu sinyal yolları, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu düzenleyerek ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini etkileyerek EMT'nin gerçekleşmesine katkıda bulunur. Bununla birlikte, EMT'nin tersine dönmesi veya MET (mezenkimal-epitelyal geçiş) adı verilen süreç, tümör hücrelerinin metastatik yayılımından kurtulmak için önemli bir adım olabilir. MET, metastatik lezyonlarda veya dolaşımdaki tümör hücrelerinde gerçekleşebilir ve bu süreç, hücrelerin mezenkimal fenotipten epitel fenotipte dönüşmesini içerir. Bu nedenle, MET indüksiyonunu hedefleyen tedavi stratejileri, E-cadherin ifadenmesinin artırılmasının hedeflenmesi metastazın kontrolü üzerinde potansiyel bir etkiye sahip olabilir [32,33].

2.5. EMT ve Kanser İlişkisi

Yüksek epitelyal hücre proliferasyonu ve anjiyogenez, primer epitelyal kanserlerin başlamasının ve erken büyümesinin ayırt edici özellikleridir. Bazal membran yoluyla lokal bir invazivlik gösterimiyle başlayıp sonra metastatik fonksiyonlar kazanarak farklı dokularda da faaliyet gösterip invaziv bir durum sergileme kabiliyetinin başlangıcı olarak kabul edilmektedir. İstilacı fenotipin kazanılmasının ve ardından kanser hücresinin sistemik yayılmasının altında yatan genetik kontroller ve biyokimyasal mekanizmalar yoğun araştırma alanları olmuştur [10,14]. Birçok deneysel hücre kültürü çalışması, karsinom

hücrelerinin bir mezenkimal fenotip alabildiğini ve vimentin, desmin gibi mezenkimal belirteçleri eksprese edebildiğini göstermiştir. Bu hücreler tipik olarak birincil tümörlerin invaziv cephesinde görülür ve invazyon-metastaz kaskadı, yani intravazasyon, dolaşım yoluyla taşıma, ekstrasvazasyon, mikrometastazların oluşumu ve kolonizasyon gibi adımlara giren hücreler olarak kabul edilir [9-12]. Temel bir epitelyal belirteç olan E-cadherin, hücre-hücre adezyonunun sürdürülmesinde ve EMT'nin baskılanmasında kritik bir rol oynamaktadır. E-cadherin ekspresyonunun kaybı EMT'nin iyi bilinen bir özelliğidir ve artan invazivlik ile ilişkilidir [27,34]. E-cadherin eksikliği, Snail ve Slug transkripsiyon faktörlerinin E-cadherin geninin promotor bölgesine bağlanarak ekspresyonunu baskılamasıyla gerçekleşir [35]. N-cadherin, tipik olarak nöral dokularda bulunan bir hücresel yapışma molekülüdür [36]. Mezenkimal bir belirteç olan N-cadherin, EMT başlangıcı sırasında ifade artışı göstererek hücre hareketliliği moleküler düzeyde kolaylaştırır. N-cadherin'in artan ifadesi, β -katenin görev aldığı Wnt sinyal yolunun aktivasyonu ile sağlanabilir. Bu durum, hücrelerin mezenkimal fenotipe geçişini destekler ve tümör invazivliğini artırır [37]. Son çalışmalar EMT süreçlerinin düzenlenmesinde E-cadherin ve N-cadherin arasındaki dinamik etkileşimi vurgulamaktadır [38,39].

Bir hücre iskeleti proteini olan Vimentin, EMT sırasında ifade artışına uğrayarak hücre hareketliliğinin ve istilasının artmasına katkıda bulunur [31,40]. Vimentin ekspresyonundaki artış, Wnt sinyal yolunun β -katenin aracılığıyla aktivasyonu ile tetiklenir [41]. Vimentin'in artan ifadesi, kanser hücrelerinin metastatik potansiyelini artırabilir ve invaziv olmalarını sağlayabilir [42]. Wnt sinyal yolunun bir bileşeni olan β -katenin, hem epitelyal hem de mezenkimal gen ekspresyonunu etkileyerek EMT düzenlemesinde ikili rol oynar [43,44]. β -katenin, Wnt sinyal yolunun bir bileşeni olarak, hücre yapışmasının ve sinyal iletiminin düzenlenmesinde görev alır. β -katenin'in aktivasyonu, EMT sürecinin başlatılmasına ve ilerlemesine katkıda bulunur. E-cadherin'in baskılanması, β -katenin'in hücre içine serbestçe geçmesine izin verir, böylece mezenkimal genlerin ekspresyonunu artırır ve hücrelerin mezenkimal fenotipe geçişini teşvik eder [45].

E-cadherin ekspresyonunu doğrudan baskıladığı bilinen transkripsiyon faktörleri Snail ve Slug, mezenkimal fenotipe geçişini teşvik etmede önemli rol oynamaktadır [46-48]. Slug ve Snail transkripsiyon faktörleri PLD2 (Fosfolipaz D) geninin kanser hücrelerindeki ifadesini farklı şekillerde düzenleyebilir. PLD2'nin çeşitli reaksiyonlardan oluşan ürünü olan fosfatidik asitin kendi üzerinde ve transkripsiyon faktörleri üzerinde önemli etkileri olduğu

ortaya konmuştur. EMT'nin regülasyonunda çeşitli sinyal yolları ve gen düzenleyicileriyle etkileşir, böylece EMT'nin karmaşıklığını artırarak baskılanmasını zorlaştırır. [49].

2.6. Antrasiklinler

Antrasiklinler, yanıt vermeyen birkaç kanser türü ile mevcut klinik kullanımda en etkili antineoplastik ajanlar arasında bir doğal antibiyotik sınıfıdır. Bu ailenin ilk temsili bileşikler, bir endüstriyel şirket (Farmitalia Research Laboratories, Milan) tarafından antitümör ajanlara yönelik sistematik bir araştırmanın parçası olarak Arcamone ve Di Marco tarafından aktinobakteri *Streptomyces peucetius*'un mutant bir suşundan izole edilmiştir. Daunorubisin 1964'te tanımlanmış, ardından 1969'da sırasıyla “daunomycin” ve “adriamycin” orijinal adlarıyla doksorubisin olarak tanımlanmıştır [2,14].

Keşfedilmelerinden bu yana yarım yüzyıl geçmesine rağmen, birinci nesil antrasiklinler hâlâ sıklıkla reçete edilmekte ve birçok kemoterapötik şemada temel dayanak noktası olarak varlığını sürdürmektedir. En güçlü ve yaygın olarak yararlı antikanser ilaçlar arasında yer alan antrasiklinler, DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından kanser tedavisi için temel ilaçlar olarak listelenmektedir [15-17]. Daunorubisin, akut lenfoblastik ve miyeloblastik lösemilere karşı etkin olurken, doksorubisin, lenfoma, sarkom, meme, akciğer, mesane, kemik ve rahim ağzı kanserlerini kapsayan bir tümör yelpazesine karşı etkili bir biçimde kullanılmaktadır. Erken Meme Kanseri Araştırmacılarının İş birliği Grubu (EBCTCG) meta-analizi, antrasiklin bazlı diyetlerin meme kanseri ölümlerini %20-30 oranında azalttığını göstermiştir, ancak faydaları farklı tümör tiplerine sahip hastalar arasında farklılık gösterebilir. Optimum tedavi sonuçları, doksorubisin ile siklofosamid veya dosetaksel, paklitaksel ya da fluorourasil ile birlikteliği içeren çoklu ilaç diyetleri ile kombinasyon tedavisi yoluyla elde edilir [14-17].

2.7. Epirubicin

Antrasiklinler, sağkalım avantajlarından dolayı erken meme kanseri kemoterapisinde çok önemlidir. Yaygın olarak kullanılan iki antrasiklin doksorubisin ve epirubisindir. Epirubisin ilk olarak 1980'lerde kullanılmış ancak adjuvan tedavi için onaylandığı 1999 yılına kadar ertelenmiştir. Doksorubisinin 4'-epimeri olan epirubisin 1982 yılında Fransa'da onaylanmıştır ve 2000 yılı aşkın bir süredir üzerinde çalışılmaktadır. Meme kanseri ve diğer

malignitelerin tedavisinde kullanılır [14-16,17]. Etki mekanizması DNA interkalasyonunu, topoizomerez II aktivitesinin inhibisyonunu, oksijen ve serbest radikallerinin oluşumunu ve DNA, RNA ve protein sentezi ile etkileşimi içerir [2]. Epirubisinin antitümör etkisi, hücre döngüsünün sabit bir fazına özgü değildir. Epirubisin, DNA baz çiftleri arasına girerek DNA ile kompleks oluşturur, bu da sarmal yapıda değişikliklere yol açar. DNA konformasyonundaki bu değişiklik, DNA polimerazın inhibisyonu sonucu DNA zincirinin uzamasını etkileyebilir, aynı zamanda RNA polimerazın kısıtlanması nedeniyle protein sentezi inhibisyona uğrayabilir. [2,15]. Epirubisin ayrıca bakır ve demir iyonlarına bağlanarak kompleksler oluşturabilir. Redoks döngüsündeki değişiklikler mitokondri ve membranlara zarar verdiğinden, bu güçlü bağlanma komplekslerinin epirubisinin kardiyotoksik etkilerinde rol oynadığı düşünülmektedir [15-17]. Öte yandan Epirubisin, transkripsiyon evresinde topoizomerez II enzimini etkileyerek, enzim-DNA birleşiminin başlangıçtaki stabilitesini bozabilir ve çift sarmal kırılmalarına neden olabilir. Ayrıca, epirubisinin tek bir elektronla indirgenmesi sonucunda serbest oksijen radikalleri üretilebilir. Epirubisin, Fe^{+2} ve oksijen gibi katalizörlerin varlığında indirgenerek bir semikinon radikali oluşturulur. Semikinon radikali, oksijen varlığında süperoksit anyonlarının oluşumuna yol açabilir ve bu daha sonra hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında hidroksil radikali'ye dönüşebilir. Epirubisin tarafından oluşturulan serbest radikaller, DNA zincirlerinin ayrılmasına, membran lipidlerinin peroksidasyonuna ve tiyol gruplarının, purin/pirimidin bazlarının ve aminlerin doğrudan oksidasyonuna yol açabilir [14].

2.8. Flavonoidler

Flavonoid bileşikler, doğadan bitkilerden elde edilen ürünler olup, bitkilerin çeşitli kısımlarında bulunurlar. Bu bileşikler, bitkilerin büyüme süreçlerinde ve zararlı organizmalara karşı savunmada sentezlenir. Genellikle düşük moleküler ağırlıklı fenolik bileşikler sınıfına ait olan flavonoidler, bitkilerin çeşitli kısımlarında yaygın olarak bulunurlar. Sebze, meyve, şarap, kakao ve çay gibi bitkisel kaynaklı besinlerde zengin miktarda bulunan flavonoidler, bu nedenle diyet flavonoidleri olarak adlandırılır. Flavonoidler, kalkonlar, flavonlar, flavonoller ve izoflavonlar gibi birkaç alt gruba ayrılır. Bu alt grupların benzersiz ana kaynakları vardır. Örneğin, çay ve soğan, flavonol ve flavonların ana diyet kaynaklarıdır [18-19].

2.9. Taksifolin

Bir flavonoid olan taksifolin, anjiyogenezin, sitokrom P450 enzimlerinin, P-glikoprotein, reaktif oksidatif türlerin (ROS) ve hücre döngüsü düzenleyicilerinin önlenmesi ve apoptozun tetiklenmesi gibi antikanser aktivitelerinin yanı sıra geniş farmakolojik etkileri ile dikkat çekmiştir. Taksifolin, agresif meme kanserinde hücre proliferasyonu, göçü ve invazyonu azaltmada hayati bir role sahiptir. Çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, Taksifolin kanser hücresi proliferasyonunu ve migrasyonunu doza bağımlı bir şekilde inhibe etmektedir. Ek olarak, EMT sürecini önleyerek, mezenkimal belirteçlerin ifadesini azaltır ve MET (mezenkimal epitelyal geçiş)'i destekler [18-26].





3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Gereçler

3.1.1. Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler

- ❖ Terazî (Precisa)
- ❖ Çoklu manyetik karıştırıcı (IKA)
- ❖ Ultrasonik su banyosu (Bandelin electronic)
- ❖ Soğutmalı santrifüj (Hettich)
- ❖ Mikroplaka ELISA okuyucu (Spectra Max M3, Molecular Devices)
- ❖ Tüp Çalkalama Cihazı (Vortex; REAMIX 2789)
- ❖ Derin dondurucu, -80°C (Sanyo)
- ❖ Derin dondurucu, -30°C (Sanyo)
- ❖ Buzdolabı (Arçelik)
- ❖ Biyogüvenlik Kabini (CLANLAF VFRS 1206)
- ❖ Karbondioksit Etüv (Sanyo)
- ❖ Invert mikroskop (Zeiss)
- ❖ İnkübatör (NÜVE EN 500, Türkiye)
- ❖ Mikropipet seti 10-100-1000 µl (Brand)
- ❖ Western Blot Sistemi (Bio-Rad)
- ❖ Jel görüntüleme sistemi (Gel Logic 2200 Pro-Carestream Health, Bio-Rad)
- ❖ Spin Vorteks (Biosan)
- ❖ Kuru ısıtıcı blok (Biosan)
- ❖ Elektroforez güç kaynağı (Thermo)
- ❖ Laminar flow kabini (Danlaf)
- ❖ Mikropipetler
- ❖ Spektrofotometre (NanodropND-1000)
- ❖ Beher (10 ml'lik)
- ❖ Manyetik balık
- ❖ Santrifüj tüpleri (50 ml ve 15 ml'lik)
- ❖ Ependorf (1,5 ve 2 ml'lik)
- ❖ Steril pipet uçları
- ❖ Steril 6'lık well plate

- ❖ Steril 96'lık well plate
- ❖ PVDF membran (0,45 µm)
- ❖ 25 cm²-75 cm² steril hücre kültürü flaskları
- ❖ 1 ml'lik steril insülin enjektörü
- ❖ Fare tipi 2 cm Gavaj Borusu
- ❖ Konvensiyonel fare deney kafesler (Kobay LF-4)
- ❖ Bistüri (21 Numara)
- ❖ Pens (ISOLAB 105mm)
- ❖ Patoloji numune toplama kabı (30 ml)
- ❖ Hücre kültür flaskları (SPL, 96 kuyucuklu)
- ❖ Light Cycler® 480 real-time PCR system (Roche)
- ❖ Western Blot antikorları (Cell Signaling Tech)

3.1.2. Kullanılan kitler ve hücre hattı

- ❖ Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH), Roche
- ❖ Pierce BCA Protein Assay Kit, (Thermo Scientific)
- ❖ SensoLyte® Homogeneous AFC Caspase-3/7 Assay Kit, (Anaspec)
- ❖ TriReagent RNA Isolation solution (peqGOLD TriFast)
- ❖ Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit (Roche)
- ❖ 4T1 Fare Meme Kanseri Hücre Hattı (ATCC, CRL-2539)

3.1.3. Kullanılan kimyasallar

- ❖ Epirubisin (Sigma-Aldrich)
- ❖ Taksifolin (Sigma-Aldrich)
- ❖ Etanol (CH₃CH₂OH, EtOH, Merck)
- ❖ 2-Propanol (IsOH; Sigma Aldrich)
- ❖ RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, HyClone)
- ❖ Fetal Sığır Serum (HyClone)
- ❖ L-glutamin (HyClone)
- ❖ Penisilin-Streptomisin (HyClone)
- ❖ Amfoterisin B (HyClone)
- ❖ Trypsin (Biological Industries)

- ❖ MTT (Sigma-Aldrich)
- ❖ Dimetil sülfoksid (DMSO, Sigma-Aldrich)
- ❖ RIPA Buffer (Thermo Fisher)
- ❖ Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF, Merck)
- ❖ Tris base (Sigma-Aldrich)
- ❖ Sodyum dodesil sülfat (SDS, Bio-Rad)
- ❖ Tris-Glycine SDS Running Buffer (10X, Bio-Rad)
- ❖ Tris-Glycine Transfer Buffer (10X, Bio-Rad)
- ❖ Tris Buffered Saline (TBS, 10X, Bio-Rad)
- ❖ BSA Blocking Buffer (10X, Bio-Rad)
- ❖ Tetramethylethylenediamine (TEMED, Bio-Rad)
- ❖ Beta-merkaptotanol (Acros)
- ❖ Amonyum persülfat (APS, Sigma)
- ❖ ColorPlus Protein Standardı (Cell Signaling Technology)
- ❖ ECL Western Blotting Substrate (Millipore)
- ❖ PBS solution (Gibco)
- ❖ Ketamin (Pfizer)

3.1.4. Kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanışı

PBS çözeltisinin hazırlanması

10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ ve 100mM NaCl karışımının distile suda çözüldükten sonra, pH= 7.5 olacak şekilde HCl kullanılarak ayarlanmıştır. Hazırlanan solüsyon +4 C⁰'de muhafaza edilmiştir.

Epirubisin karışımının hazırlanması

Moleküler ağırlığı 580 g/mol olan epirubisin, 2 ml 20 µM olacak şekildeyken, aşağıdaki yoğunluk-molarite formülüne göre hesaplanarak;

$$Molarite = \frac{\text{özkütle} \times \% \times 10}{\text{molekül ağırlık}}$$

0.1 μ M, 0.25 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M olacak şekilde DMSO içinde çözülerek hücreye uygulanırken derişimin %0,2 konsantrasyonunu geçmeyecek duruma ayarlanmıştır.

Taksifolin karışımının hazırlanması

Molekül ağırlığı 304.3 g/mol olan taksifolin, 2ml 20 μ M olacak şekildeyken, yukarıda verilen yoğunluk molarite formülüne göre hesaplanarak 1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M olacak şekilde DMSO içinde çözülerek hücreye uygulanırken derişimin %0,2 konsantrasyonunu geçmeyecek duruma ayarlanmıştır.

İn vivo enjeksiyon/Gavaj çözeltilerinin hazırlanması

Filtre edilmiş steril DMSO çözeltisi içerisinde vücut gram ağırlığına 100 mg/kg konsantrasyon olacak şekilde taksifolin çözeltisinin farelere 0.1 ml DMSO içinde gavaj yolu ile uygulanacak şekilde çözülmüştür.

Filtre edilmiş steril PBS çözeltisi içerisinde vücut gram ağırlığına 2.5 mg/kg konsantrasyon olacak şekilde epirubisin çözeltisi farelere 0.1 ml PBS içinde enjeksiyonu yapılmak üzere çözdürülmüştür.

%10 FBS içeren yüksek glukozlu RPMI-1640 besiyerinin hazırlanması

Önceden ısı ile inaktive edilmiş 50 ml FBS, daha sonra 5 ml penisilin-streptomisin ve 500 μ l amfoterisin B, 6 ml 2mM Glutamin kullanılarak toplam hacim 1000 ml olacak şekilde besiyeri hazırlanmıştır.

MTT solüsyonu hazırlanması

PBS içinde 5mg/ml olacak şekilde 5 ml MTT stok solüsyonundan 1 ml'de 5 mg olacak çözdürülmüştür.

PMSF solüsyonu hazırlanması

1 ml isopropanol içerisinde 0,0174 g PMSF çözdürülerek hazırlanmıştır.

%10'luk (w/v) SDS hazırlanması (100 ml)

10 gram sodyum dodesil sülfat 100 ml distile su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

1,5 M Tris-HCl çözeltisi hazırlanması (pH: 8,8) (200 ml)

36,342 g Tris base tartıldıktan sonra 150 ml distile suda çözündürülmüştür. Ardından pH metre ile HCl kullanılarak pH 8,8'e ayarlanmıştır. Daha sonra toplam hacim distile su ile 200 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon +4 C⁰'de muhafaza edilmiştir.

0,5 M Tris-HCl çözeltisi hazırlanması (pH: 6,8) (200 ml)

12,114 g Tris base tartıldıktan sonra 150 ml distile suda çözündürülmüştür. Ardından pH metre ile HCl kullanılarak pH 6,8'e ayarlanmıştır. Daha sonra toplam hacim distile su ile 200 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon +4 C⁰'de muhafaza edilmiştir.

Akrilamid+akrilamid Bis- çözeltisi hazırlanması (%30, 100 ml)

29 g akrilamid ve 1 g bisakrilamid 50 ml distile su içerisinde çözündürülmüştür. En son toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti ve +4 C⁰'de koyu renkli cam şişe içerisinde muhafaza edilmiştir.

Amonyum persülfat (APS) çözeltisi hazırlanması (%10, 1 ml)

0,1 g APS tartılıp 1 ml distile su içinde çözündürülmüştür ve +4 C⁰'de muhafaza edilmiştir.

Kaspaz-3/7 substrat solüsyonu hazırlanması

Kaspaz-3/7 substratı (üretici yönergesi içerik A) 50µl, 1 M 200µl DTT (E içeriği), 4.75µl Analiz Tamponu (D içeriği) çözündürülerek toplam hacim 5 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

1X Jel yürütme tamponu (Running Buffer) hazırlanması

10X'lik yürütme tamponu ana stoğundan, 100 ml alınıp üzerine 900 ml distile su eklenerek 1000 ml'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

1X Jel transfer tamponu hazırlanması

10X'lik transfer tamponu ana stoğundan, 100 ml alınıp üzerine 700 ml distile su ve 200 ml metanol eklenerek 1000 ml'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. +4 C⁰'de muhafaza edilmiştir.

1X Tris Buffer Saline-Tween 20 hazırlanması (TBS-T)

10X'lik TBS ana stoğundan, 100 ml alınıp üzerine 900 ml distile su ve 1 ml Tween 20 eklenerek hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

1X BSA bloklama çözeltisinin hazırlanması (15 ml)

10X'lik BSA Bloklama solüsyonu ana stoğundan, 1,5 ml alınıp üzerine 13,5 ml distile su ve eklenerek hazırlanmıştır. +4 C⁰'de muhafaza edilmiştir.

Primer antikorların hazırlanması

1X'lik 13,5 ml TBS-T içerisine, 1,5 ml 10X BSA bloklama solüsyonu eklenmiş ve kullanılan primer antikorun dilüsyon faktörü göz önüne alınarak hazırlanan çözeltiye eklenmiştir.

Sekonder antikorların hazırlanması

1X 'lik 13,5 ml TBS-T içerisine, 1,5 ml 10X BSA bloklama solüsyonu eklenmiş ve kullanılan sekonder antikorun dilüsyon faktörü göz önüne alınarak hazırlanan çözeltiye eklenmiştir.

SDS-PAGE için Jel hazırlanması

Tüm proteinlerin negatif yüklenererek sadece boyutlarına göre ayırımına olanak veren SDS-PAGE yönteminde yığılma (stacking) ve ayırma (seperating) jeli olmak üzere 2 kısımdan oluşan jel çizelge 3.1’de verilen içerikler kullanılarak hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. Farklı yüzdelerde hazırlanan yığılma ve ayırma jellerinin madde miktarları

Kullanılan Kimyasallar	%10(Ayırma)	%4(Yığılma)
H ₂ O	4 ml	3,075 ml
%30 Akrilamid Karışımı	3.3 ml	0,67 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml	0
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	0	1,25 ml
%10 SDS	0.1 ml	0,05 ml
%10 APS	0.1 ml	0,025 ml
TEMED	0,004 ml	0,005 ml
Toplam	10 ml ml	5 ml ml

3.2. Metod ve Yöntemler

Tezde kullanılan metotlar *in vitro* ve *in vivo* olacak şekilde iki aşamadan oluşmaktadır.

3.2.1. In vitro deneyler

Hücre kültürü

Çalışmamızda 4T1 fare meme kanser hücresi hattı kullanılmıştır. Hücreler %10 inaktive edilmiş FBS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin, 100 µg/mL streptomisin, 10 µg/ml amfoterisin ile desteklenmiş Roswell Park Memorial Institute (RPMI) -1640 besiyerinde %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 37 °C’de inkübe edilmiştir. Hücreler 2-6 pasajdan sonra log fazındayken deney basamaklarına geçilmiştir.

Hücre canlılık ölçümü

Hücreler 96 kuyucuklu platelere 5x10³ hücre sayısı olacak şekilde ekilmiştir. Bir gece inkübasyondan sonra her plate içinde kontrol olacak şekilde Tax tek başına 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM artan konsantrasyonlarında, EPI tek başına 0.1 µM, 0.25 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM konsantrasyonlarında ve son olarak Tax ve EPI kombine olarak 5 µM Tax +0.1 µM EPI ile 50 µM Tax+5 µM EPI arasındaki konsantrasyonlarda uygulanmıştır. IC₅₀, %50 hücre

canlılığını bloke etmek için gereken ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyondan sonra besiyeri hazırlanmış olan 5mg/ml MTT çözeltisinden 10 µl eklenerek 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan formazon kristalleri 100µl DMSO'da çözüldükten sonra çözünen kristallerin absorbens değeri 570 nm dalga boyunda Spectramax M3 Elisa mikropilaka okuyucuda ölçülmüştür. Deney tüm konsantrasyonlar için 6 kez tekrarlanmıştır. Hücre canlılığı-aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır;

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Örnek absr.} - \text{Düşük kontrol absr.}}{\text{Yüksek kontrol absr.} - \text{Düşük kontrol absr.}} \times 100$$

Sitotoksitesite ölçümü

Hücreden salınan laktat dehidrojenaz (LDH) düzeyi kullanılarak hücrelerin sitotoksitesitesi ölçülmesi amacıyla, 4T1 hücreleri, 96 kuyulu kültür kaplarında her bir kuyuya 1×10^4 hücre gelecek şekilde ekilmiştir. Bir gece inkübasyonda bekledikten sonra Tax ve EPI'nin belirlenen konsantrasyonlarda (0.1-1µM EPI, 10-50µM Tax ve birlikte) ve 24 ile 48 saatlik sürelerde hücrelere uygulanmış, inkübasyon süreleri dolduktan sonra kültür ortamından 100 µl besiyeri alınıp 96 kuyulu mikropilakanın her bir kuyusuna eklenip ardından, her bir kuyuya 100 µl taze hazırlanmış reaksiyon karışımı eklenerek, ışıktan uzak bir ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra ELISA okuyucu cihaz ile 490-492 nm dalga boyundaki absorbens değerleri okunmuştur. Elde edilen absorbens değerlerinden kör kontrolün absorbensı çıkartıldıktan sonra, ilaçların sitotoksitesite değerinin yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre Sitotoksitesite (\%)} = \frac{\text{Örnek absr.} - \text{Düşük kontrol absr.}}{\text{Yüksek kontrol absr.} - \text{Düşük kontrol absr.}} \times 100$$

Deney tüm konsantrasyonlarda 3 kez 3 bağımsız deneyde tekrarlanmıştır

3.2.2. In Vivo deneylerde kullanılacak singeneik tümör modeli ve ilaç tedavisi

In vivo çalışmalar kapsamında Bilkent Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Deney Hayvanları Ünitesinden ön çalışma yapmak amacıyla 2 adet alınan Balb/c fareler Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM)'a teslim edilmiştir. 1 hafta farelerin ortama alışmaları

beklenildikten sonra 4T1 fare meme kanser hücresi subkutan (s.c.) enjeksiyon yöntemiyle 4. meme dokusundan injekte edilmiştir. Fare başına 0,1 ml PBS hacimde 5×10^4 hücre olacak şekilde hesaplanmıştır. Singeneik tümör modeli gözlemlendikten sonra ketamin ve ksilazin anestezisi altına alınan 2 fare intrakardiyak (i.k.) kan alımıyla ötenazi edilerek tümör gelişimi deri altından da gözlenmiştir. Ardından aynı merkezden 60 adet Balb/C fare temin edilerek GÜDAM'a teslim edilmiştir. Fareler 10'arlı kafeslere konarak yem ve suya sınırsız erişim sağlanmıştır. Hayvan deneyleri Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alınarak yapılmıştır (G.Ü.ET-21.016). 60 adet farenin kiloları ortalama olacak şekilde 6 farklı gruba ayrılarak gruplandırılmıştır.

- 1) Sham Grubu 1- Sadece DMSO uygulanan grup
- 2) Sham Grubu 2- Sadece PBS uygulanan grup
- 3) Sham Grubu 3- PBS + DMSO uygulanan grup
- 4) Tek başına Tax uygulanan grup
- 5) Tek başına EPI uygulanan grup
- 6) Taksifolin ve Epirubisin uygulanan grup

Tax'ın konsantrasyonu ve veriliş sıklığı belirtilen literatür referans alınarak tespit edilmiştir (1). Buna göre çalışmamızda 100 mg/kg Tax deneysel meme kanser modelinde her dört günde bir kez gavaj yoluyla uygulanmıştır. Bu nedenle, çalışmamızı tasarlarken bu literatüre bağlı kalınarak Tax'ın dozunu ve veriliş sıklığı belirlenmiştir. Tax için literatür taraması yaptığımızda in vivo deneysel meme kanser modelinde uygulanan en düşük Tax dozunun 100 mg/kg olduğu belirlenmiştir. EPI'nin konsantrasyonu ve veriliş sıklığı belirtilen literatür referans alınarak tespit edilmiştir (2). Referans olarak makalelerde, 2.5 mg/kg/gün EPI deney hayvanına bir gün aralıklı (gün aşırı) olmak üzere günde bir kez intravenöz (i.v.) enjeksiyon ile uygulanmıştır. Bu nedenle, çalışmamız tasarlanırken bu literatürlere bağlı kalınarak EPI'nin konsantrasyon ve veriliş sıklığı belirlenmiştir.

Grup I - Sham grubu 1: 4T1 fare meme kanseri hücreleri ile meme kanser modeli oluşturulmuş ve intragastrik gavaj (i.g.) olarak DMSO verilen grup. Hayvanlara her dört günde bir kez olmak üzere DMSO gavaj yoluyla 30 gün süresince verilmiştir (n=10).

Grup II - Sham grubu 2: 4T1 fare meme kanseri hücreleri ile meme kanser modeli oluşturulmuş ve i.v. olarak PBS verilen grup. Hayvanlara bir gün aralıklı (gün aşırı) günde bir kez olmak üzere PBS intravenöz olarak 16 gün süresince verilmiştir (n=10).

Grup III - Sham grubu 3: 4T1 fare meme kanseri hücreleri ile meme kanser modeli oluşturulmuş ve gavaj yoluyla DMSO ve i.v. olarak PBS verilen grup. Hayvanlara her dört günde bir kez olmak üzere DMSO gavaj yoluyla 30 gün süresince ve bir gün aralıklı (gün aşırı) günde bir kez olmak üzere PBS i.v. olarak 16 gün süresince verilmiştir (n=10).

Grup IV - Tek başına Tax uygulanan grup: 4T1 fare meme kanseri hücreleri ile meme kanser modeli oluşturulmuş ve Tax ile tedavi edilen grup. Hayvanlara her dört günde bir kez olmak üzere 100 mg/kg Tax gavaj yoluyla 30 gün süresince verilmiştir (n=10).

Grup V - Tek başına EPI uygulanan grup: 4T1 fare meme kanseri hücreleri ile meme kanser modeli oluşturulmuş ve EPI ile tedavi edilen grup. Hayvanlara bir gün aralıklı (gün aşırı) olmak üzere günde 2.5 mg/kg/gün EP i.v. olarak 16 gün süresince verilmiştir (n=10).

Grup VI - Tax ve EPI uygulanan grup: 4T1 fare meme kanseri hücreleri ile meme kanser modeli oluşturulmuş ve hem Tax ile hem EPI ile tedavi edilen grup. Hayvanlara her dört günde bir kez olmak üzere 100 mg/kg Tax gavaj yoluyla 30 gün süresince ve bir gün aralıklı (gün aşırı) olmak üzere günde bir kez 2.5 mg/kg/gün EPI i.v. enjeksiyon ile 16 gün süresince verilmiştir. (n=10).

Farelerin terazi ile ağırlıkları ve tümörleri kaliper ile haftalık olarak ölçülmüştür. Tümör hacmi hesabı için kullanılan formül aşağıdaki gibidir;

$$\text{Tümör Hacmi(mm}^3\text{)} = \frac{[(\text{genişlik})^2 \times \text{uzunluk}]}{2}$$

Enjeksiyon ve gavaj işlemleri bittikten sonra fareler ketamin ve ksilazin ile anestezi altına alınarak intrakardiyak kan alımıyla ötenazi yapılmıştır [50,51]. Farelerin meme dokusu alınarak muhafaza edilmiştir.

Kaspaz-3/7 aktivitesi ölçümü

Uygulanan ajanların fare meme kanser modelinde apoptozu tetikleyip tetiklemediği kaspaz-3/7 aktivitesi ölçülerek gözlemlenmiştir. Bu sebeple öncelikle her bir gruptan farelerin meme tümör dokularından protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Dokular 50-100 mg olacak şekilde eppendorf tüplere konulduktan sonra 500 µL olacak şekilde soğuk RIPA lysis buffer eklenmiş ve homojenizatör yardımıyla parçalanmıştır. RİPA'nın %1'i proteaz inhibitörü Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) eklenir. Lizat 14.500 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek, üstte kalan süpernatant bir başka tüpe aktarılmıştır. Mikroplaka okuyucuda 562 nm absorban değerinde okumaları yapılmış, BCA standart eğri hesaplamalarına göre tablo oluşturulmuştur.

Protein miktarının belirlenmesinin ardından örneklerden SensoLyte® Homogeneous AFC Caspase-3/7 Assay (AnaSpec) kitindeki protokol gereği her örnekten 150 µl alınıp içerisine 50 µl substrat solüsyonu eklenmiştir. Substrat solüsyonunun eklenmesinin ardından kültür kabının ışık görmeyecek bir ortamda 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda floresan yoğunluğu eksitasyon/emisyon= 380/500 nm (Ex/Em) dalga boylarında olacak şekilde ölçülmüştür.

Hematoksilen-eozin boyama

Gruplar arasında yapısal farklılıkları ışık mikroskopik düzeyde incelemek amacıyla, süre bitiminde alınan meme dokuları % 10 nötral formalinde 72 saat tespit edildikten sonra rutin histolojik takip işlemlerinin geçirilerek parafin bloklar elde edilmiştir. Hazırlanan parafin bloklardan 4-5 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan kesitler etüvde 63°C'de 2 saat deparafinize edildikten sonra % 100, % 96, % 80, % 70 % 50, azalan alkol serilerinden geçirilmiştir. 10 dk akar suda yıkandıktan ve alkol uzaklaştırıldıktan sonra Harris Hematoksilen solüsyonunda 10 dk tutuldu ve akar suya alınmıştır. 10 dk akar suyun altında boyanın fazlası uzaklaştırılarak % 1'lik HCl solüsyonunda 1-2 dip yapıldıktan sonra kesitler tekrar akar suda yıkanmıştır. Lamalar, fazla su uzaklaştırıldıktan sonra 10 dk Eozin solüsyonunda bekletilmiştir. Fazla boyayı uzaklaştırmak amacıyla 10 dk akar suda yıkandıktan sonra kurutularak % 50, % 70, % 80, % 96, % 100 artan alkol serilerinden geçirilmiş ve suyun kesitlerden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından 45 dk ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatılmış ve elde edilen preparatlar Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programı kullanılarak resimlendirilmiştir.

Tümör dokularından Total RNA izolasyonu

Deney sonunda steril bir şekilde çıkartılan tümör dokuları steril petri kabında steril serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra total RNA izolasyonuna uygun (50mg-100mg) büyüklüklerde steril bistüri ile küçük parçalara ayrılmıştır. DNaz ve RNaz free 1.5 ml'lik ependorf tüplere alınan doku örnekleri hızlı bir şekilde sıvı azot içinde dondurularak analiz gününe kadar -80°C' de saklanmıştır. Tümör dokularından RNA izolasyonu guanidin isothiocyanate/phenol-kloroform metodunun modifikasyonu sonucu oluşan Trizol solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için;

1.5 ml'lik ependorf tüpler içinde bulunan 50-100 mg arasındaki dokuların üzerine 1000 µl Trizol eklenerek homojenizatör yardımıyla homojenize edilmiştir. Ardından, örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. 200 µl kloroform eklendikten sonra 15 saniye boyunca vortekslenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örnekler 11.000 rpm'de 5 dakika 4 °C mikrosantrifüjde santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), arafaz ve üstte renksiz sıvı faz olmak üzere üç faza ayrılmıştır. Üst faz yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldıktan sonra başlangıçta kullanılan Trizol miktarının yarısı kadar izopropanol eklenerek vorteklenmiştir. Örnekler 1.5 saat -20 °C' de bekletilmiş, ardından 11.500 rpm'de 10 dakika 4 °C mikrosantrifüjde santrifüj edilmiştir. Üstte kalan süpernatant atıldıktan sonra ependorf tüp üzerine 1000 ul %75'lik alkol eklenerek, 10.000 rpm'de 10 dakika 4 °C'de mikrosantrifüjde santrifüj edilmiştir. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatantın atılmasının ardından pelet kurulmaya bırakılmış, kuruyan örnekler 30-50 ul DEPC'li su ile sulandırılmıştır. Elde edilen RNA'lar spektrofotometre'de 260/280 nanometre (nm)'de ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlenmiştir.

Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden High Fidelity Transcriptor cDNA sentez kiti (Roche) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Primer olarak random heksamerler kullanılan reaksiyonda cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları Çizelge 3.2'de verilmiştir. Otomatik ısı döngüsü cihazında örnekler sırasıyla 25 °C'de 10 dakika, 50 °C'de 60 dakika ve 85 °C'de 5 dakika olan programda cDNA ters transkripsiyon polimeraz zincir

tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucu elde edilen cDNA örnekleri Real-time PCR’da kullanılıncaya kadar -20 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.2. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları

	Son konsantrasyon
Reaksiyon Tamponu (X5) MgCl ₂	8mM
dNTP	1mM
Random hekzamer primeri	60µM
RNaz inhibitörü	20 U/µg
DTT	5mM
Ters Transkriptaz	10 U/µg
Steril Ultra Saf Su	RNA sabitlemesine göre değişir
Total RNA	1µg

Kantitatif real-time PCR analizi

E-kaderin, N-kaderin, β -katenin, Vimentin, Snail, Slug, Zeb1 ve Zeb2 genlerinin ifade düzeylerinin Real-time PCR yöntemi ile belirlenmesi için Light Cycler 480 cihazı kullanılmıştır. Amplifikasyonlar 10 µl toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA, bölgeye özgü primerler, UPL probu ve LightCycler Prob Master miks kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hedef gen ifadenme düzeylerini normalize etmek amacıyla elde edilen cDNA örnekleri, Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) genine özgü primer ve UPL probu kullanılarak çalışılmıştır. Gene özgü primer dizileri Çizelge 3.3’te ve Real-time PCR tepkimesi karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.4’te verilmiştir. Relatif gen ifadenmesi sonuçları “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplanmıştır [52,53].

Çizelge 3.3. Gen spesifik qPCR primer dizileri

Gen	Forward primer (5'- 3')	Reverse primer (5'- 3')
E-cadherin	GTCTCCTCATGGCTTTGC	CTTTAGATGCCGCTTCAC
β -catenin	TCTGAGGACAAGCCACAGGA	GCACCAATGTCCAGTCCAAG
N-cadherin	GCCTATGAAGGAACCACATGA	CTGTATCTCAGGGAAAGGT
Snail	CCACTGCAACCGTGCTTT	CTTGGTGCTTGTGGAGCAA
Slug	TTCGGACCCACACATTACCT	GCAGTGAGGGCAAGAAAAAG
Zeb1	ACTCAGCCTCCTCCACTC	ACAAATTGCCATCTCCAGT
Zeb2	GGAGCAGGTAATCGCAAGT	CGCAGGTGTTCTTTCAGATG
Vimentin	TGTGAGGTGGAGCGGGAC	ACATCGATCTGGACATGCTG
GAPDH	GTTGTCTCCTGCGACTTCA	GGTGGTCCAGGGTTTCTTA

UPL: Universal Probe Library, qPCR: Kantitatif Real Time Polimeraz Reaksiyonu

Çizelge 3.4. GAPDH, E-kaderin, N-kaderin, β -katenin, Vimentin, Snail, Slug, Zeb1 ve Zeb2 Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	4.7 μ l
Prob karışımı (X10)	1X	1.4 μ l
25 mM MgCl ₂	4 mM	1.2 μ l
Primer F	10 pmol/ μ l	0.5 μ l
Primer R	10 pmol/ μ l	0.5 μ l
TaqMan prob	10 pmol	0.1 μ l
cDNA	-	2 μ l

Light cycler (LC) deney programı

Nicel gerçek zamanlı PCR karışımları hazırlandıktan sonra 96 kuyulu mikrolakalara dağıtıldıktan sonra, üzerine önceden elde edilen cDNA'lar eklenmiştir. Mikrolakaların üzeri şeffaf kapatıcı ile örtüldükten sonra, mikrolakalar Light Cycler 480 cihazına yerleştirilmiştir. Çizelge 3.5'te belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirilmiştir. E-kaderin, N-kaderin, β -katenin, Vimentin, Snail, Slug, Zeb1, Zeb2 ve GAPDH genleri için aynı program kullanılmıştır. Reaksiyon sonucu, hedef genlerin mRNA ifade düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlenmiştir.

Çizelge 3.5. PCR amplifikasyon programı

Program. Ayrılma (Denatürasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	95	
İnkübasyon Zamanı (s:dk:sn)	10:00dk	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	
Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)		
Program verisi	Değer	
Döngüler	50	
Analiz Modu	Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60
İnkübasyon Zamanı (s:dk:sn)	10 sn	10:00dk
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	20.0
Program 3. Soğutma		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	40	
İnkübasyon Zamanı (s:dk:sn)	30sn	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	

Western blot yöntemi

Dokulardan protein düzeyinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi için Western Blot yönteminden yararlanılmıştır. Bu amaçla tümör dokularından protein izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izole edilen total protein miktarı BCA kiti ile belirlenmiştir. Daha sonra E-kaderin, N-kaderin, β -katenin, Vimentin, Snail ve Slug proteinlerine ait ifade düzeylerinde meydana gelen değişimlerin tespiti Western Blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Housekeeping protein olarak beta actin (β -actin) proteininin ifade düzeyi belirlenmiştir.

Hedef proteinler için Çizelge 3.1’de belirlenen oranlarla yığınlama ve ayırma jelleri hazırlanmıştır. Jellerin hazırlanmasından sonra her bir örnek için 30 μ g protein miktarı yükleme tamponuyla karıştırıldıktan sonra 95 °C’de, 5 dak. kuru ısıtıcı blokta denatürasyon için bekletilmiştir. Ardından örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra ilk kuyuya protein ladder ve her gruptan 3 örnek 3 tekrarlı olacak şekilde jelle yüklenmiştir. Örnekler 1X yürütme tamponu içeren tankın içerisinde, 120 V’da 2 saat boyunca yürütülmüştür. Süre sonunda proteinlerin jelden ıslak transfer yöntemi ile PVDF membrana transferleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hazırlanan transfer kaseti tanka yerleştirilmiş ve tank 1X transfer tamponu ile doldurulduktan sonra 250 mA’de yaklaşık 2 saat boyunca jelden membrana protein geçişi sağlanmıştır. Süre sonunda membranların 1X BSA ile bloklanmasının ardından E-kaderin, N-kaderin, β -katenin, Vimentin, Snail, Slug ve β -actin primer antikorları ile +4°C’de yatay çalkalayıcı yardımıyla karıştırılarak gece boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda membranlar 1X TBS-T ile 3 kez yıkanmış ve uygun sekonder antikör ile oda sıcaklığında, yatay çalkalayıcı yardımıyla karıştırılarak 1,5 saat inkübe edilmiştir. Membranlar tekrar 1X TBS-T ile 3 kez yıkanmış ve görüntüleme işlemine geçilmiştir. Membranlar ECL Western Blotting Substrate (Millipore) ile muamele edildikten sonra Kodak Gel Logic 2200 Pro cihazı ile görüntüleme yapılmıştır. Görüntüleme sonrası proteinlere ait bant kalınlıkları Image J programı kullanılarak hesaplanmıştır.

İstatistiksel analizler

E-kaderin, N-kaderin, β -katenin, Vimentin, Snail, Slug, Zeb1 ve Zeb2 mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar “REST (2009 V2.0.13)” istatistik programı ile karşılaştırılmıştır [52]. Gruplar arasındaki farklılıklar elde edilen verilerin SPSS 24.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Sürekli verilerin karşılaştırılmasında

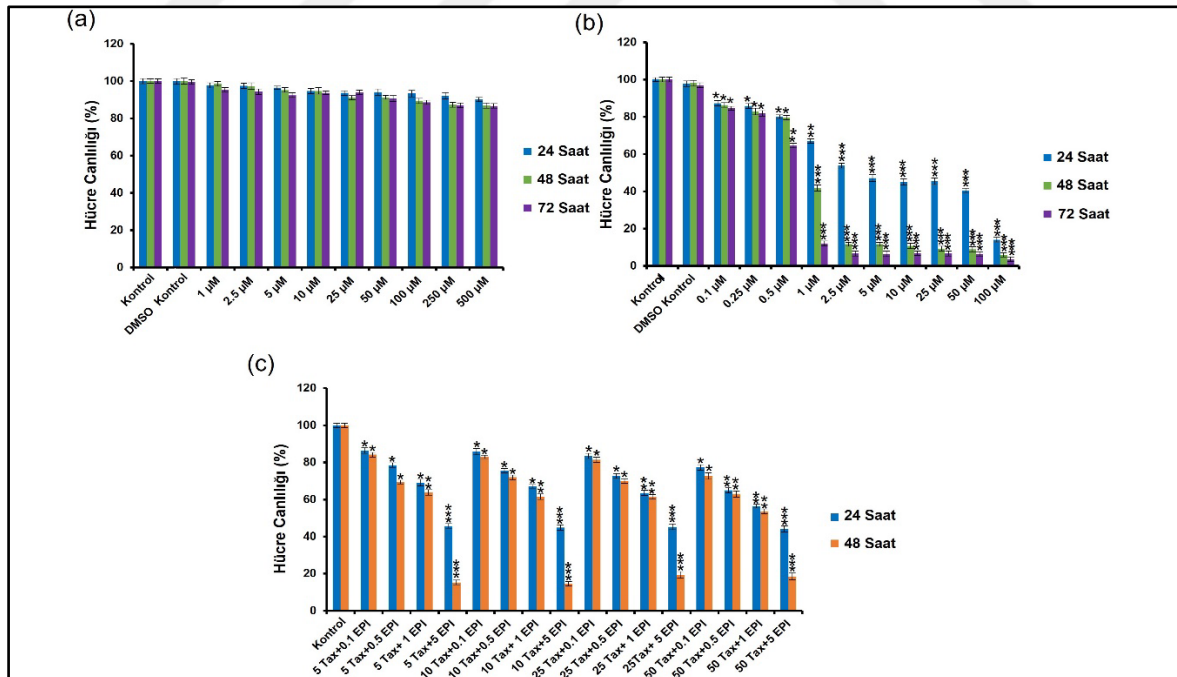
Student's t testi kullanılmıştır. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ bulunan p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Tax ve EPI'nin Hücre Canlılığına Etkisi

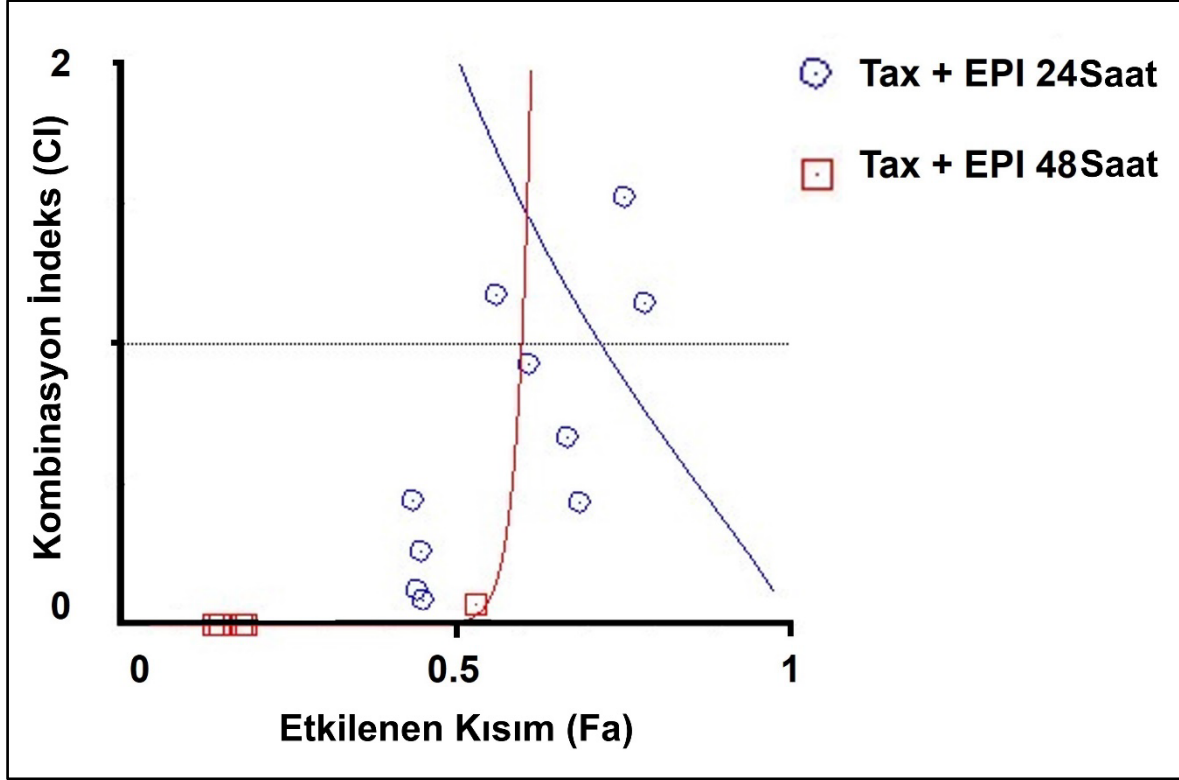
4T1 hücre canlılığı MTT deneyi ile belirlenmiştir (Şekil 4.1). 4T1 hücreleri 24, 48 ve 72 saat boyunca Tax ve EPI ile muamele edilmiştir. Şekil 4.1a'da 24, 48 ve 72 saat boyunca Tax uygulanması 500 μ M'ye kadar olan konsantrasyonlarda hücrelerin canlılığını değiştirmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4.1b'de EPI'nin (0,1-0,5 μ M) 4T1 hücrelerine tek başına uygulanması hücre canlılığında hafif bir azalmaya yol açmış ($p<0,05$), ancak 24, 48 ve 72 saat boyunca daha yüksek konsantrasyonlarda (1, 2,5, 5, 10, 25, 50 ve 100 μ M) önemli ölçüde azalmıştır ($p<0,001$). Tax ve EPI kombine uygulamalarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.1c'de gösterilmiştir. 24 saatlik uygulamadan sonra, en düşük hücre canlılığı (%56,39) 50 μ M Tax ve 1 μ M EPI kombine tedavilerinde gözlenmiştir. 5, 10, 25 ve 50 μ M Tax ile 5 μ M EPI uygulamalarının hem 24 hem de 48 saat içinde hücre canlılığını %50'nin altına düşürdüğü tespit edilmiştir. Tax ve EPI'nin kombine uygulamaları, inhibitörlerin tek tek kullanımına kıyasla hücre canlılığında daha fazla azalmaya yol açmıştır.



Şekil 4.1. 0-500 μ M Tax (a), 0-100 μ M EPI uygulanmış 4T1 hücrelerinin (b) 24, 48 ve 72 saatlerde hücre canlılığı. 24 ve 48. saatlerde Tax ve EPI kombinasyonunun (c) seçilen konsantrasyonlarının 4T1 hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0.05$; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ** $p<0.01$; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *** $p<0.001$; EPI: Epirubisin; 5 Tax: 5 μ M Taksifolin; 10 Tax: 10 μ M Taksifolin; 25 Tax: 25 μ M

Taksifolin; 50 Tax: 50 μ M Taksifolin; 0.1 EPI: 0.1 μ M Epirubisin; 0.5 EPI: 0.5 μ M Epirubisin; 1 EPI: 1 μ M Epirubisin; 5 EPI: 5 μ M Epirubisin

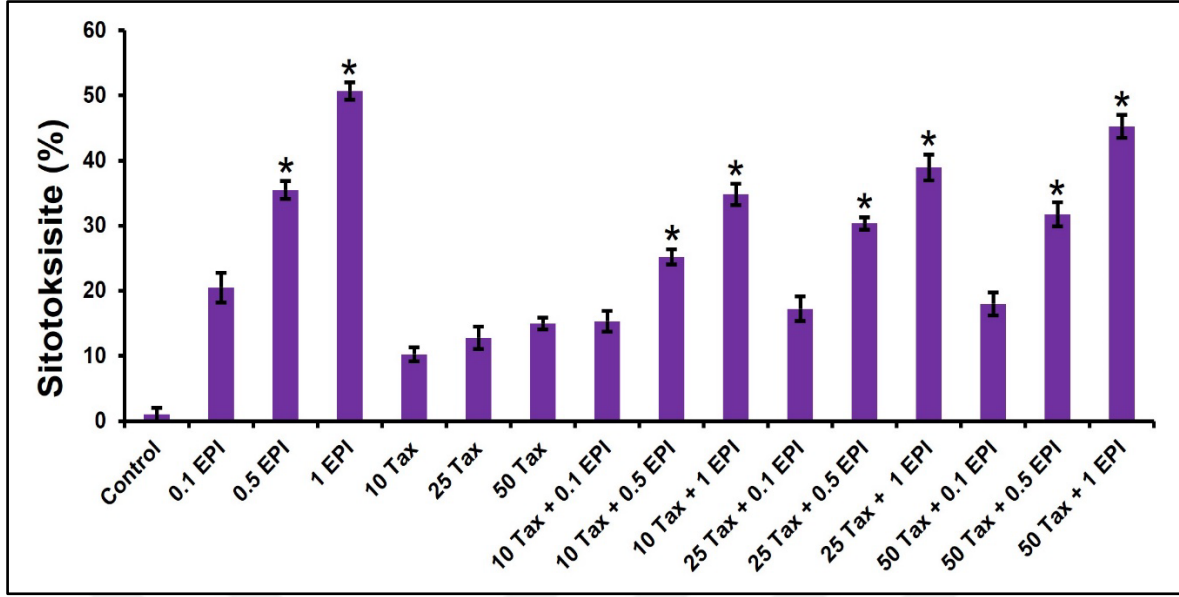
Kombinasyon indeksi analizinden elde edilen sonuçlara göre, Tax ve EPI, 4T1 fare meme kanseri hücrelerinin tedavisinde sinerji göstermiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Tax ve EPI sinerjistik etkileri için kombinasyon indeksi (CI) analizi. CI değerleri doğrusal regresyon ile oluşturulmuştur. Eğilim çizgileri beklenen herhangi bir etki için CI değerlerini gösterir (Fa, etkilenen fraksiyon, 0-1; %0-%100 inhibisyon) ve CI değerleri <1, =1, >1 sırasıyla sinerji, eklenebilirlik veya antagonizmayı gösterir

4.2. Tax ve EPI'nin Sitotoksosite Üzerine Etkisi

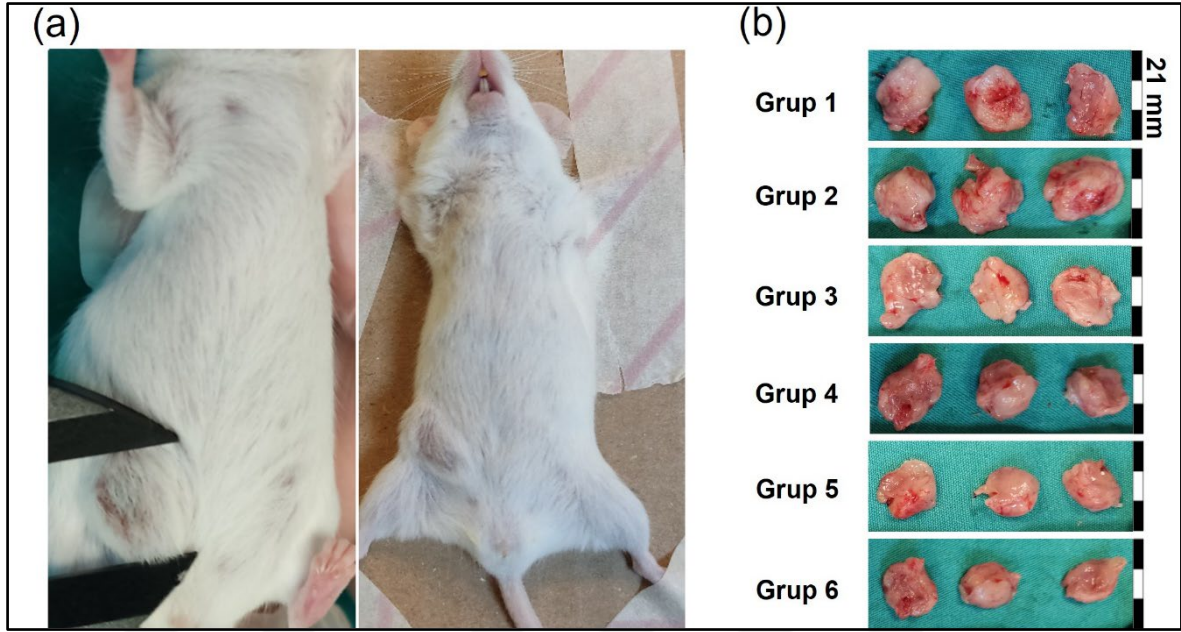
Tax ve EPI'nin 4T1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri LDH salınım deneyi ile değerlendirilmiştir. EPI'nin tek başına uygulanması, 24 saat boyunca muamele edilen 4T1 hücrelerinde sitotoksositeye neden olmuştur. 24 saat boyunca seçilen Tax konsantrasyonlarına (10, 25 ve 50 μ M) maruz bırakılan 4T1 hücrelerinde sitotoksosite çok düşük ve benzer çıkmıştır. 0,5 ve 1 μ M'de LDH salınım yüzdeleri aşağıdaki sırasıyla gibidir; %3,50 ve %5,07 ($p < 0,05$). 4T1 hücrelerinin Tax ile muamelesi EPI ile indüklenen LDH salınımını doza bağlı bir şekilde azaltmıştır (0.1, 0.5 ve 1 μ M) ($p < 0,05$). Sonuçlarımız Tax ve EPI'nin kombine tedavisinin 4T1 hücrelerinde EPI'nin tek başına sitotoksik etkilerini önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (Şekil 4.3).



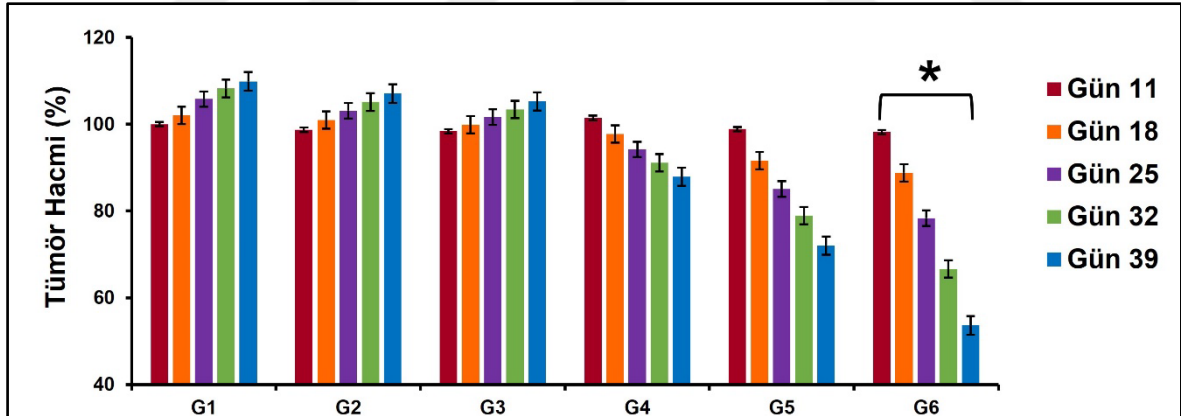
Şekil 4.3. Tax ve/veya EPI'nin 4T1 hücrelerinde LDH salınımı ile belirlenen sitotoksiste üzerindeki etkisi. Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p < 0,05$; 5 Tax: 5 μ M Taksifolin; 10 Tax: 10 μ M Taksifolin; 25 Tax: 25 μ M Taksifolin; 50 Tax: 50 μ M Taksifolin; 0,1 EPI: 0,1 μ M Epirubisin; 0,5 EPI: 0,5 μ M Epirubisin; 1 EPI: 1 μ M Epirubisin; 5 EPI: 5 μ M Epirubisin

4.3. Vücut Ağırlıkları ve Tümör Hacimlerinin Değerlendirilmesi

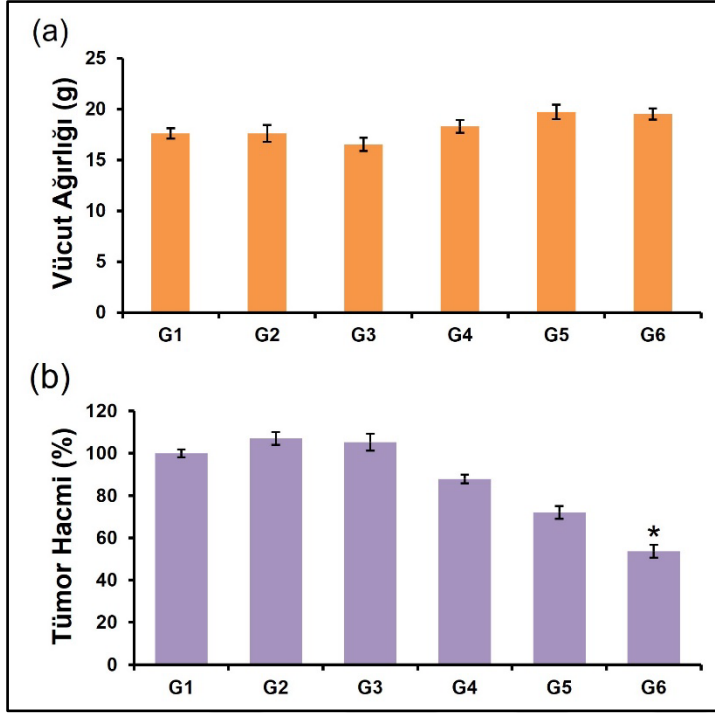
Tümörler tedavilerin sonunda altı gruptan toplanmıştır (Resim 4.1a ve 4.1b). Kontrol grupları ile Tax grubu arasında vücut ağırlığında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Haftalık tümör hacmi ölçümlerinde kombinasyon grubu dışında istatistiksel anlamlılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.4) Ancak, EPI grubu ve kombine grupta kontrol gruplarına kıyasla vücut ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmuştur ($p < 0.05$, Şekil 4.5a). Deney başlangıcında ve deney sonunda gruplar arasında ortalama tümör hacmi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Tümör hacim değişikliklerinin yüzdesi tüm gruplarda artmıştır. Sham kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, Tax- ve EPI- tek başına tedavi gruplarındaki tümör hacim yüzdesi (sırasıyla %87,91 ve %72,03) daha düşük olduğu ancak tüm bu değişikliklerin anlamlı düzeye ulaşmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Buna karşılık, kombine gruptaki tümör hacminin (%53,64) sham kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde azaldığı görülmüştür ($p < 0,05$, Şekil 4.5b).



Resim 4.1. 4T1 hücresi taşıyan BALB/c farelerin farklı tedavilerle fotoğrafları (a). Deney sonunda gruplardan çıkarılan tümör dokularının fotoğrafları, Grup 1: çözücü kontrolü (DMSO ile tedavi); Grup 2: çözücü kontrolü (PBS ile tedavi); Grup 3: çözücü kontrolü: (DMSO ve PBS ile tedavi); Grup 4: Tax ile tedavi; Grup 5: EPI ile tedavi; Grup 6: Tax ve EPI kombinasyonu ile tedavi (b). EPI: Epirubisin, Tax: Taksifolin



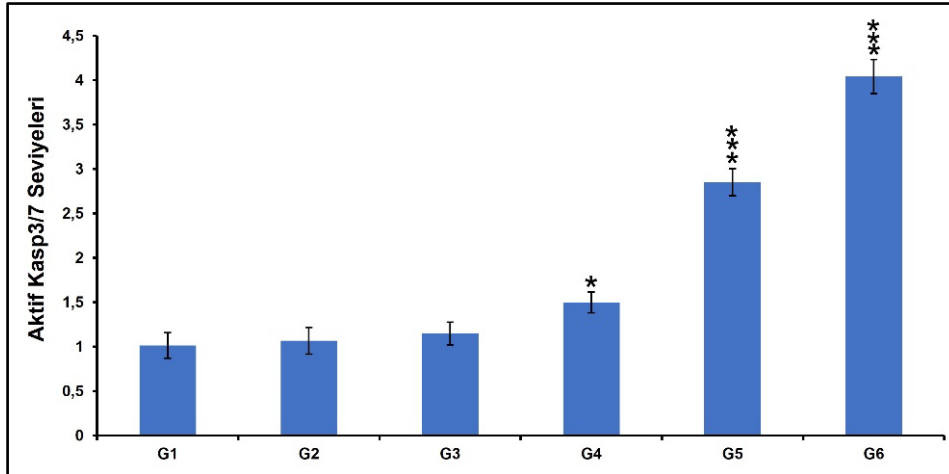
Şekil 4.4. Kontrol ve tedavi gruplarında haftada bir ölçülen tümör hacmi değişiminin gösterilmesi. Grup 1: kontrol grubu (DMSO ile tedavi); Grup 2: kontrol grubu (PBS ile tedavi); Grup 3: kontrol grubu: (DMSO ve PBS ile tedavi); Grup 4: Tax ile tedavi; Grup 5: EPI ile tedavi; Grup 6: Tax ve EPI kombinasyonu ile tedavi. EPI: Epirubisin, Tax: Taksifolin



Şekil 4.5. BALB/c farelerinde Tax ve/veya EPI'nin vücut ağırlıkları (a) ve tümör hacimleri (b) üzerindeki etkileri. * $p < 0.05$, student t-testi. Grup 1: çözücü kontrolü (DMSO ile tedavi); Grup 2: çözücü kontrolü (PBS ile tedavi); Grup 3: çözücü kontrolü: (DMSO ve PBS ile tedavi); Grup 4: Tax ile tedavi; Grup 5: EPI ile tedavi; Grup 6: Tax ve EPI kombinasyonu ile tedavi. EPI: Epirubisin, Tax: Taksifolin

4.4. Tax ve EPI'nin Kaspaz-3/7 seviyelerine *In Vivo* Etkisi

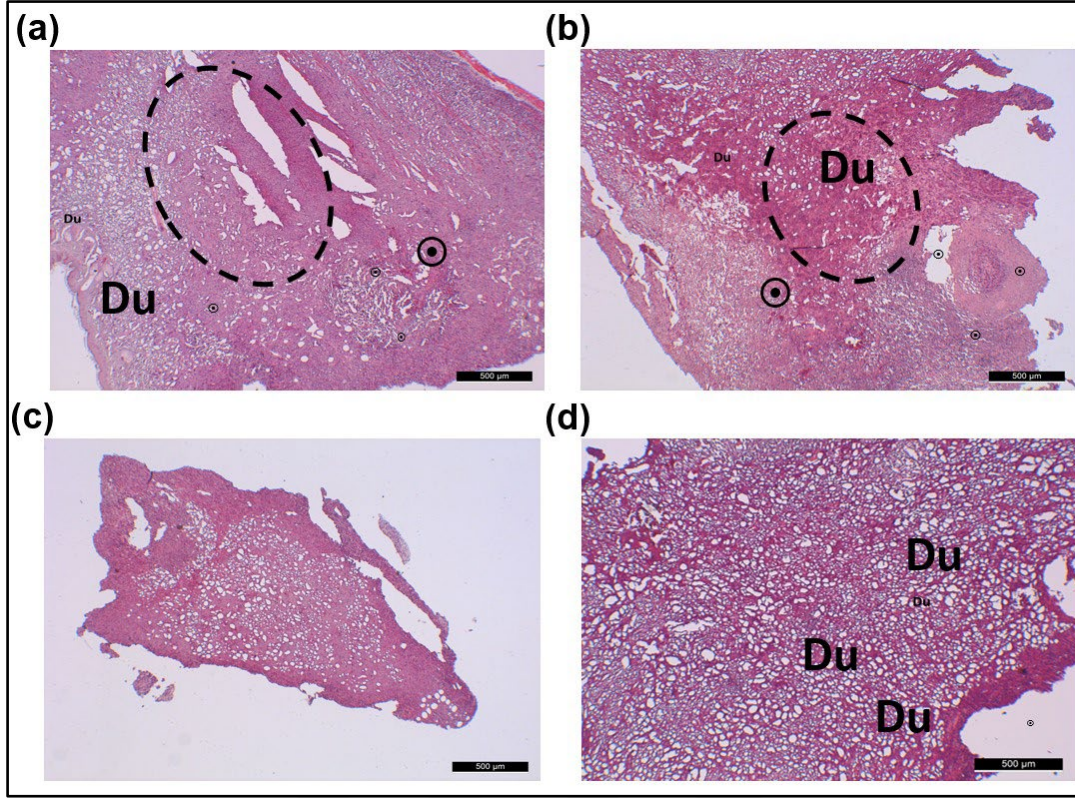
Tümör dokularında apoptoz varlığını doğrulamak için kaspaz-3/7 aktivite seviyeleri belirlenmiştir. Kaspaz-3/7 aktivite seviyeleri, Tax ve EPI ile tek başına tedavi edilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artmıştır ($p < 0.05$). Ek olarak, kaspaz-3/7 aktivite düzeyi kombine grupta kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde artmıştır ($p < 0.05$). Ayrıca, kaspaz-3/7 aktivite seviyesi, tek başına Tax ve EPI ile tedavi edilen gruplar G4 ve G5 ile karşılaştırıldığında kombine grup G6'da önemli ölçüde artmıştır ($p < 0.05$; Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Tax ve/veya EPI'nin tümör dokularındaki kaspaz-3/7 aktivite seviyeleri üzerindeki etkileri. Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Gösterilen sonuçlar üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında $*p<0,05$; kontrol grupları ile karşılaştırıldığında $***p<0,001$. G1: Grup 1; G2: Grup 2; G3: Grup 3; G4: Grup 4; G5: Grup 5; G6: Grup 6. EPI: Epirubisin, Tax: Taksifolin

4.5. Hematoksilen- Eozin Sonuçları

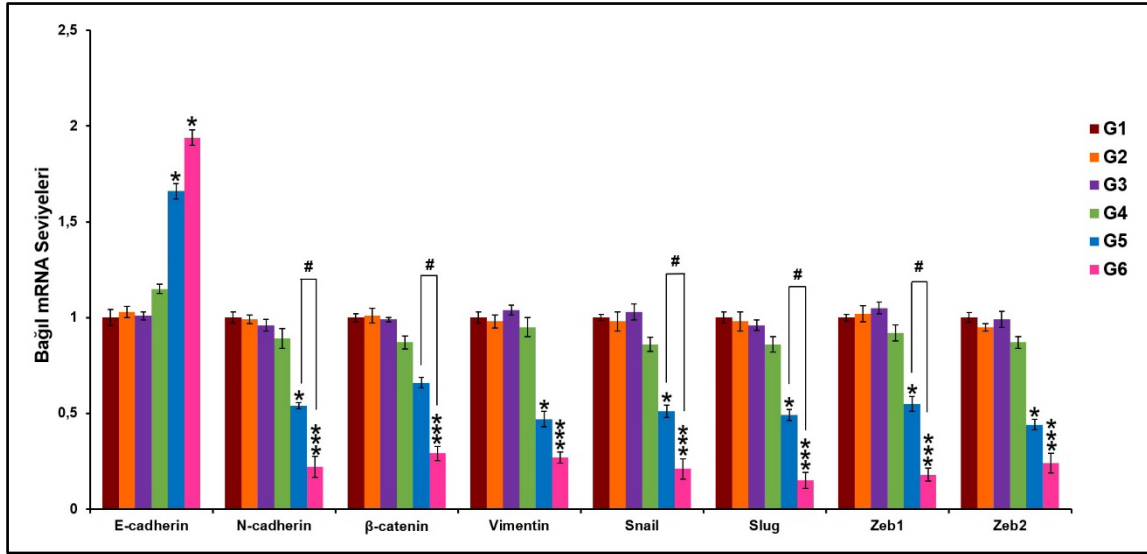
Sham kontrol grubundan alınan meme tümörü örneklerinde, memenin karakteristik kanal yapısının olmadığı merkezi yerleşimli bir tümör alanı gözlenmiştir. Çevre bölgelerde infiltrasyon çok belirgin iken, meme dokusunun kanallarının yüzeye yakın bölgelerde kaldığı dikkat çekmiştir (Resim 4.2a). Tax ile tedavi edilen grupta tümör odağı özellikle merkezi alanda belirginleşirken, sham grubundan farklı olarak periferik alanın yanı sıra tümörün odak alanında da kanalların varlığı dikkat çekti. Bu grupta infiltrasyon daha belirgindi (Resim 4.2b). EPI ile tedavi edilen tümör dokusunda, tümör yapısı diğer gruplarda olduğu gibi merkezi konumdaydı, ancak odak içinde normal meme dokusunda kanal yapılarının varlığı belirgindi. Tüm tümör odağının çevresi infiltratif hücre kümeleri içeriyordu (Resim 4.2c). Tümörlü meme dokusunun tedavisi için Tax+EPI'nin birlikte uygulandığı grupta normal meme dokusunun varlığı dikkat çekti. Tüm alanda kanallar gözlemlendi. Periferik bölgede infiltratif hücreler içeren alanlar belirgindi (Resim 4.2d). Sonuç olarak, sham kontrol grubunda gözlenen tümöral histomorfolojik dönüşüm için en etkili tedavi yönteminin Tax ve EPI'nin birlikte uygulanması olduğu sonucuna varıldı.



Resim 4.2. Her bir grup için (a) Kontrol grubu, (b) Tax ile tedavi edilen grup, (c) EPI ile tedavi edilen grup ve (d) Tax + EPI ile tedavi edilen grubu gösteren meme tümörü doku kesitleri. Kesikli daire içindeki bölge: Tümör alanı, (⊗): İnfiltratif alan, (Du): Normal kanal yapısı (Hematoksilen-eozin X 40). EPI: Epirubisin, Tax: Taksifolin

4.6. Tax ve EPI'nin EMT İlişkili Genlerin *In vivo* mRNA Seviyelerine Etkisi

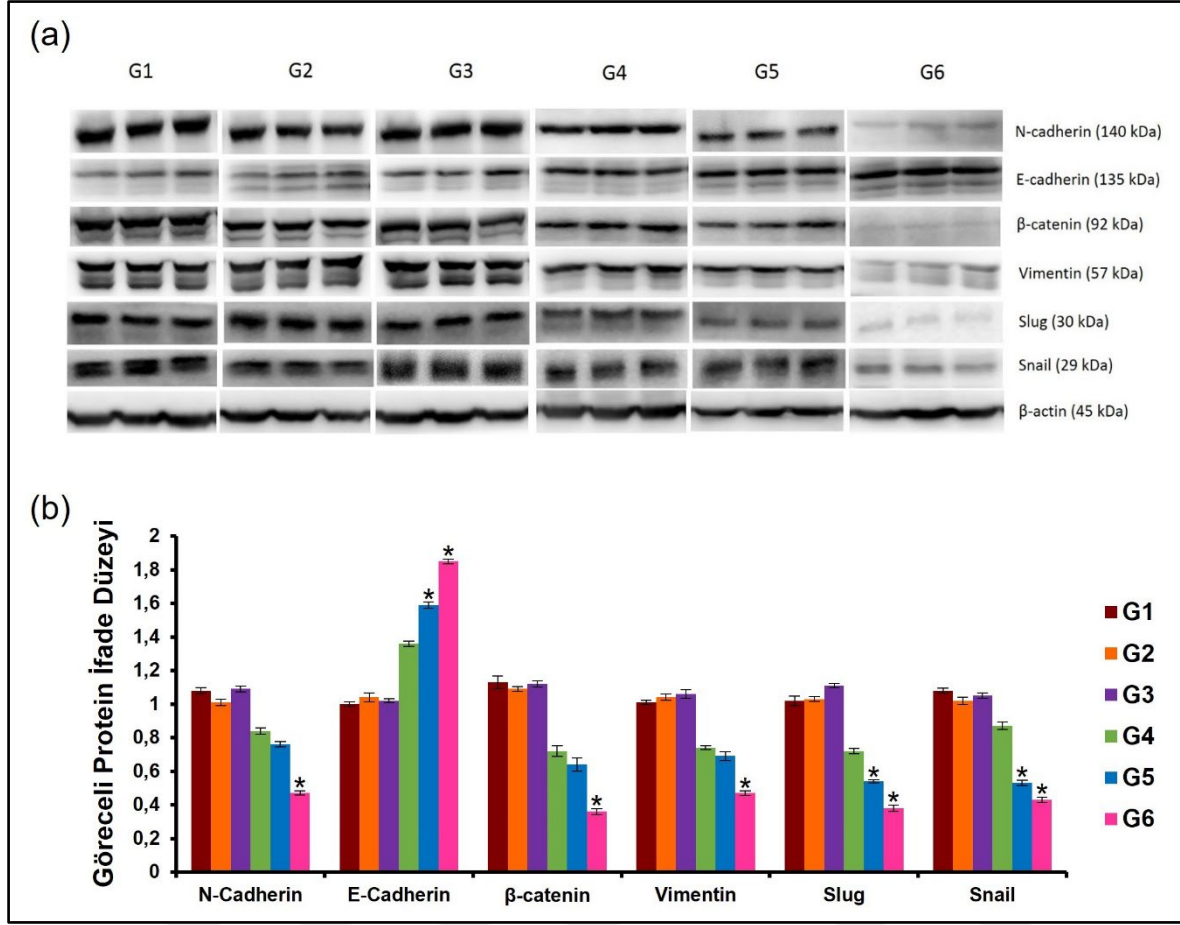
E-cadherin, N-cadherin, β -catenin, Vimentin, Snail, Slug, zinc finger E-box binding homeobox 1 (Zeb1) ve Zeb2 genlerinin mRNA seviyeleri qPCR ile değerlendirilmiştir. E-cadherin mRNA seviyeleri EPI uygulanan grupta (G5) ve Tax+EPI grubunda (G6) kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde artmıştır ($p<0.05$). N-cadherin, β -catenin, Vimentin, Snail, Slug, Zeb1 ve Zeb2 genlerinin mRNA seviyeleri G5 ve G6'da kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşüktü ($p<0.05$). Ayrıca, N-cadherin, β -catenin, Vimentin, Snail, Slug, Zeb1 ve Zeb2 mRNA ekspresyon seviyelerinin G6'da G5'e kıyasla daha düşük olduğu görülmüştür ($p<0.001$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Tax ve/veya EPI'nin tümör dokularında EMT ile ilişkili mRNA düzeyleri üzerindeki etkileri. Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Gösterilen sonuçlar üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında * $p < 0,05$; kontrol grupları ile karşılaştırıldığında *** $p < 0,001$. G1: Grup 1; G2: Grup 2; G3: Grup 3; G4: Grup 4; G5: Grup 5; G6: Grup 6. EPI: Epirubisin, Tax: Taksifolin

4.7. Tax ve EPI'nin EMT İlişkili Proteinlerin Protein Seviyelerine Etkisi

Tümör dokularına uygulanan Tax ve EPI tedavisinin N-cadherin, E-cadherin, β -catenin, Vimentin, Snail ve Slug protein ifade düzeyleri üzerindeki etkilerini analiz etmek için Western blot analizi uygulanmıştır (Şekil 4.8). qPCR sonuçlarıyla uyumlu olarak, E-cadherin protein seviyesi EPI ile tedavi edilen grupta (G5) ve Tax+EPI grubunda (G6) kontrol gruplarına (G1, G2 ve G3) kıyasla anlamlı derecede arttığı görüldü. N-cadherin, β -catenin, Vimentin, Snail ve Slug proteinlerinin seviyeleri EPI ile tedavi edilen grupta (G5) ve Tax+EPI grubunda (G6) kontrol gruplarına (G1, G2 ve G3) kıyasla önemli ölçüde azalmıştır ($p < 0.05$). Ayrıca, tek başına Tax uygulaması (G4) tümör dokularındaki bu proteinlerin seviyelerini değiştirmemiştir ($p > 0.05$).



Şekil 4.8. Tax ve/veya EPI'nin tümör dokularındaki EMT ile ilişkili protein seviyeleri üzerindeki etkileri. Tümör dokusunda EMT ile ilişkili protein seviyelerinin temsili Western blot görüntüleri (a). Tax, EPI ve Tax+EPI ile tedavi edilen farelerin tümör dokularındaki göreceli protein ifade düzeyleri (b). Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Grafikler, her grup için en az üç farklı farede belirtilen proteinlerin kat değişimini temsil etmektedir. Gösterilen sonuçlar üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında $*p < 0.05$. G1: Grup 1; G2: Grup 2; G3: Grup 3; G4: Grup 4; G5: Grup 5; G6: Grup 6. EPI: Epirubisin, Tax: Taksifolin



5. TARTIŞMA

Meme kanseri önemli bir sağlık sorunudur ve kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Meme kanseri için yaygın tedavi yöntemleri arasında kemoterapi, cerrahi, immünoterapi, radyasyon tedavisi ve hormon tedavisi yer almaktadır. EPI, erken evre, ileri evre ve metastatik meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapi ilacıdır [11]. Kanser hücrelerinin DNA'sına müdahale ederek, hücrelerin büyümelerini ve çoğalmalarını engeller ve böylece hücre ölümüne yol açar [11]. EPI genellikle diğer kemoterapi ilaçlarıyla kombinasyon halinde veya daha geniş bir tedavi rejiminin parçası olarakta kullanılabilir. Geniş spektrumlu antitümör etkinliğine sahip güçlü bir kemoterapi ilacı olmasına rağmen, klinik faydası kalp, karaciğer ve böbrek gibi dokularda doza bağlı toksisite ile sınırlı olabilir [54,55].

Kemosensitizasyon, kanser tedavisinde kemoterapi ilaçlarının etkinliğini arttırmak için kullanılan bir stratejidir. Amaç, kanser hücrelerini bu ilaçların toksik etkilerine karşı daha duyarlı hale getirmek ve sonuçta tedavi sonucunu iyileştirmektir. Kemosensitizörler, doğal olarak oluşan veya sentetik olabilen toksik olmayan moleküllerdir. Kanser hücrelerindeki hücresel ortamı veya sinyal yollarını değiştirerek çalışırlar ve bu da onları kemoterapi ilaçlarının sitotoksik etkilerine karşı daha savunmasız hale getirir. Kemosensitizatörleri kemoterapi ilaçlarıyla birleştirerek, kombine tedavinin tek başına her iki tedaviden daha etkili olduğu sinerjik bir etki elde etmek mümkündür. Bu yaklaşım potansiyel olarak kemoterapi tedavisinin etkinliğini artırabilir ve ilaç direnci veya kanser nüksü olasılığını azaltabilir [12,13,56]. Olası kemosensitizörler genellikle flavonoidler gibi doğal maddelerdir. Dihidroquercetin olarak da bilinen Tax, kanser tedavisinde kemosensitizör olarak umut vaat eden bir flavonoid bileşiğidir [57]. Bazı çalışmalar Tax'ın kanser hücrelerini sitotoksik etkilerine karşı hassaslaştırarak kemoterapi ilaçlarının etkinliğini artırabileceğini öne sürmüştür. Öte yandan, çok sayıda çalışma flavonoidlerin serbest radikalleri nötralize etme ve serbest radikal oluşumunu azaltma potansiyelini araştırmıştır. Bu flavonoidler arasında Tax, oksidatif stresi hafifletme ve antioksidan özellikler sergileme kapasitesi nedeniyle özellikle dikkat çekmektedir [58-61]. Najeb ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, sıçanlarda diazinon ve C vitamini kombinasyonlarının neden olduğu miyokardiyal hasar üzerinde Tax'ın antioksidan etkilerini incelemiştir. Tax, stres koşulları altında miyokard hücrelerinde laktat dehidrogenaz (LDH) salgılanma oranlarını etkili bir şekilde azaltarak antioksidan özelliğini göstermiştir [25,62,63]. Lin ve arkadaşları

araştırmalarında, tek başına veya Tax ile birlikte gentamisine maruz bırakılan fare koklear UB/OC-2 hücreleri üzerinde LDH sitotoksosite deneyleri gerçekleştirmişlerdir. Bulguları, Tax'ın antioksidatif özelliklerinin gentamisin tarafından indüklenen oksidatif stresi azalttığını ve Tax uygulaması ile LDH salınımında doza bağlı bir azalma ile sonuçlandığını göstermiştir [64]. Bir başka kombinasyon için gerçekleştirilen in vivo deneylerde, metastatik renal hücreli karsinoma karşı kullanılan kemoterapötik bir ilaç olan Pazopanib tek başına veya Tax ile birlikte uygulanmıştır. Farelerden elde edilen karaciğer dokularından LDH seviyeleri ölçülmüş, Pazopanib ve Tax kombinasyonu ile tedavi edilen gruplarda LDH seviyelerinin düştüğü gözlenmiştir [65]. Yine, Luo ve arkadaşları yaptıkları araştırmada, 12 farklı flavonoidin OVCAR-3 yumurtalık kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. LDH testi sonuçları, Tax'ın çalışılan hücrelerde sitotoksiteyi indüklediğini ortaya koymuştur [66]. Zai ve arkadaşları tarafından yürütülen ayrı bir çalışmada ise, asetaminofenin karaciğer üzerindeki zararlı etkisi ve Tax'ın bu etkilere karşı koyma potansiyeli incelenmiştir. C57BL/6 farelerinden elde edilen hücreler üzerinde LDH sitotoksosite testi yoluyla Tax, LDH salgılanmasındaki azalma ile kanıtlandığı üzere asetaminofenin neden olduğu sitotoksik etkileri hafifletme kabiliyetini göstermiştir [67]. Çalışmamızda, 4T1 hücrelerinin farklı dozlarda Tax ile muamelesi, EPI tarafından indüklenen LDH salınımında doza bağlı bir azalma ile sonuçlanmıştır. Bulgularımız, Tax ve EPI'nin kombine tedavisinin 4T1 hücrelerinde EPI'nin tek başına sitotoksik etkilerini önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. Kilit nokta, daha önce başka çalışmalarda bildirilmiş olan Tax'ın anti-oksidatif özellikleri aracılığıyla EPI kaynaklı sitotoksitenin azaltılmasında yatmaktadır. Kemoterapötik özellikleriyle bilinen EPI, interkalasyon yoluyla DNA'ya bağlanır ve oksidatif stres de dahil olmak üzere çeşitli mekanizmaları aktive ederek hücre ölümüne yol açar. Bu süreçte, Tax'ın antioksidatif işlevleri LDH salınımını tetikleyen mekanizmaların iyileştirilmesine katkıda bulunarak LDH seviyelerinde doza bağlı bir düşüşe yol açar. Tax kanser tedavisinde bir kemosenstizer olarak umut vaat etse de bir tedavi stratejisi olarak yaygın bir şekilde benimsenmeden önce potansiyel faydalarını ve risklerini tam olarak aydınlatmak için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir [68]. Bu çalışmanın amacı, 4T1 hücrelerinde ve allograft BALB/c modelinde BC tedavisinde EPI'nin etkinliğini artırmak için Tax'ın EPI üzerindeki potansiyel etkilerini araştırmak ve altta yatan ilgili mekanizmaları belirlemektir.

Oldukça agresif meme kanseri hücre hattı olan 4T1 ile yapılan in vitro çalışmamızda, Tax ve EPI'nin birlikte uygulanmasıyla hücre canlılığı ve sitotoksitede konsantrasyona ve

zamana bağılı düşüşler gözlemledik. Farklı hücre hatlarının deneysel koşullara, tedavilere ve uyaranlara karşı farklı tepkiler gösterebilmesi hayati önem taşımaktadır. Ancak, kısıtlı bütçe nedeniyle çalışmanın in vitro kısmına başka bir hücre hattı ekleyemedik. Bu nedenle deneyler sadece bir hücre hattında gerçekleştirildi. Bununla birlikte, bir in vivo tümör modeli geliştirerek araştırmamızın kapsamını genişlettik. Bu konuda yapılan ilk çalışma olması nedeniyle literatürde elde ettiğimiz verileri karşılaştırabileceğimiz herhangi bir rapor bulunmamaktadır. Bununla birlikte, Tax'ın farklı kombinasyonlarda araştırıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur [11,64-69]. Tax'ın tümör baskılayıcı rolü çeşitli hücre hatlarında ve in vivo çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmalardan birinde Tax, hücre canlılığını inhibe ederek U-2 OS ve Saos-2 osteosarkom hücre hatları üzerinde anti-kanser etkiler sergilemiştir [70]. Benzer şekilde, başka bir çalışmada Tax ile muamele edilen BC hücrelerinin (MDA-MB-231 ve 4T1) canlılığı ve sitotoksitesinin 48 ve 72 saat sonra önemli ölçüde azaldığı, 24 saatlik maruziyette ise önemli bir değişiklik gözlenmediği öne sürülmüştür [26]. Tax dahil olmak üzere çeşitli flavonoidlerin BC (MDA-MB-231) ve prostat kanseri (LNCaP) hücre hatları üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışma, hücrelere artan konsantrasyonlarda ve sürelerde Tax uygulanmasının hücre canlılığı ve sitotoksitesinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir [71]. Ayrıca, in vivo bir çalışmada, Tax tedavisinin 4T1 hücre türevli allograft tümör taşıyan farelerde tümör büyümesini ve akciğer metastazını etkin bir oranda engellediği gösterilmiştir [26]. MTT ve LDH deneyleriyle de desteklenen sonuçlarımız, Tax ve EPI'nin birlikte uygulanmasının EPI'nin anti-proliferatif etkisini artırdığını göstermiştir. Bu sonuçlar, Tax'ın meme kanseri tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak hizmet edebileceğini ve EPI'nin hücre canlılığı üzerindeki etkisini hafifletebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, Tax'ın EPI ile birlikte uygulanmasının 4T1 hücre hatlarını EPI'ye karşı daha duyarlı hale getirdiğini söyleyebiliriz.

Kanser hücrelerinde hücre ölüm yollarında meydana gelen değişikliklerin izlenmesi ve araştırılması tedavi protokollerinde büyük önem taşımaktadır. Bu yollardan biri olan apoptoz iki ana mekanizmayı içerir: kaspaz-8 aktivasyonunu tetikleyen dışsal yolak ve kaspaz-9 aktivasyonunu tetikleyen içsel yolak. Her iki apoptotik yolakta nihayetinde birden fazla substratın bölünmesinden sorumlu birincil yürütücü olan kaspaz-3'ün aktivasyonunu indükler [72-75]. EPI'nin içsel yolak aracılığıyla tümör hücrelerinde apoptotik süreci indüklediği bilinirken [76], çalışmamız Tax ile kombine uygulamasının bu süreci nasıl etkilediğini göstermiştir. Yalnızca EPI ile tedavi edilen gruba kıyasla birlikte tedavi edilen grupta artan aktif kaspaz-3 seviyesi, Tax'ın 4T1 tümörlerinde EPI ile indüklenen apoptozun

duyarlılığını artırabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, bulgularımızla uyumlu olarak, Tax'ın tek başına uygulanmasının ksenograft BC modelinde kaspaz-3 ve kaspaz-9 seviyelerini artırdığı gösterilmiştir [77]. Benzer şekilde, tek tek uygulanan Tax'ın hepatoselüler karsinom üzerindeki etkilerini araştıran bir başka çalışmada kaspaz-3 seviyelerinde artış gözlenmiştir [78]. Ayrıca, kolorektal karsinom ksenograft modelinde Tax uygulamasına odaklanan farklı bir çalışmada, Tax tedavisi alan gruplarda kaspaz-3 aktivite seviyelerinde artış görülmüştür [68]. Yukarıda belirtilen bulgulara ek olarak, çeşitli çalışmalarda Tax'ın akciğer, osteosarkom ve meme kanserleri üzerinde apoptozu indükleyici etkiler sergilediği gösterilmiştir [58,79,80]. Ayrıca, Tax'ın kolon, mide ve karaciğer kanserine karşı diğer kemoterapötik ajanların apoptotik özelliklerini arttırdığı gözlenmiştir [58,60,80]. Elde ettiğimiz verilerle uyumlu olan bu bulgular, kanser tedavisinde umut vadeden bir terapötik stratejinin varlığını düşündürmektedir ve bu, Tax'ın potansiyel bir terapötik yaklaşım olarak işlev görmesine yönelik umutları artırmaktadır.

4T1 fare meme kanseri hücreleri yüksek invazivlikleri ve kendiliğinden metastaz oluşturma yetenekleri ile bilinmektedir. Bu özellik onları prelinik araştırmalarda meme kanseri metastazını incelemek için önemli bir model haline getirmektedir [1]. EMT, kanser hücresi metastazı ve ilerlemesinde çok önemli bir rol oynar. Epitel hücrelerini mezenkimal hücrelere dönüştüren EMT süreci, çok sayıda moleküler mekanizma ve düzenleyici yolak içeren oldukça karmaşık ve çok yönlü bir süreçtir [8]. EMT anormal şekilde düzenlendiğinde kanser, fibrozis ve doku hasarı gibi çeşitli patolojik durumlara katkıda bulunabilir [8,81]. Kanserde, anormal EMT, kansere bağlı ölümlerin ana nedenlerinden biri olan tümör invazyonunu ve metastazı teşvik edebilir [79]. Çeşitli çalışmalarda, Tax'ın kanser hücresi proliferasyonu ve migrasyonunun inhibisyonu da dahil olmak üzere güçlü anti-kanser etkilerine sahip olduğu gösterilmiştir. Tax'ın mezenkimal belirteçlerin etkilerini azaltarak ve mezenkimal-epitelyal geçişi teşvik ederek kanser metastazında kritik bir adım olan EMT sürecini engellediği gösterilmiştir [8,82,83].

Tax ve EPI kombinasyonunun EMT veya MET üzerindeki etkisini araştırmak için çalışmamızda qPCR ve western blot analizi yapılmıştır. Bu amaçla, E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, β -catenin, Snail ve Slug gibi yer alan anahtar proteinlerin ifade düzeyleri değerlendirilmiştir. Bu proteinlere ek olarak, Zeb1 ve Zeb2 transkripsiyon faktörlerini içeren gruptaki mRNA seviyeleri de değerlendirilmiştir. Sonuçlarımız Tax ve EPI'nin birlikte uygulanmasının N-cadherin, β -catenin, vimentin, snail ve slug protein seviyelerini azaltırken

E-cadherin seviyesini artırdığını ve EMT sürecini tersine çevirdiğini göstermiştir. Ayrıca, birlikte uygulanmaları E-kaderin mRNA seviyelerinde artışa ve N-kaderin, β -katenin, Vimentin, Slug, Snail, Zeb1 ve Zeb2 mRNA seviyelerinde azalmaya yol açmıştır. Literatürdeki bir çalışmaya göre, BC ksenograft modelinin Tax ile tedavisi vimentin ve N-kaderin protein ekspresyonunda azalma ile sonuçlanmıştır [84,85]. Diğer çalışmalar Tax'a maruz kalan BC ksenograftlarının E-cadherin seviyelerinde artış ve β -catenin düzeylerinde azalma sergilediğini göstermiştir [85-88]. Flavonoidlerin BC ksenograftlarında EMT yolunda yer alan transkripsiyon faktörleri üzerindeki etkisini araştıran bu çalışmalardan birinde, E-cadherin gen ifade düzeylerindeki artışın ardından Zeb1 ve Zeb2'nin gen ifade düzeylerinde eş zamanlı bir düşüş olduğu ortaya çıkmıştır. Bu düşüş dolaylı olarak Snail1 ve Snail2/Slug'ın gen ekspresyonunun azalmasına neden olmuş ve sonuç olarak N-cadherin, Vimentin ve β -catenin ifade düzeyini etkilemiştir [88,89]. Çalışmamızın sonuçları, Tax ve EPI'nin birlikte uygulanmasının umut verici bir anti-metastatik etkinliğe sahip olduğunu göstererek, EPI'nin antikanser etkinliğini artırmak için yeni ve benzersiz bir strateji olduğunu düşündürmektedir.

Bir flavonoid olarak Tax'ın deneysel meme kanser dokularında primer tümör büyümesini baskılama yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. Metastatik 4T1 hücreleri taşıyan BALB/c fareleri üzerinde yapılan in vivo çalışmalar, kontrol grubuna kıyasla Tax ve EPI ile birlikte tedavi edilen farelerde tümör büyüme oranında belirgin bir azalma olduğunu göstermiştir. Tax, antioksidan ve anti-inflamatuar etkileri nedeniyle potansiyel anti-kanser özellikleri açısından incelenmiştir. Bu özellikler kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını engellemeye yardımcı olabilir [23,25,26,59-61,70,72,79-83]. Bu veriler, Tax ve EPI'nin birlikte uygulanmasının, hayvan vücut ağırlığında önemli bir değişiklik olmaksızın apoptoz indüksiyonu yoluyla tümör boyutunu ve büyümesini azaltmada in vivo etkisini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, bulgularımız Tax ve EPI'nin birlikte uygulanmasının apoptozu indükleyerek ve EMT yolunu inhibe ederek 4T1 meme kanseri hücrelerine ve 4T1 taşıyan tümörlere karşı etkili olduğuna dair kanıtlar sunmaktadır. EPI yaygın olarak kemoterapötik bir ajan olarak kullanılırken, çalışmamız Tax'ın EPI ile birlikte uygulanmasının 4T1 hücre hatlarını ve 4T1 taşıyan tümör modelini EPI'ye karşı hassaslaştırdığını ortaya koymaktadır. Bu duyarlılık, EMT ilerlemesinin tersine çevrilmesine yol açan gen ve protein ifade düzeylerindeki değişiklikler yoluyla elde edilmektedir. Bu bulgular, Tax'ın BC tedavisinde EPI'nin

etkinliğini artırmak için yardımcı tedavi olarak potansiyelini vurgulamaktadır. Literatüre yeni bulgular sunan çalışmamız, Tax'ın kanser hücresi eradikasyonu ve metastazın azaltılması açısından EPI'nin terapötik etkinliğini etkili bir şekilde artırdığını başarıyla göstermektedir. Çalışmamızın sonuçları, Tax'ın BC tedavisi için umut verici bir terapötik yaklaşım ve yeni bir strateji olduğunu vurgulayabilir. Son olarak, Tax ve farklı kemoterapi ilaçları arasındaki ilişkinin gelecekteki çalışmalarda meme kanseri modellerinde araştırılması önerilmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Taksifolinin kanser, Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıklar üzerindeki etkilerini doğrulayan yeni araştırmalar, bu flavonoidin önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalar, taksifolinin antrasiklin ailesinden Epirubisin gibi ticari olarak temin edilebilen bir ilaçla kombinasyon halinde kullanıldığında, Epirubisinin hücrelerde daha hassas bir şekilde etkileşime girmesini tetiklediğini ve bu sayede Epirubisinin antitümör özelliklerini artırdığını göstermektedir. Taksifolinin bu etki mekanizması, metastaz mekanizmalarını baskılayarak kanser hücrelerinin diğer dokulara yayılmasını engelleyebileceği ve böylece kanserin yayılmasını durdurabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, yapılacak in vitro ve in vivo çalışmalar ile taksifolinin, Epirubisin ile düşük dozlu birlikteliklerinin 4T1 meme kanser hücre hattı ve deneysel meme kanseri modeli üzerindeki potansiyel kanser önleyici etkisinin belirlenmesi, daha etkin tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilir. Ayrıca, bu çalışmalar taksifolinin uyardığı ya da baskıladığı sinyal yollarını tanımlayarak, bu yollara özgül olabilecek yeni moleküllerin tasarlanmasına ve meme kanseri tedavisinde daha başarılı yaklaşımların ortaya çıkmasına da yardımcı olabilir. Bu tür çalışmaların, kanser tedavisindeki ilerlemeler için önemli bir adım olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, taksifolinin gelecekte kanser tedavisinde güçlü bir kemosenstizör olarak kullanılabileceği ve diğer terapötik ilaçlarla birlikte kullanılması gerektiği öne sürülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Li, J., Hu, L., Zhou, T., Gong, X., Jiang, R., Li, H., Kuang, G., Wan, J., and Li, H. (2019). Taxifolin inhibits breast cancer cells proliferation, migration and invasion by promoting mesenchymal to epithelial transition via β -catenin signaling. *Life Sciences*, 232, 116617.
2. Wu, J., Xue, X., Zhang, B., Cao, H., Kong, F., Jiang, W., Li, J., Sun, D., and Guo, R. (2016). Enhanced antitumor activity and attenuated cardiotoxicity of Epirubicin combined with Paeonol against breast cancer. *Tumor Biology*, 37(9), 12301-12313.
3. DeSantis, C. E., Ma, J., Goding Sauer, A., Newman, L. A., and Jemal, A. (2017). Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(6), 439-448.
4. İnternet: URL: <https://hsqm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri>, adresinden 23 Mart 2023'te alınmıştır.
5. Karaaslan, S. (2009). *ER(-), PR (-) ve HER2 (-) Meme kanseri olgularının moleküler ve klinik karakteristiklerinin irdelenmesi*. Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, 8.
6. Ismail-Khan, R., and Bui, M. M. (2010). A review of triple-negative breast cancer. *Cancer control*, 17(3), 173-176.
7. de Ruijter, T. C., Veeck, J., de Hoon, J. P., van Engeland, M., and Tjan-Heijnen, V. C. (2011). Characteristics of triple-negative breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137, 183-192.
8. Reddy, K. B. (2011). Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options. *Current Oncology*, 18(4), 173-179.
9. Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., and Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1438-1449.
10. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
11. Boyer, B., Vallés, A. M., and Edme, N. (2000). Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochemical Pharmacology*, 60(8), 1091-1099.
12. Kalluri, R. (2009). EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1417-1419.
13. Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M., and Ford, H. L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15, 117-134.
14. Khasraw, M., Bell, R., and Dang, C. (2012). Epirubicin: is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. *The Breast*, 21(2), 142-149.

15. Jamieson, D., Lee, J., Cresti, N., Jackson, R., Griffin, M., Sludden, J., Verrill, M., and Boddy, A. V. (2014). Pharmacogenetics of adjuvant breast cancer treatment with cyclophosphamide, epirubicin and 5-fluorouracil. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 74, 667-674.
16. Yamaguchi, N., Fujii, T., Aoi, S., Kozuch, P. S., Hortobagyi, G. N., and Blum, R. H. (2015). Comparison of cardiac events associated with liposomal doxorubicin, epirubicin and doxorubicin in breast cancer: a Bayesian network meta-analysis. *European Journal of Cancer*, 51(16), 2314-2320.
17. Hanafi-Bojd, M. Y., Jaafari, M. R., Ramezani, N., Xue, M., Amin, M., Shahtahmassebi, N., and Malaekhe-Nikouei, B. (2015). Surface functionalized mesoporous silica nanoparticles as an effective carrier for epirubicin delivery to cancer cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 89, 248-258.
18. Topal, F., Nar, M., Gocer, H., Kalin, P., Kocyigit, U. M., Gülçin, İ., and Alwasel, S. H. (2016). Antioxidant activity of taxifolin: an activity–structure relationship. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(4), 674-683.
19. Abugri, D. A., Witola, W. H., Russell, A. E., and Troy, R. M. (2018). In vitro activity of the interaction between taxifolin (dihydroquercetin) and pyrimethamine against *Toxoplasma gondii*. *Chemical Biology and Drug Design*, 91(1), 194-201.
20. Adachi, S. I., Nihei, K. I., Ishihara, Y., Yoshizawa, F., and Yagasaki, K. (2017). Anti-hyperuricemic effect of taxifolin in cultured hepatocytes and model mice. *Cytotechnology*, 69, 329-336.
21. Chen, X., Gu, N., Xue, C., and Li, B. R. (2018). Plant flavonoid taxifolin inhibits the growth, migration and invasion of human osteosarcoma cells. *Molecular Medicine Reports*, 17(2), 3239-3245.
22. Haque, M. W., and Pattanayak, S. P. (2017). Taxifolin inhibits 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced breast carcinogenesis by regulating AhR/CYP1A1 signaling pathway. *Pharmacognosy Magazine*, 13(4), 749-755.
23. Manigandan, K., Manimaran, D., Jayaraj, R. L., Elangovan, N., Dhivya, V., and Kaphle, A. (2015). Taxifolin curbs NF- κ B-mediated Wnt/ β -catenin signaling via up-regulating Nrf2 pathway in experimental colon carcinogenesis. *Biochimie*, 119, 103-112.
24. Hossain, M. M., and Ray, S. K. (2014). EWS knockdown and taxifolin treatment induced differentiation and removed DNA methylation from p53 promoter to promote expression of Puma and Noxa for apoptosis in Ewing's sarcoma. *Journal of Cancer Therapy*, 5(12), 1092.
25. Zhang, Z. R., Al Zaharna, M., Wong, M. M. K., Chiu, S. K., and Cheung, H. Y. (2013). Taxifolin enhances andrographolide-induced mitotic arrest and apoptosis in human prostate cancer cells via spindle assembly checkpoint activation. *PLoS One*, 8(1), e54577.

26. Oi, N., Chen, H., Ok Kim, M., Lubet, R. A., Bode, A. M., and Dong, Z. (2012). Taxifolin suppresses UV-induced skin carcinogenesis by targeting EGFR and PI3K. *Cancer Prevention Research*, 5(9), 1103–1114.
27. Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), 178–196.
28. Nieto, M. A., Huang, R. Y. J., Jackson, R. A., and Thiery, J. P. (2016). EMT:2016. *Cell*, 166(1), 21–45.
29. Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141(1), 52–67.
30. Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., and Lyden, D. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*, 18(6), 883–891.
31. Wu, Y., and Zhou, B. P. (2010). New insights of epithelial–mesenchymal transition in cancer metastasis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40(7), 643–650.
32. Tsai, J. H., Donaher, J. L., Murphy, D. A., Chau, S., and Yang, J. (2012). Spatiotemporal regulation of epithelial–mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell*, 22(6), 725–736.
33. Fischer, K. R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S. T. C., and Klein, C. A. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, 527(7579), 472–476.
34. De Wever, O., and Mareel, M. (2003). Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *Journal of Pathology*, 200(4), 429–447.
35. Hong, J., Zhou, J., Fu, J., He, T., Qin, J., Wang, L., and Chen, L. (2015). Phosphorylation of serine 68 of Twist1 by MAPKs stabilizes Twist1 protein and promotes breast cancer cell invasiveness. *Cancer Research*, 76(12), 3626–3640.
36. Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer*, 7(6), 415–428.
37. Nakajima, S., Doi, R., Toyoda, E., Tsuji, S., Wada, M., Koizumi, M., and Hosotani, R. (2004). N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10(12), 4125–4133.
38. Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, 149(6), 1192–1205.
39. Qiao, Y., Chen, J., Lim, Y. B., Finch-Edmondson, M. L., Seshachalam, V. P., Qin, L., and Sudol, M. (2017). YAP regulates actin dynamics through ARHGAP29 and promotes metastasis. *Cell Reports*, 19(8), 1495–1502.
40. Satelli, A., and Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(18), 3033–3046.

41. Vuoriluoto, K., Haugen, H., Kiviluoto, S., Mpindi, J. P., Nevo, J., Gjerdrum, C., and Ivaska, J. (2011). Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*, 30(12), 1436-1448.
42. Hajra, K. M., Chen, D. Y., and Fearon, E. R. (2002). The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Research*, 62(6), 1613–1618.
43. Valenta, T., Hausmann, G., and Basler, K. (2012). The many faces and functions of β -catenin. *The EMBO Journal*, 31(12), 2714-2736.
44. Jolly, M. K., Ware, K. E., Gilja, S., Somarelli, J. A., and Levine, H. (2017). EMT and MET: necessary or permissive for metastasis?. *Molecular Oncology*, 11(7), 755-769.
45. Nieto, M. A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 3(3), 155-166.
46. Barrallo-Gimeno, A., & Nieto, M. A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*, 132(14), 3151–3161.
47. Zhang, K., Rodriguez-Aznar, E., Yabuta, N., Owen, R. J., Mingot, J. M., Nojima, H., and Longmore, G. D. (2012). Lats2 kinase potentiates Snail1 activity by promoting nuclear retention upon phosphorylation. *The EMBO Journal*, 31(1), 29-43.
48. Zhan, T., Rindtorff, N., and Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, 36(11), 1461-1473.
49. Ganesan, R., Mallets, E., and Gomez-Cambronero, J. (2016). The transcription factors Slug (SNAI2) and Snail (SNAI1) regulate phospholipase D (PLD) promoter in opposite ways towards cancer cell invasion. *Molecular Oncology*, 10(5), 663-676.
50. Liang, Y. C., Berton, S., Reeks, C., and Sun, J. (2022). An in vivo biosafety-level-2-compatible model of Mycobacterium tuberculosis infection for drug susceptibility testing. *STAR Protocols*, 3(3), 101575.
51. Yang, H., Wu, C., Liu, F., Wang, M., Zou, P., He, Y., Liu, Q., Zhou, Q., and Zhou, S. (2019). Blood Collection Through Subclavian Vein Puncture in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 147.
52. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36.
53. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-8.
54. Kebieche, M., Lakroun, Z., Lahouel, M., Bouayed, J., Meraihi, Z., and Soulimani, R. (2009). Evaluation of epirubicin-induced acute oxidative stress toxicity in rat liver cells and mitochondria, and the prevention of toxicity through quercetin administration. *Exp Toxicol Pathol*, 61(2):161-167.

55. Ichioka, D., Miyazaki, J., Inoue, T., Kageyama, S., Sugimoto, M., Mitsuzuka, K., Matsui, Y., Shiraishi, Y., Kinoshita, H., Wakeda, H., Nomoto, T., Kikuchi, E., and Nishiyama, H. (2015). Impact of renal function of patients with advanced urothelial cancer on eligibility for first-line chemotherapy and treatment outcomes. *Jpn Journal Clinical Oncol*, 45(9), 867-873.
56. Liu, F.S. (2009). Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy--a quick review. *Taiwan Journal Obstet Gynecol*, 48(3), 239-44.
57. Butt, S.S., Khan, K., Badshah, Y., Rafiq, M., and Shabbir, M. (2021). Evaluation of pro-apoptotic potential of taxifolin against liver cancer. *Peer Journal*, 9:e11276.
58. Dostal, Z., Sebera, M., Srovnal, J., Staffova, K., and Modriansky, M. (2021). Dual effect of taxifolin on ZEB2 cancer signaling in HepG2 cells. *Molecules*, 26(5), 1476.
59. Xie, J., Pang, Y., and Wu, X. (2021). Taxifolin suppresses the malignant progression of gastric cancer by regulating the AhR/CYP1A1 signaling pathway. *Int Journal Mol Medicine*, 48(5), 1097.
60. Kolhir, V.K., Bykov, V.A., Baginskaja, A.I., Sokolov, S.Y., Glazova, N.G., Leskova, T.E., Sakovich, G.S., Tjukavkina, N.A., Kolesnik, Y.A., and Rulenko, I.A. (1996). Antioxidant Activity of a Dihydroquercetin Isolated from *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr. *Wood Phytother Res*, 10(6), 478-482.
61. Speisky, H., and Shahidi, F. (2022). Costa de Camargo A, Fuentes J. Revisiting the Oxidation of Flavonoids: Loss, conservation or enhancement of their antioxidant properties. *Antioxidants (Basel)*, 11(1), 133.
62. Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035-1042.
63. Najeb, S. M., Jaccob, A. A., Al-Moziel, M. S., and Abdulhameed, H. M. (2022). Cardioprotective and antioxidant effects of taxifolin and vitamin C against diazinone-induced myocardial injury in rats. *Environmental Analysis, Health and Toxicology*, 37(1).
64. Lin, J. N., Wang, J. S., Lin, C. C., Lin, H. Y., Yu, S. H., Wen, Y. H., and Wu, H. P. (2022). Ameliorative effect of taxifolin on gentamicin-induced ototoxicity via down-regulation of apoptotic pathways in mouse cochlear UB/OC-2 cells. *Journal of the Chinese Medical Association*, 85(5), 617-626.
65. Akagunduz, B., Ozer, M., Ozcicek, F., Kara, A. V., LAcin, S., Özkaraca, M., and Suleyman, H. (2021). Protective effects of taxifolin on pazopanib-induced liver toxicity: an experimental rat model. *Experimental Animals*, 70(2), 169-176.
66. Luo, H., Jiang, B.H., King, S.M., and Chen, Y.C. (2008). Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids. *Nutr Cancer*, 60(6), 800-809.
67. Zai, W., Chen, W., Luan, J., Fan, J., Zhang, X., Wu, Z., Ding, T., Ju, D., and Liu, H. (2018). Dihydroquercetin ameliorated acetaminophen-induced hepatic cytotoxicity via activating JAK2/STAT3 pathway and autophagy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102(3), 1443-1453.

68. Chen, H.J., Chung, Y.L., Li, C.Y., Chang, Y.T., Wang, C.C.N., Lee, H.Y., Lin, H.Y., and Hung, C.C. (2018). Taxifolin Resensitizes Multidrug Resistance Cancer Cells via Uncompetitive Inhibition of P-Glycoprotein Function. *Molecules*, 23(12), 3055.
69. Wu, J., Xue, X., Zhang, B., Cao, H., Kong, F., Jiang, W., Li, J., Sun, D., and Guo, R. (2016). Enhanced antitumor activity and attenuated cardiotoxicity of Epirubicin combined with Paeonol against breast cancer. *Tumour Biol*, 37(9), 12301-12313.
70. Chen, X., Gu, N., Xue, C., and Li, B. R. (2018). Plant flavonoid taxifolin inhibits the growth, migration and invasion of human osteosarcoma cells. *Molecular Medicine Reports*, 17(2), 3239-3245.
71. Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G., and Swinnen, J.V. (2005). Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal Biol Chem*, 280(7):5636-45.
72. Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
73. Lowe, S. W., and Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), 485-495.
74. Green, D. R., and Evan, G. I. (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell*, 1(1), 19-30.
75. Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776.
76. Huang, T. C., Chiu, P. R., Chang, W. T., Hsieh, B. S., Huang, Y. C., Cheng, H. L., Huang, L. W., Hu, Y. C., and Chang, K. L. (2018). Epirubicin induces apoptosis in osteoblasts through death-receptor and mitochondrial pathways. *Apoptosis*, 23, 226-236.
77. Mohammed, H. A., Almahmoud, S. A., El-Ghaly, E. S. M., Khan, F. A., Emwas, A. H., Jaremko, M., Almulhim, F., Khan, R. A., and Ragab, E. A. (2022). Comparative anticancer potentials of taxifolin and quercetin methylated derivatives against HCT-116 cell lines: effects of O-methylation on taxifolin and quercetin as preliminary natural leads. *ACS Omega*, 7(50), 46629-46639.
78. Kabel, A. M., Arab, H. H., and Elmaaboud, M. A. (2021). Attenuation of diethyl nitrosamine-induced hepatocellular carcinoma by taxifolin and/or alogliptin: The interplay between toll-like receptor 4, transforming growth factor beta-1, and apoptosis. *Human and Experimental Toxicology*, 40(10), 1710-1720.
79. Chaffer, C. L., San Juan, B. P., Lim, E., and Weinberg, R. A. (2016). EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 35(4), 645-654.
80. Fisher, R., Pusztai, L., and Swanton, C. (2013). Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *British Journal of Cancer*, 108(3), 479-485.
81. Miller, K. D., Siegel, R. L., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Kramer, J. L., Rowland, J. H., Stein, K. D., Alteri, R., and Jemal, A. (2016). Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(4), 271-289.

82. Schottenfeld, D., and Fraumeni Jr, J. F. (Eds.). (2006). *Cancer epidemiology and prevention*. Oxford: Oxford University Press, 1108.
83. Yoo, K. Y., and Shin, H. R. (2003). Cancer epidemiology and prevention. *Epidemiology and Health*, 25(1), 1-15.
84. Aizawa, K., Liu, C., Tang, S., Veeramachaneni, S., Hu, K. Q., Smith, D. E., and Wang, X. D. (2016). Tobacco carcinogen induces both lung cancer and non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinomas in ferrets which can be attenuated by lycopene supplementation. *International Journal of Cancer*, 139(5), 1171-1181.
85. Poon, S. L., McPherson, J. R., Tan, P., Teh, B. T., and Rozen, S. G. (2014). Mutation signatures of carcinogen exposure: genome-wide detection and new opportunities for cancer prevention. *Genome Medicine*, 6, 1-14.
86. Trafialek, J., and Kolanowski, W. (2014). Dietary exposure to meat-related carcinogenic substances: is there a way to estimate the risk?. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(6), 774-780.
87. Cumberbatch, M. G., Cox, A., Teare, D., and Catto, J. W. (2015). Contemporary occupational carcinogen exposure and bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Medical Association Oncology*, 1(9), 1282-1290.
88. Antwi, S. O., Eckert, E. C., Sabaque, C. V., Leof, E. R., Hawthorne, K. M., Bamlet, W. R., Chaffee, K. G., Oberg, A. L., and Petersen, G. M. (2015). Exposure to environmental chemicals and heavy metals, and risk of pancreatic cancer. *Cancer Causes and Control*, 26, 1583-1591.
89. Meacham, C. E., and Morrison, S. J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, 501(7467), 328-337.





EK-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 25.03.2021-E.58425



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-66332047-604.01.02-58425
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Görevlisi

Araştırmacı grubu Atiye Seda YAR SAĞLAM, Ece KONAÇ, Gökçe Nur YÜCEL, Muhammet OCAK'tan oluşan, G.Ü.ET-21.016 kod numaralı ve "*Fare Meme Kanseri Hücrelerinde Taxifolin ve Epirubicin'in Epitelial-Mezenkimal Geçiş Üzerine in vitro in vivo Etkilerinin Belirlenmesi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-21.016 and entitled "*Determination of in vitro and in vivo effects of taxifolin and epirubicin on epithelial -mesenchymal transition in mouse breast cancer cells*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Fare BALB/c
Hayvan Sayısı : 62

Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek: 1 Liste

Belge Doğrulama Kodu : BEZPAYHKM

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Takip Adresi : <https://belgedogrulama.gazi.edu.tr/belgedogrulama.aspx>



Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No :6/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/
Kep Adresi: gaziuniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için :Esengül BOŞNAK
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:03122022666



Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1. (devam) Etik Kurul Onayı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 04/03/2021		TOPLANTI SAYISI : 02	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)			
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU			
Prof.Dr.Tuncay PEKER			
Prof.Dr.Fatma AKAR			
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIÇIK			
Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ			
Doç.Dr.Emre BARIŞ			
Doç.Dr.İpek SÜNTAR			
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR			
Öğr.Gör.Dr.Şeyda DİKER			
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM			
Vet.Hek.Burcu AVCI			
Osman İÇ			

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : OCAK, Muhammet
Uyruğu : T.C.

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü /Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Lisans	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Makine Mühendisliği 4. Sınıf.	Devam Ediyor (Pasif)
Yüksek Lisans	Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Anabilim Dalı	2017
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (Erasmus: Macaristan Corvinus University of Budapest, 2013)	2014

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2018- Devam ediyor	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu Bitkisel Ve Hayvansal Üretim Bölümü	Öğretim Görevlisi
2018- 2019	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Teknoloji Transfer Ofisi	Modül Sorumlusu
2019- Devam ediyor	Cumhurbaşkanlığı Destekli Bölgesel Kalkınma ve İhtisaslaşma Programı Pilot Tarım ve Jeotermal Koordinatörlüğü	Koordinatör Yardımcısı
2019- Devam ediyor	Kalite Yönetim Koordinatörlüğü	Kalite Temsilcisi
2021- 2023	UNİKOP Kalkınma Konsensusu	Dönem Genel Sekreter Yardımcısı

Yabancı Dil

İngilizce C2, Almanca B2, Japonca A2

Yayınlar

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Ocak, M., Usta, D.D., Arik Erol, G.N., Take Kaplanoglu, G., Konaç, E. Yar Sağlam, A.S. (2024). Determination of *In Vitro* and *In Vivo* Effects of Taxifolin and Epirubicin on Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2024;23. doi:10.1177/15330338241241245.

Ulusal/Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. M. Ocak, D.D. Usta, G.N. Arik Erol, G. Take Kaplanoglu, E. Konac, A.S. Yar Sağlam. Determination of *In Vitro* and *In Vivo* Effects of Taxifolin and Epirubicin on Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells. *3rd International Multidisciplinary Cancer Research Congress*, September 7-10, 2023 at Istanbul, Türkiye Republic.

Ulusal/Uluslararası Projeler

1. “Fare Meme Kanseri Hücrelerinde Taxifolin ve Epirubicin’in Epitelial-Mezenkimal Geçiş Üzerine *in vitro* ve *in vivo* Etkilerinin Belirlenmesi”, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinasyon Birimi (BAP), Doktora Tez Projesi, 2024, Proje No: TDK-2021-7081, Araştırmacı, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM, Tamamlandı.
2. “Sinovial Mezenkimal Kök Hücrelerin Polarizasyonunda Yer Alan Genlerin Otoinflamasyonda Ekspresyonu ve Farmakolojik Modülasyonu”, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinasyon Birimi (BAP), Tıp Fakültesi Araştırma Projesi, 2018, Proje No: 16-TIP-077, Araştırmacı, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Afif BERDELİ, Tamamlandı.
3. “Sinovial Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Polarizasyonunda Yer Alan Gen-Protein Ekspresyonu ve Farmakolojik Modülasyonu”, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinasyon Birimi (BAP), Yüksek Lisans Projesi, 2017, Proje No: 16-SBE-005, Araştırmacı, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Afif BERDELİ, Tamamlandı.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..