



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



ÇEŞİTLİ KEMOTERAPÖTİKLERİN MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDE FERROPTOZU İNDÜKLEYİCİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Erva ÖZKAN

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ**

**ANKARA
2022**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ KEMOTERAPÖTİKLERİN MEME KANSERİ
HÜCRELERİ ÜZERİNDE FERROPTOZU
İNDÜKLEYİCİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Erva ÖZKAN

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ

Bu araştırma TÜBİTAK'ın 220S368 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
2022

ETİK BEYAN FORMU

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Çeşitli Kemoterapötiklerin Meme Kanseri Hücreleri Üzerinde Ferroptozu İndükleyici Etkilerinin Araştırılması*” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Erva ÖZKAN

08.11.2022

KABUL ONAY FORMU

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalında

Erva ÖZKAN tarafından hazırlanan

“Çeşitli Kemoterapötiklerin Meme Kanseri Hücreleri Üzerinde Ferroptozu

İndükleyici Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile
kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08.11.2022

Prof. Dr. Bilgehan DOĞRU

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Aymelek GÖNENÇ

Gazi Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ

Ankara Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Tuba TÜYLÜ KÜÇÜKKILINÇ

Hacettepe Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ

Ankara Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan Formu	ii
Kabul Onay Formu	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler Ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1.Meme Kanseri	1
1.1.1.Meme Kanseri İnsidansı ve Risk Faktörleri	1
1.1.2. Meme Kanserinde Kullanılan Kemoterapötikler	2
1.2. Hücresel Antioksidan Sistem	5
1.2.1.Oksidatif Stres ve Kanseri İlişkisi	6
1.3. Ferroptoz	7
1.3.1.Ferroptozun Tanımı	7
1.3.2.Ferroptoz Mekanizması ve Kanseri İle İlişkisi	8
1.3.3.Ferroptoz İle İlgili Yapılan Çalışmalar	13
2. GEREÇ VE YÖNTEM	14
2.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller	14
2.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	14
2.3. Test Örneklerinin Hazırlanması	15
2.4. Sitotoksikite Tayini	15
2.5. Oksidatif Stres Tayini	16
2.6. Mitokondriyal Membran Potansiyeli Ölçümü	16
2.7. Lipid Peroksidasyonu Tayini	16
2.8. Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Tayini	17
2.9. Glutasyon Düzeyleri Tayini	18
2.10. Western Blot Analizi	18
2.11. İstatistiksel Analiz	19
3. BULGULAR	20
3.1. Hücre Canlılığı Deney Sonuçları	20
3.1.1. Sisplatinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	20
3.1.2. Dosetaksel'in Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	23
3.1.3. Etopozidin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	27
3.1.4. Erastinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	30
3.1.5. Sisplatinin ve Erastin Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	33
3.1.6. Dosetakselin ve Erastin Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	36
3.1.7. Etopozidin ve Erastin Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	39
3.1.8. Kemoterapötik Uygulamaların Kanseri Hücreleri ve Sağlıklı Hücrelerdeki Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması	41

3.2. Oksidatif Stres Tayini Deney Sonuçları	44
3.2.1. Sisplatin ve Erastin Kombinasyonunun Oksidatif Strese Etkisi	44
3.2.2. Dosetaksel ve Erastin Kombinasyonunun Oksidatif Strese Etkisi	46
3.2.3. Etopozid ve Erastin Kombinasyonunun Oksidatif Strese Etkisi	49
3.3. Mitokondriyal Membran Potansiyeli Ölçüm Sonuçları	50
3.3.1. Sisplatin ve Erastin Kombinasyonunun Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerindeki Etkileri	50
3.3.2. Dosetaksel ve Erastin Kombinasyonunun Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerindeki Etkileri	52
3.3.3. Etopozid ve Erastin Kombinasyonunun Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerindeki Etkileri	55
3.4. Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Deney Sonuçları	57
3.4.1. Sisplatin ve Erastin Kombinasyonunun Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkileri	57
3.4.2. Dosetaksel ve Erastin Kombinasyonunun Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkileri	58
3.4.3. Etopozid ve Erastin Kombinasyonunun Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkileri	60
3.5. Hücre içi Glutasyon Düzeyleri Ölçüm Sonuçları	61
3.5.1. Sisplatin ve Erastin Kombinasyonunun Hücre içi Glutasyon Düzeyleri Üzerindeki Etkileri	61
3.5.2. Dosetaksel ve Erastin Kombinasyonunun Hücre İçi Glutasyon Düzeyleri Üzerindeki Etkileri	63
3.5.3. Etopozid ve Erastin Kombinasyonunun Hücre İçi Glutasyon Düzeyleri Üzerindeki Etkileri	65
3.6. Lipid Peroksidasyonu Tayini Deney Sonuçları	66
3.6.1. Sisplatin ve Erastin Kombinasyonunun Lipid Peroksidasyonu Üzerindeki Etkileri	66
3.6.2. Dosetaksel ve Erastin Kombinasyonunun Lipid Peroksidasyonu Üzerindeki Etkileri	67
3.6.3. Etopozid ve Erastin Kombinasyonunun Lipid Peroksidasyonu Üzerindeki Etkileri	69
3.7. Ferroptotik Protein Ekspresyonu Analiz Sonuçları	70
3.7.1. Sisplatin ve Erastin Kombinasyonunun Ferroptotik Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi	70
3.7.2. Dosetaksel ve Erastin Kombinasyonunun Ferroptotik Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi	71
3.7.3. Etopozid ve Erastin Kombinasyonunun Ferroptotik Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi	73
4. TARTIŞMA	74
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	84
ÖZET	85
SUMMARY	86
KAYNAKLAR	87
EKLER	96
Ek-1. Turnitin Raporu	96
ÖZGEÇMİŞ	97

ÖNSÖZ

Ülkemizde ve dünyada kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türü meme kanseridir. Klinikte çeşitli tedavi seçenekleri olmakla birlikte, ilaç direnci ve hastalığın nüks etmesi gibi problemler tedavinin başarı oranını olumsuz etkilemektedir. Bununla birlikte, metastatik kanser türlerinde hayatta kalım oranı da düşmektedir. Bu nedenle, mevcut tedavi yöntemlerinin iyileştirilmesi ve/veya yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi önem arz etmektedir. Bu tez çalışması ile çeşitli meme kanseri hücrelerinde, yakın zamanda tanımlanmış bir hücre ölüm mekanizması olan ferroptozun kemoterapötiklerin etkinliğinin arttırılmasındaki rolü araştırılmıştır. Elde edilen verilerin literatüre önemli oranda katkı sağlaması hedeflenmektedir.

Doktora eğitimim boyunca bana yol gösteren, bilgi ve tecrübeleriyle yolumu aydınlatan, her konuda destek veren çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, her zaman yanımda olan ve bilim insanı olma yolunda beni daima teşvik eden anne ve babama, ablalarım, tez çalışmam boyunca her aşamada yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli arkadaşlarım Ecz. Nuri ÖZMEN ve Dr. Öğr. Üyesi Aysel PEHLİVANLI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

4-HHE	4-Hidroksihekzenal
4-HNE	4-Hidroksinonenal
ACSF2	Acyl-CoA Synthetase Family Member 2
AKT	Protein Kinase B
ALOX15	Arachidonate 15-Lipoxygenase
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCR-ABL	Breakpoint cluster region-Abelson tyrosine-protein kinase
BRCA1	Breast Cancer gene 1
BRCA2	Breast Cancer gene 2
CAT	Katalaz
CIS	Sisplatin
c-MYC	Cellular-Myelocytomatosis
COX	Cyclooxygenase
DMT1	Divalent metal transporter1
DOC	Dosetaksel
ERA	Erastin
ETO	Etopozid
FER-1	Ferrostatin-1
FPN1	Ferroportin1
GPX	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HR	Hormon Reseptörü
IREB2	Iron Responsive Element Binding Protein 2
LOX	Lipooxygenase
MDA	Malondialdehyde
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NRF2	Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase

PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid
RAS	Rat Sarcoma
ROS	Reactive Oxygen Species
RSL3	Ras Selective Lethal 3
SLC3A2	Solute Carrier Family 3 Member 2
SLC7A11	Solute Carrier Family 7 Member 11
SOD	Süperoksit Dismutaz
STEAP3	Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate 3
TFR	Transferrin
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
TP53	Tumor Suppressor Gene 53
XCT	Cystine/Glutamate Antiporter

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Hücrel antioksidan sistem	6
Şekil 1.2.	Ferroptoz mekanizması	10
Şekil 1.3.	Ferroptozda görülen demir bağımlı lipid peroksidasyonu	12
Şekil 3.1.	Sisplatinin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat)	21
Şekil 3.2.	Sisplatinin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat)	21
Şekil 3.3.	Sisplatinin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat)	22
Şekil 3.4.	Sisplatinin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat)	22
Şekil 3.5.	Sisplatinin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat)	23
Şekil 3.6.	Sisplatin'in MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat)	23
Şekil 3.7.	Dosetaksel'in MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat)	24
Şekil 3.8.	Dosetaksel'in MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat)	24
Şekil 3.9.	Dosetaksel'in MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat)	25
Şekil 3.10.	Dosetaksel'in MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat)	25
Şekil 3.11.	Dosetaksel'in MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat)	26
Şekil 3.12.	Dosetaksel'in MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat)	26
Şekil 3.13.	Etopozidin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat)	27
Şekil 3.14.	Etopozidin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat)	28
Şekil 3.15.	Etopozidin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat)	28

Şekil 3.16.	Etopozidin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saatt)	29
Şekil 3.17.	Etopozidin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saatt)	29
Şekil 3.18.	Etopozidin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saatt)	30
Şekil 3.19.	Erastinin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saatt)	31
Şekil 3.20.	Erastinin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saatt)	31
Şekil 3.21.	Erastinin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saatt)	32
Şekil 3.22.	Erastinin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saatt)	32
Şekil 3.23.	Erastinin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saatt)	33
Şekil 3.24.	Erastinin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saatt)	33
Şekil 3.25.	Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saatt)	34
Şekil 3.26.	Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saatt)	35
Şekil 3.27.	Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saatt)	36
Şekil 3.28.	Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saatt)	37
Şekil 3.29.	Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saatt)	38
Şekil 3.30.	Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saatt)	38
Şekil 3.31.	Etopozid ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saatt)	40
Şekil 3.32.	Etopozid ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saatt)	40
Şekil 3.33.	Etopozid ve erastin kombinasyonunun MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saatt)	41

Şekil 3.34.	Sisplatin ve erastin uygulamalarının MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri üzerindeki etkisinin karşılaştırılması	43
Şekil 3.35.	Dosetaksel ve erastin uygulamalarının MCF-7 ve MCF-10A hücreleri üzerindeki etkisinin karşılaştırılması	43
Şekil 3.36.	Dosetaksel ve erastin uygulamalarının MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri üzerindeki etkisinin karşılaştırılması	43
Şekil 3.37.	Etopozid ve erastin uygulamalarının MCF-7 ve MCF-10A hücreleri üzerindeki etkisinin karşılaştırılması	44
Şekil 3.38.	MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen ROS düzeylerinin gösterimi	45
Şekil 3.39.	MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen ROS düzeylerinin grafiksel gösterimi	45
Şekil 3.40.	MCF-7 hücrelerinde tespit edilen ROS düzeylerinin gösterimi	47
Şekil 3.41.	MCF-7 hücrelerinde tespit edilen ROS düzeylerinin grafiksel gösterimi	47
Şekil 3.42.	MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen ROS düzeylerinin gösterimi	48
Şekil 3.43.	MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen ROS düzeylerinin grafiksel gösterimi	48
Şekil 3.44.	MCF-7 hücrelerinde tespit edilen ROS düzeylerinin gösterimi	49
Şekil 3.45.	MCF-7 hücrelerinde tespit edilen ROS düzeylerinin gösterimi	50
Şekil 3.46.	MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen mitokondriyel membran potansiyeli ölçüm plotları	51
Şekil 3.47.	MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen depolarize-canlı hücre popülasyonunun grafiksel gösterimi	51
Şekil 3.48.	MCF-7 hücrelerinde tespit edilen mitokondriyel membran potansiyeli ölçüm plotları	53
Şekil 3.49.	MCF-7 hücrelerinde tespit edilen depolarize-canlı hücre popülasyonunun grafiksel gösterimi	53
Şekil 3.50.	MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen mitokondriyel membran potansiyeli ölçüm plotları	54

Şekil 3.51.	MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen depolarize-canlı hücre popülasyonunun grafiksel gösterimi	54
Şekil 3.52.	MCF-7 hücrelerinde tespit edilen mitokondriyel membran potansiyeli ölçüm plotları	56
Şekil 3.53.	MCF-7 hücrelerinde tespit edilen depolarize-canlı hücre popülasyonunun grafiksel gösterimi	56
Şekil 3.54.	Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde GPX aktivitesi üzerindeki etkisi	58
Şekil 3.55.	Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinde GPX aktivitesi üzerindeki etkisi	59
Şekil 3.56.	Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde GPX aktivitesi üzerindeki etkisi	60
Şekil 3.57.	Etopozid ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinde GPX aktivitesi üzerindeki etkisi	61
Şekil 3.58.	Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde GSH düzeyleri üzerindeki etkisi	62
Şekil 3.59.	Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinde GSH düzeyleri üzerindeki etkisi	64
Şekil 3.60.	Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde GSH düzeyleri üzerindeki etkisi	64
Şekil 3.61.	Etopozid ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinde GSH düzeyleri üzerindeki etkisi	65
Şekil 3.62.	Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde MDA düzeyleri üzerindeki etkisi	66
Şekil 3.63.	Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinde MDA düzeyleri üzerindeki etkisi	68
Şekil 3.64.	Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde MDA düzeyleri üzerindeki etkisi	68
Şekil 3.65.	Etopozid ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinde MDA düzeyleri üzerindeki etkisi	69
Şekil 3.66.	MDA-MB-231 hücrelerinde sisplatin ve erastin kombinasyonunun ferroptotik proteinler üzerindeki etkisi	71

Şekil 3.67.	MCF-7 hücrelerinde dosetaksel ve erastin kombinasyonunun ferroptotik proteinler üzerindeki etkisi	72
Şekil 3.68.	MDA-MB-231 hücrelerinde dosetaksel ve erastin kombinasyonunun ferroptotik proteinler üzerindeki etkisi	72
Şekil 3.69.	MCF-7 hücrelerinde etopozid ve erastin kombinasyonunun ferroptotik proteinler üzerindeki etkisi	73



ÇİZELGELER

Çizelge 3.1.	Sisplatinin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%)	20
Çizelge 3.2.	Sisplatinin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%)	21
Çizelge 3.3.	Sisplatinin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%)	22
Çizelge 3.4.	Dosetakselin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%)	24
Çizelge 3.5.	Dosetakselin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%)	25
Çizelge 3.6.	Dosetakselin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%)	26
Çizelge 3.7.	Etopozidin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%)	27
Çizelge 3.8.	Etopozidin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%)	28
Çizelge 3.9.	Etopozidin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%)	29
Çizelge 3.10.	Erastinin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%)	30
Çizelge 3.11.	Erastinin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%)	31
Çizelge 3.12.	Erastinin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%)	32
Çizelge 3.13.	Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI)	34
Çizelge 3.14.	Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI)	35
Çizelge 3.15.	Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI)	35
Çizelge 3.16.	Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI)	37

Çizelge 3.17.	Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI)	37
Çizelge 3.18.	Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI)	38
Çizelge 3.19.	Etopozid ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI)	39
Çizelge 3.20.	Etopozid ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI)	40
Çizelge 3.21.	Etopozid ve erastin kombinasyonunun MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI)	41
Çizelge 3.22.	Sisplatin ve erastinin uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen GPX aktivite düzeyleri (%)	57
Çizelge 3.23.	Dosetaksel ve erastinin uygulandığı MCF-7 hücrelerinden elde edilen GPX aktivite düzeyleri (%)	59
Çizelge 3.24.	Dosetaksel ve erastinin uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen GPX aktivite düzeyleri (%)	60
Çizelge 3.25.	Etopozid ve erastinin uygulandığı MCF-7 hücrelerinden elde edilen GPX aktivite düzeyleri (%)	61
Çizelge 3.26.	Sisplatin ve erastinin uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen GSH düzeyleri (%)	62
Çizelge 3.27.	Dosetaksel ve erastinin uygulandığı MCF-7 hücrelerinden elde edilen GSH düzeyleri (%)	63
Çizelge 3.28.	Dosetaksel ve erastinin uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen GSH düzeyleri (%)	64
Çizelge 3.29.	Etopozid ve erastinin uygulandığı MCF-7 hücrelerinden elde edilen GSH düzeyleri (%)	65

Çizelge 3.30.	MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen MDA düzeyleri (%)	66
Çizelge 3.31.	Dosetaksel ve erastinin uygulandığı MCF-7 hücrelerinden elde edilen MDA düzeyleri (%)	67
Çizelge 3.32.	Dosetaksel ve erastinin uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen MDA düzeyleri (%)	68
Çizelge 3.33.	MCF-7 hücrelerinden elde edilen MDA düzeyleri (%)	69



1. GİRİŞ

1.1.Meme Kanseri

1.1.1.Meme Kanseri İnsidansı ve Risk Faktörleri

Meme kanseri 2020 yılı verilerine göre dünyada en yaygın görülen kanser türü olup, kadınlarda görülen kanser-ilişkili ölümler arasında ilk sırada yer almaktadır. Yalnızca 2020 yılında meme kanseri teşhisi konulan hasta sayısı 2,3 milyon (%11,7) olarak tespit edilmiştir (Sung ve ark., 2021). Ülkemizde de kadınlar arasında en sık görülen kanserlerin %23,9'unu meme kanseri oluşturmaktadır (Globocan, 2020). Bu oran kanser teşhisi alan her 4 kadından 1'inin meme kanseri olduğunu göstermektedir. Yaygın görülmesi sebebiyle bu tür kanserler üzerinde yapılan araştırmalar her geçen yıl önem kazanmaktadır.

Meme kanserinin morfolojik ve moleküler olarak birbirinden farklı alt türleri bulunmaktadır. Bunlardan en yaygın görülen alt türü hormon reseptörü (HR)-pozitif, insan epidermal faktör reseptörü (HER2)-negatif olan, luminal A olarak kategorilendirilen türdür (Henry ve ark., 2020). Hastaların yaklaşık %71'inde HR-pozitif meme kanseri görülmektedir (Giaquinto ve ark., 2022). Bu tür kanserde 5 yıllık sağ kalım oranı, perifer organlarda metastaz olmaması durumunda %92,5 iken, metastaz olması durumunda %35,9 olarak ifade edilmektedir (Howlader, ve ark., 2018). İkinci sırada ise oldukça agresif ve metastatik olması ile bilinen, HR ve HER2 reseptörlerini taşımayan üçlü negatif meme kanseri (TNBC) yer almaktadır. Bu grup, meme kanseri hastalarının yaklaşık %10-15'ini oluşturmaktadır. Genellikle 40 yaş altında daha sık görülmektedir ve metastaz durumunda ortalama hayatta kalma süresi 1 yıldan az olmaktadır (Kumar ve Aggarwal, 2016). İstatistiklere göre 5 yıllık sağ kalım oranı periferde metastazın görülmediği durumlarda %65,8, ancak metastazın görüldüğü vakalarda yalnızca %11,0'dır (Almansour, 2022). Bununla birlikte, siyah ırkta üçlü negatif meme kanseri görülme oranı beyaz ırktan iki kat daha fazladır (Giaquinto ve ark., 2022). Genel olarak beyaz ırkta HR-pozitif meme kanseri daha

yaygın görülürken, siyah ırkta ise üçlü negatif meme kanseri daha sık görülmektedir (Giaquinto ve ark., 2022).

Meme kanserine yol açan çeşitli risk faktörleri bulunmaktadır. Dengesiz beslenme, alkol tüketimi, obezite, erken yaşta radyasyona maruz kalma, oral kontraseptif kullanımı ve aile öyküsü gibi faktörlerin meme kanserine sebep olduğu literatürde tartışılmaktadır (Henry ve ark., 2020). Ayrıca genetik mutasyonların da önemli bir risk faktörü olduğu bildirilmektedir. Özellikle BRCA1, BRCA2 gen mutasyonları ile TP53, PTEN gibi tümör baskılayıcı genlerde görülen mutasyonların meme kanserine neden olduğu bilinmektedir (Mahdavi ve ark., 2019).

Klinikte meme kanserine yönelik çeşitli tedavi seçenekleri bulunmaktadır. Yaygın olarak cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi gibi yöntemler uygulanmaktadır. Kanserli hücrelerde hormon reseptörünün pozitif olması durumunda endokrin tedavi ilk seçenek olmaktadır (Rugo ve ark., 2016). Endokrin tedaviye yanıt vermeyen ve/veya üçlü negatif kanser türlerinde ise çeşitli kemoterapötik ajanlar kullanılmaktadır (Kumar ve Aggarwal, 2016). Tedavide en sık rastlanılan problemler; sağlıklı dokuların hasar görmesi nedeniyle nörotoksisite, nefrotoksisite, hepatotoksisite gibi ciddi yan etkilerin oluşması, kemoterapötiklere karşı direnç gelişimi ve tedavi sonrasında hastalığın nüks etmesidir (Henry ve ark., 2020; Kumar ve Aggarwal, 2016). Bu nedenle mevcut tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve yeni tedavi yaklaşımlarının araştırılması önem arz etmektedir.

1.1.2. Meme Kanserinde Kullanılan Kemoterapötikler

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar genel olarak; antimetabolitler, alkilleyici ajanlar, mikrotübül inhibitörleri, monoklonal antikolar ve diğerleri şeklinde sınıflandırılmaktadır. Klinikte genellikle farklı ilaç sınıflarından seçilen birden fazla ajanın kombinasyon halinde uygulanması tercih edilmektedir. Böylece daha etkin bir tedavi elde etmek ve hastalığın tekrarını engellemek hedeflenmektedir (Henry ve ark., 2020).

Meme kanseri teşhisi alan hastaların profiline ve tümörlü dokunun durumuna göre uygun ilaç seçiminde moleküler ve histolojik özellikler dikkate alınmaktadır. Düşük riskli hastalarda mikrotübül inhibitörleri olan taksanlar (dosetaksel, paklitaksel) ile alkilleyici ajanlardan siklofosamid kombinasyonu tercih edilmektedir (Wardley, 2007). Kemoterapiye yanıt veren HR-negatif hastalarda antrasiklin (doksorubisin) ve taksan kombinasyonu daha etkin olmaktadır, ancak bu uygulamada daha fazla toksisite görülmektedir (Martin ve ark., 2005). Üçlü negatif kanserlerde ise endokrin tedavi veya anti-HER2 ajanlar etki etmemektedir. Hastalığın tekrar etme riski yüksek olduğundan daha etkin sonuç elde edebilmek için farklı kombinasyonlar uygulanmaktadır. Özellikle alkilleyici ajanlardan platin türevleri (sisplatin, karboplatin) bu noktada öne çıkmaktadır. Örneğin taksan ve siklofosamid kombinasyonuna platin türevleri ilave edildiğinde tedaviye %13 oranında katkı sağladığı gözlenmiştir (Sikov ve ark., 2015). Bu tez çalışması kapsamında, yaygın olarak kullanılan kemoterapötiklerden sisplatin, dosetaksel ve etopozid ele alınmıştır.

Sisplatin (Cis), platin türevi kemoterapötiklerden ilk sentezlenen bileşiktir. 1960'lı yıllardan bu yana sitotoksik etkisi bilinmekte ve baş-boyun kanserleri, akciğer, meme kanseri, lenfoma gibi çeşitli kanser türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ghosh, 2019). Temel etki mekanizması, DNA üzerindeki pürin bazlarına bağlanması ve DNA hasarına yol açarak hücreyi apoptotik ölüme götürmesidir (Dasari ve Bernard Tchounwou, 2014). Ancak sisplatinin nefrotoksisite, hepatotoksisite, gastrointestinal sistem bozuklukları, allerjik reaksiyonlar gibi istenmeyen birtakım yan etkileri bulunmaktadır. Bunun yanı sıra, sisplatine karşı sıklıkla direnç oluşumu gözlenmektedir. Bu nedenle kanser tedavisinde genellikle sisplatinin bir başka antikanser ajanla kombinasyonu tercih edilmektedir (Ghosh, 2019).

Etopozid (Eto) bitki kökenli bir bileşik olup çeşitli kanser türlerine karşı antitümör etki göstermektedir (Meresse ve ark., 2004). Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, akut myeloid lösemi ve meme kanserlerine karşı klinikte kullanımı bulunmaktadır (Meresse ve ark., 2004). Etopozidin etki mekanizması temel olarak DNA replikasyonunda görevli olan topoizomera II enzimini inhibe ederek hücre

döngüsünü bozması ve hücreyi apoptoza götürmesidir (Baldwin ve Osheroff, 2005). Ayrıca, etopozidin çeşitli dokularda ROS miktarını arttırdığı ve oksidatif strese yol açtığı da bilinmektedir (Shin ve ark., 2016). Kanser tedavisinde etopozidin etkili olduğu bilinmekle beraber, kanser hücreleri genellikle topoizomera II enziminin duyarlılığını azaltarak ve/veya apoptotik yolları devre dışı bırakarak etopozide karşı direnç kazanabilmektedir. Bu durum tedavinin başarısız olmasına neden olmaktadır (Alpsoy ve ark., 2014). Bununla birlikte, etopozidin birtakım yan etkileri de bulunmaktadır. Nefrotoksisite, kardiyotoksisite ve nörotoksisite rapor edilen bazı yan etkilerdendir (Nemade ve ark., 2018; Zhao ve ark., 2021).

Dosetaksel (Doc), mikrotübül inhibitörleri sınıfında yer alan taksan türevi bileşiklerdendir. Antikanser etkisini, β -tübüline bağlanıp hücre döngüsünü G2 fazında durdurarak göstermektedir (Nishiyama ve Wada, 2009). Ayrıca anti-apoptotik etkili Bcl-2 genini inhibe etmekte ve p27 gen ekspresyonunu stimüle etmektedir (Cao ve ark., 2008; Nishiyama ve Wada, 2009). Özellikle 1990'lı yıllardan itibaren meme kanseri tedavisinde tercih edilen kemoterapötiklerin arasında yer almaktadır (Bachegowda ve ark., 2014). Kombinasyon tedavilerine ilave edilmesiyle birlikte metastatik meme kanserinde dahi etkin sonuçlar alınabilmektedir (Karki ve ark., 2014; Radaideh ve Sledge, 2008). Dosetakselin en sık rastlanılan yan etkileri arasında anemi, nötropeni, trombositopeni, dispne, konstipasyon, alopesi ve enfeksiyonlar yer almaktadır. Özellikle kemik iliği supresyonu dosetakselin en önemli doz-sınırlayıcı yan etkisidir (Nishiyama ve Wada, 2009). Bununla birlikte dosetaksele karşı direnç gelişimi de sıklıkla gözlenmektedir. Yapılan bir çalışmada dosetaksele dirençli meme kanseri hücrelerinde antioksidan enzimlere ait gen ekspresyonlarının arttığı belirtilmiştir (Pennington ve ark., 2005).

Meme kanserinde etkin bir tedavi yaklaşımı geliştirebilmek için çeşitli hücresel mekanizmaların ve kanser oluşumundaki rollerinin incelenmesi gerekmektedir. Bu mekanizmalardan hücresel antioksidan sistem hem kanser oluşumunu önleyici hem de kanser oluşumuna katkı sağlayıcı özellikleri olması bakımından önem arz etmektedir.

1.2. Hücresel Antioksidan Sistem

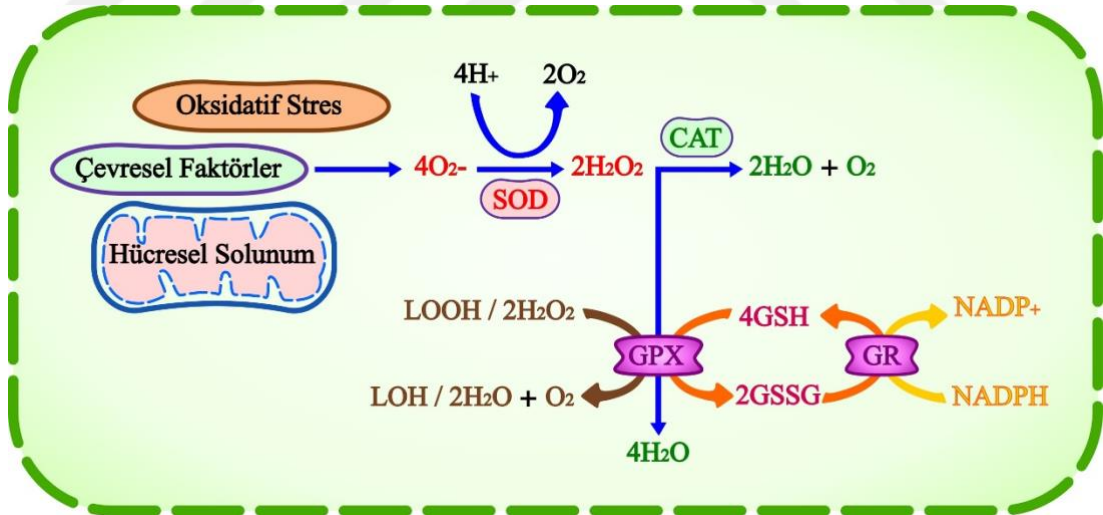
Hücrede çeşitli metabolik olaylar sonucunda serbest radikal olarak tanımlanan, ortaklanmamış elektron taşıyan moleküller oluşmaktadır. Mitokondride elektron transport sistemi, Krebs döngüsü, oksidaz enzim aktiviteleri (NADPH oksidaz, ksantin oksidaz gibi) ve immun sistem hücreleri tarafından salınan serbest radikallerden en yaygın görülenleri arasında reaktif oksijen türleri (ROS) yer almaktadır (Ortega ve ark., 2011). Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi moleküller ROS olarak ifade edilmektedir (Görlach ve ark., 2015). Bu moleküller karbonhidrat, lipid, protein ve nükleik asit gibi organik hücresel yapıları hasara uğratarak ölüme yol açabildiği gibi, gen ekspresyon düzeylerini etkileyerek hücre büyüme ve çoğalmasını da tetikleyebilmektedir. Bu durumu önlemek amacıyla hücrede antioksidan sistem olarak adlandırılan bir savunma mekanizması yer almaktadır. Antioksidan sistem elemanları serbest radikalleri yakalayarak bu moleküllerin inaktif duruma gelmelerini sağlamaktadırlar (Ortega ve ark., 2011) (Şekil 1.1).

Hücrede ROS düzeylerinin antioksidan savunma kapasitesini aşması durumu oksidatif stres olarak ifade edilmektedir (Pennington ve ark., 2005). Oksidatif strese karşı korunmak için hücrede süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon transferaz, C ve E vitaminleri gibi antioksidan elemanlar yer almaktadır. Süperoksit anyonunun yarılanma ömrü oldukça kısadır ve sitoplazmadaki SOD enzimi tarafından hızlıca H_2O_2 'ye dönüştürülmektedir. Yarılanma ömrü süperoksit anyonuna kıyasla daha uzun olan H_2O_2 ferröz demir ile fenton reaksiyonuna girerek oldukça reaktif ve toksik olan hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) oluşturmaktadır (Davies, 2016; Hauck ve Bernlohr, 2016). Hidroksil radikali hücresel yapılara geri dönüşümsüz zarar verdiğiinden bu molekülün antioksidan savunma sistemi tarafından inaktif hale getirilmesi gerekmektedir. H_2O_2 hücrede bulunan katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile nötralize edilerek su ve oksijene dönüşmekte ve böylece, hücresel yapılar korunmaktadır (Şekil 1.1) (Kennedy ve ark., 2020). Ayrıca, oksidasyona uğrayan lipid yapılı moleküller de glutatyon peroksidaz tarafından inaktif hale getirilerek lipid alkollerine dönüştürülmektedir

(Hauck ve Bernlohr, 2016). Tüketilen glutatyon peroksidazın rejenerasyonu glutatyon tarafından sağlanırken, glutatyonun rejenerasyonu da glutatyon redüktaz tarafından sağlanmaktadır (Şekil 1.1). Glutatyon redüktazın koenzim olarak ihtiyaç duyduğu NADPH ise pentoz fosfat yolağı ve çeşitli enzimatik olaylar sonucunda üretilmektedir (Kennedy ve ark., 2020).

1.2.1.Oksidatif Stres ve Kanseri İlişkisi

Antioksidan savunmada görevli elemanların inaktivasyonu veya gen ekspresyonlarının baskılanması, hücrede oksidatif stres artışına yol açarak otoimmün hastalıklar, nörodejenerasyon, kronik inflammasyon ve kanser gibi çeşitli patolojilere sebep olmaktadır (Federico ve ark., 2007; Ortega ve ark., 2011). Elimine edilemeyen ROS molekülleri DNA zincirinde kırıklara ve nokta mutasyonlarına yol açabildiği gibi, DNA metiltransferaz enzim ekspresyonunu da arttırarak hipermetilasyona sebep olabilmektedirler (Reuter ve ark., 2010).



Şekil 1.1. Hücresel antioksidan sistem.

Kanser gelişiminde oksidatif stresin çift yönlü rolünün olduğu bildirilmektedir (Ortega ve ark., 2011). Genellikle kanser hücreleri sağlıklı hücrelere oranla daha yüksek düzeyde ROS üretmektedir. Bu sayede hücre büyüme ve çoğalması ile metastaz tetiklenmektedir. ROS miktarı tümörde görülen hipoksik koşullar nedeniyle

artabildiği gibi, onkogenler tarafından da arttırılabilmektedir (Kennedy ve ark., 2020). Örneğin, mutant onkogenlerden Ras, Bcr-Abl ve c-Myc genlerinin kanser hücrelerinde ROS düzeylerini arttırdığı belirtilmektedir (Kumari ve ark., 2018). Sharma ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, mitokondride yer alan elektron transport zincirinde görevli kompleks 1'in mutasyona uğramasıyla ROS düzeylerinin arttığı, buna bağlı olarak apoptoza karşı direnç geliştiği ve hücre çoğalmasında görevli PI3K/Akt sinyal yolağının indüklendiği tespit edilmiştir (Sharma ve ark., 2011).

Oksidatif stresin belirli düzeylerde kanser oluşumunu destekliyor olmasına karşın, aşırı yüksek düzeylere ulaşması hücre ölümünü indükleyebilmektedir. Artan ROS molekülleri mitokondri membran geçirgenliğini arttırmakta ve sitokrom C gibi moleküllerin sitoplazmaya dağılmasına yol açarak apoptotik hücre ölümünü tetiklemektedir (Gogvadze ve ark., 2006). Literatürde GSH eksikliği veya oksidatif stres artışının kanser hücrelerini kemoterapiye karşı daha hassas hale getirdiği bildirilmektedir (Estrela ve ark., 2006). Benzer şekilde GPX4 inhibisyonunun glioblastoma, pankreas, kolorektal, ve meme kanseri gibi kanser türlerinde hücre ölümünü indüklediği rapor edilmiştir (Bao ve ark., 2022; Gao ve ark., 2020; Yu ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2022). Bu veriler ışığında hücrel antioksidan sistemin baskılanması veya oksidatif stres artışı, apoptoz dışındaki hücre ölüm mekanizmalarını da tetiklemesi sebebiyle kanser tedavisinde ümit vadeden bir yaklaşım olarak ele alınmaktadır. Bu mekanizmalardan yakın zamanda tanımlanmış olan ferroptotik hücre ölümü, oksidatif strese bağımlı olması nedeniyle ön plana çıkmaktadır.

1.3. Ferroptoz

1.3.1.Ferroptozun Tanımı

Klinikte kullanılan kemoterapötikler genellikle apoptotik mekanizmaları aktive ederek kanserli hücrelerin ölmesini sağlamak üzere tasarlanmıştır. Ancak hücreler sıklıkla apoptotik hücre ölümüne karşı direnç geliştirmekte ve tedavinin yetersiz olmasına sebep olmaktadır (Mohammad ve ark., 2015). Bu nedenle son

yıllarda yapılan araştırmalar apoptoz dışındaki hücre ölümlerini ele alarak alternatif mekanizmaların indüklenmesi yoluyla ilaç direncini kırmayı hedeflemektedir. Bu bağlamda, yakın zamanda tanımlanmış bir hücre ölüm mekanizması olan ferroptoz ön plana çıkmaktadır.

Ferroptoz, demir bağımlı lipid peroksidasyonu ve artmış oksidatif stres ile karakterize, kontrollü bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Bilinen diğeri hücre ölüm mekanizmaları olan apoptoz, otofaji ve klasik nekrozdan biyokimyasal ve genetik olarak farklı olduğu bilinmektedir (Dixon ve ark., 2012). İlk olarak 2012 yılında, Dixon ve arkadaşları tarafından erastin bileşiğinin fibrosarkoma hücrelerindeki etkisinin araştırılması sırasında keşfedilmiştir. Yapılan bu çalışmada, erastinin hücre içi glutatyon sentezinde anahtar rol oynayan bir transport sistemini, sistin/glutamat (xCT) antiportunu, inhibe ettiği gözlenmiştir (Dixon ve ark., 2012; Yagoda ve ark., 2007). Daha sonra yapılan detaylı araştırmalar ile erastinin ve birçok antikanser bileşiğinin farklı tip hücrelerde ferroptotik hücre ölümünü tetiklediği tespit edilmiştir (Eling ve ark., 2015; Li ve ark., 2019).

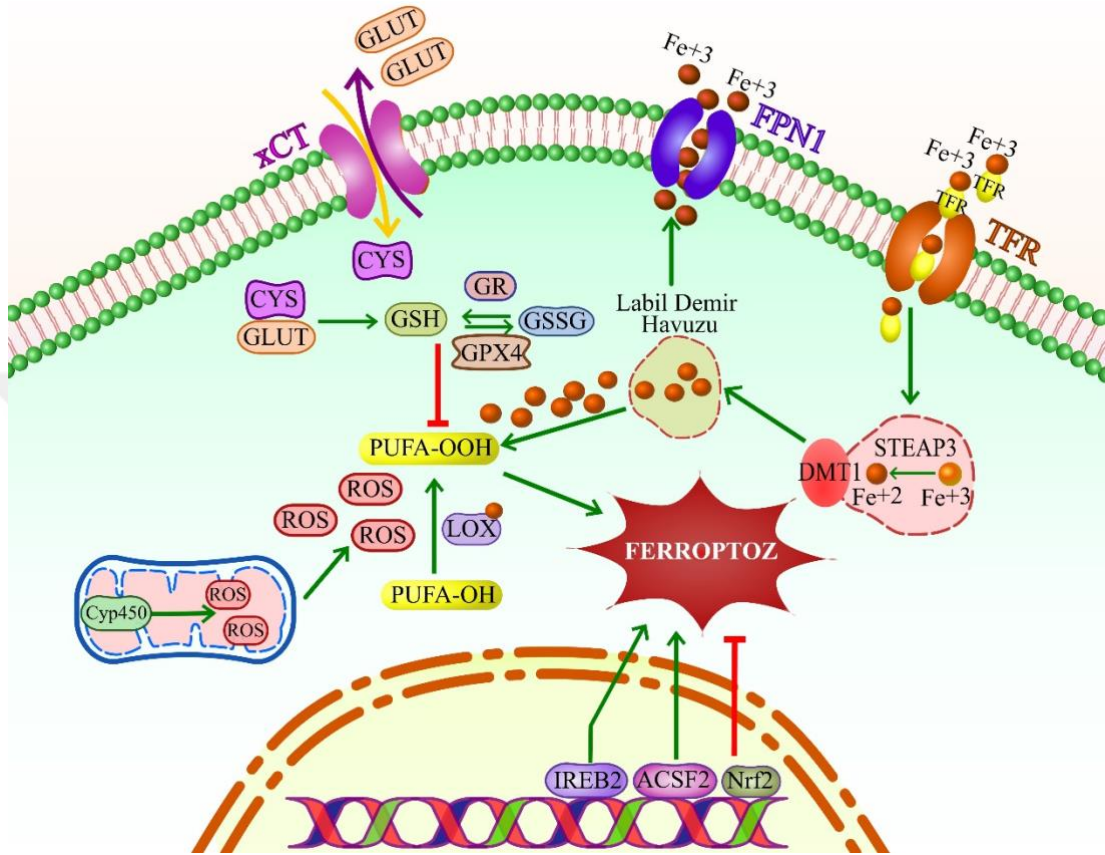
1.3.2.Ferroptoz Mekanizması ve Kanser ile İlişkisi

Hücre içinde çeşitli biyokimyasal olaylar sonucunda oluşan reaktif oksijen türleri elimine edilmediği takdirde önemli hücresel yapıları oksidasyona uğratarak fonksiyon bozukluklarına ve/veya ölüme neden olmaktadır (Dixon ve Stockwell, 2014; Görlach ve ark., 2015). Bunun engellenmesi için ROS türevleri hücrede bulunan antioksidan etkili glutatyon tarafından non-toksik formlara dönüştürölmektedir. Böylece membran lipidleri ve diğeri moleküllerin oksidasyona uğraması engellenmektedir. Bu nedenle glutatyon varlığı hücre yaşamının devamı için büyük önem taşımaktadır (Ortega ve ark., 2011). Hücreler glutatyonu sentezleyebilmek için bazı aminoasitlerin varlığına ihtiyaç duymaktadırlar. Bunlardan biri olan sistin aminoasiti, hücre içinde yeterli düzeyde bulunmadığından, hücre dışından da sistin alınması gerekmektedir. Bu transportu, xCT sistemi sağlamaktadır. xCT sistemi iki transmembran proteinden oluşmaktadır: SLC7A11 ve SLC3A2 (Sato ve ark., 1999). Yapılan deneylerle elde edilen veriler ferroptoz indükleyicisi erastinin SLC7A11'i

direkt olarak inhibe ettiğini ve bunun sonucunda glutatyon üretiminin azalmasına bağlı olarak hücrenin ferroptozu gittiğini göstermektedir (Dixon ve ark., 2014). Glutatyon eksikliğinde artış gösteren ROS molekülleri, lipid yapılı bileşikler oksidasyona uğratarak lipid peroksitlerini oluşturmaktadır. Biriken lipid peroksitleri, ileride daha detaylı anlatılacağı üzere ortamda varsa demir (Fe^{+2}) ile fenton reaksiyonuna girerek daha tehlikeli serbest radikal türevleri oluşturmakta ve böylece hücrenin ferroptotik ölüme gitmesine neden olmaktadır (Feng ve Stockwell, 2018; Gaschler ve ark., 2018) (Şekil 1.2). Ayrıca tümör baskılayıcı gen olan p53'ün de SLC7A11 ekspresyonunu baskılayarak ferroptozu indüklediği yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Jiang ve ark., 2015).

Kanser hücreleri sağlıklı hücelere oranla oldukça fazla miktarda demir tüketmektedir. Bu yüksek miktar demiri sağlayabilmek için tümör hücreleri, hücre içine demir taşınmasını sağlayan transferrin reseptör (TfR) düzeylerini arttırırken, hücre dışına demir taşınmasını sağlayan ferroportin1 (FPN1) reseptör ekspresyonunu ise azaltmaktadırlar (18) (Torti ve Torti, 2013). Transferrin ile hücre içine taşınan demir nontoksik olan ferrik demir (Fe^{+3}) formundadır. Hücrede bulunan STEAP3 enzimi tarafından ferröz demire (Fe^{+2}) dönüştürüldükten sonra DMT1 aracılığı ile labil demir havuzuna gönderilmekte ve hücre içi olaylarda ihtiyaç duyulana kadar burada bekletilmektedir (Şekil 1.2). İhtiyaç fazlası olan demir ise tekrar okside olarak Fe^{+3} formunda ferritinde depo edilmekte veya ferroportin1 (FPN1)'den hücre dışına atılmaktadır (Battaglia ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2012). Kanser hücrelerinde demir düzeylerinin artış göstermesinden hareketle organizmanın, bu yüksek orandaki demiri kullanarak bir çeşit adaptif hücre ölümü geliştirdiği ve böylece ferroptozu kansere karşı bir savunma mekanizması olarak kullandığı düşünülmektedir (Dixon, 2017). Ferroptoz regülasyonunda rol oynadığı gösterilen bir diğer protein ise hücre içi demir düzeylerine yanıt olarak aktif veya inaktif olan IREB2 (Iron responsive element binding protein) molekülüdür. Bu protein hücre içi demir düzeyleri düşük olduğunda aktifleşerek demir metabolizmasında rol alan mRNA'ların translasyonunu regüle etmekte ve sonuçta demir miktarını arttırmaktadır (Muckenthaler ve ark., 2008) (Şekil 1.2). Dixon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IREB2 proteininin erastin ile

indüklenen ferroptozda tetikleyici bir rol aldığı belirtilmiştir. IREB2 geni baskılandığında ise ferroptozun engellendiği gösterilmiştir (Dixon ve ark., 2012).



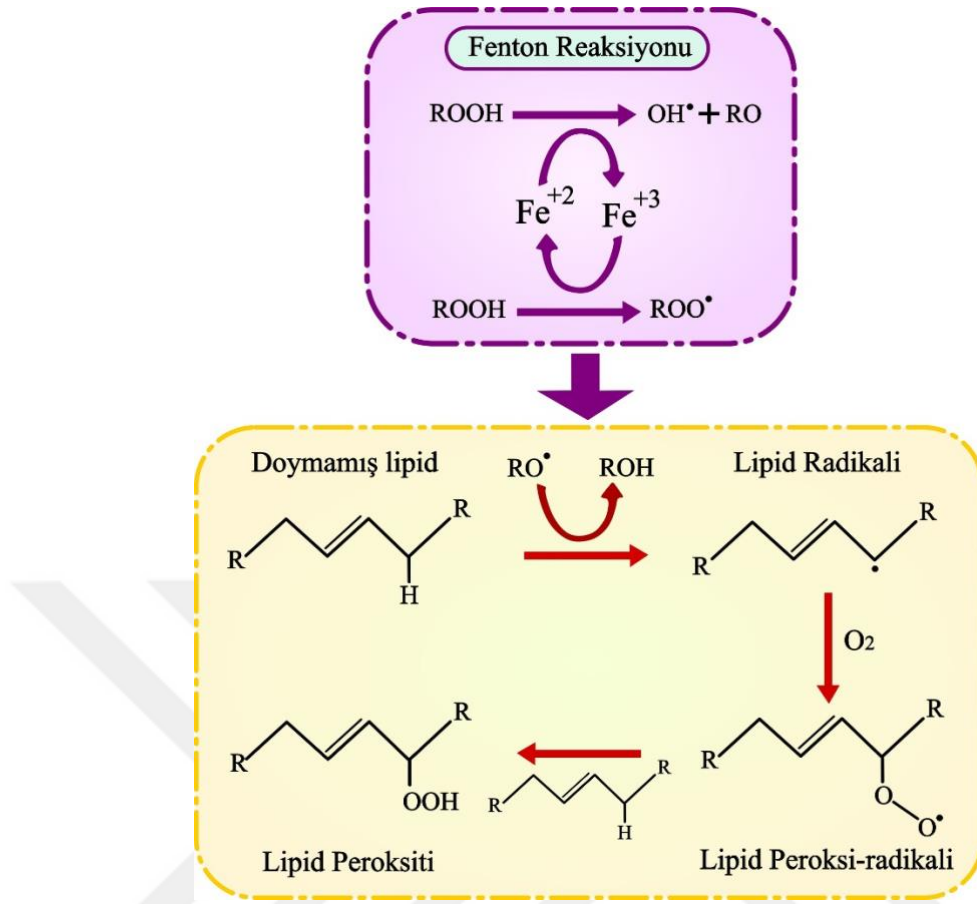
Şekil 1.2. Ferroptoz mekanizması.

Literatürde yer alan birçok çalışma ile hücrede gerçekleşen ölümün spesifik olarak ferroptoz kaynaklı olduğunu gösteren bazı özellikler tanımlanmıştır. Bu özellikler; mitokondri büzüşmesi, mitokondri dış membranının yoğunlaşması, hücre içinde ROS, lipid peroksitleri ve demir düzeylerinin artışı, redükte glutatyonu okside eden enzimlerden özellikle glutatyon peroksidaz-4 eksikliği, xCT sisteminin inhibisyonu ve IREB2, ACSF2 gibi bazı genlerin transkripsiyon düzeylerindeki belirli değişikliklerdir (Dixon ve ark., 2012). Ferroptoz sırasında apoptozda oluşan kromatin yoğunlaşması, PARP kısalması, kaspaz aktivasyonu gibi olaylar gözlenmemektedir (Dolma ve ark., 2003; Yang ve Stockwell, 2008). Ayrıca mitokondriyal ROS oluşumu ya da kalsiyum varlığı da ferroptoz için şart değildir (Dixon ve ark., 2012). Bu tür hücre ölümü, demir şelatörleri (deferoksamin) ve E vitamini gibi antioksidanlarla ya

da sentetik bir inhibitör olan ferrostatin-1 (Fer-1) ile inhibe edilebildiği gibi Nrf2 gibi hücrel transkripsiyon faktörleri ile de inhibe edilebilmektedir (Cao ve Dixon, 2016; Fan ve ark., 2017).

xCT sistem inhibisyonu veya GPX4 inaktivasyonu ile tetiklenen ferroptotik hücre ölümünde lipid peroksidasyonunda artış görülmektedir. Hücre membranının da yapısını oluşturan çoklu doymamış yağ asitleri içeren lipid yapılı moleküller (PUFA) hem enzimatik hem de non-enzimatik oksidasyona oldukça açıktır (Feng ve Stockwell, 2018). Ferroptozda görülen lipid peroksidasyonu demir bağımlı olup, non-enzimatik olarak şu şekilde gerçekleşmektedir: Hücrede bulunan ferröz demir ile doymamış lipid yapılı moleküller fenton reaksiyonuna girerek lipid radikallerini oluşturmaktadırlar. Lipid radikalleri, diğer doymamış lipid moleküllerinden birer hidrojen kopararak yeni lipid radikallerinin oluşmasına yol açmaktadırlar. Biriken bu moleküller oksijenasyona uğrayarak önce lipid peroksi-radikallerine, daha sonra ise bir başka doymamış lipid molekülünden tekrar hidrojen koparmak suretiyle lipid peroksitlerine dönüşmektedirler (Gaschler ve Stockwell, 2017) (Şekil 1.3). Bu nedenle ferroptotik ölümde plazma membran permeabilitesinin geri dönüşümsüz olarak bozulduğu düşünülmektedir (Skouta ve ark., 2014).

Lipidlerin enzimatik oksidasyonunda ise siklooksijenazlar (COX), lipooksijenazlar (LOX) ve sitokrom p450 enzimleri görev almaktadır. Bunlardan ferroptoz için en önemli olanı demir içeren LOX enzimleridir. Özellikle ALOX15 enziminin ferroptotik hücre ölümünde membran lipidlerinin oksidasyonundan sorumlu olduğu bildirilmektedir (Feng ve Stockwell, 2018).



Şekil 1.3. Ferroptozda görülen demir bağımlı lipid peroksidasyonunun gösterimi.

Lipid peroksidasyonu sonucunda bir grup aldehit yapılı oksidasyon ürünü oluşmaktadır. Malondialdehit (MDA), 4-hidroksihekzenal (4-HHE) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) bu ürünlerden en yaygın olanlarıdır. MDA oldukça mutajenik bir üründür ve özellikle araşidonik asit ile daha büyük PUFA moleküllerinin peroksidasyonu sonucu oluşmaktadır (Hauck ve Bernlohr, 2016). Hücrede yüksek miktarda MDA birikimi diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi patolojik olaylarla ilişkilendirilmektedir (Garcia ve ark., 2013). MDA molekülleri, tiyobarbitürik asit ile kırmızı renkli bileşik oluşturduğundan ferroptozu inceleyen araştırmalarda lipid peroksidasyon biyobelirteci olarak kullanılmaktadır (Ayala ve ark., 2014).

1.3.3.Ferroptoz ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Ferroptozun tanımlanmasından sonra çok sayıda araştırmacı bu mekanizmanın çeşitli hastalıklarla olan ilişkisini incelemeye başlamış ve özellikle kanserde ferroptotik yolların indüklenmesinin yeni bir tedavi yaklaşımı olabileceğini savunmuştur. Bu bağlamda, çeşitli antikanser bileşiklerin ferroptotik etkisinin olup olmadığı incelenmiştir. Örneğin bir multi-kinaz inhibitörü olan sorafenibin akciğer, böbrek ve diğer bazı kanser türlerinde xCT sistemini inhibe ederek glutatyon eksikliğine ve bunu takiben ferroptozu yol açtığı yapılan deneylerle gösterilmiştir (Lachaier ve ark., 2014; Louandre ve ark., 2013). Bir başka çalışmada ise çeşitli meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-231, MCF-7, ZR-75, SKBr3) lizozom stabilitesini bozan siramesin ile bir tirozin kinaz inhibitörü olan lapatinibin ferroptotik etkileri araştırılmıştır. Yapılan deneylerde kaspaz inhibitörünün, siramesinin sitotoksik etkisini azaltmadığı, buna karşın ferroptoz inhibitörü olan ferrostatin-1 uygulandığında her iki maddenin de sitotoksik etkisinin inhibe olduğu saptanmıştır. Ferroptotik yolların incelendiği çeşitli deneylerle lapatinib ve siramesin kombinasyonlarının meme kanseri hücrelerinde sinerjik olarak ferroptozu indükleyerek daha güçlü antikanser etki gösterdiği tespit edilmiştir (Ma ve ark., 2016). Bunun yanında, kemoterapiye dirençli baş ve boyun kanseri hücrelerinde xCT sistemini inhibe ederek ferroptotik etki gösteren sulfasalazinin etkisi araştırılmıştır. *In vitro* ve *in vivo* deneylerden elde edilen verilere göre, xCT sisteminin inhibisyonu ve ferroptotik yolların aktivasyonu ile bu hücrelerde sispaltine olan direncin kırıldığı, dolayısıyla kemoterapiye dirençli kanser hücrelerinde ferroptotik yolların indüklenmesinin ümit vadeden bir tedavi yaklaşımı olabileceği belirtilmiştir (Roh ve ark., 2016).

Bu tez çalışmasında yukarıda bahsedilen ve literatürde bulunan diğer verilere paralel olarak, klinikte yaygın kullanılan antikanser ajanlardan sispaltin, dosetaksel ve etopozid'in erastin ile birlikte östrojen reseptörü pozitif (MCF-7) ve üçlü negatif (MDA-MB-231) meme kanseri hücreleri üzerindeki ferroptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Yapılan çalışmadan elde edilen verilerin literatüre önemli katkıda bulunması ve kanserde etkin bir tedavi yaklaşımı oluşturması hedeflenmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

Tez çalışmasında kullanılan MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatları ATCC (ABD) firmasından temin edilmiştir. MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) ajanı ile Ellman's (5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit) ajanı Sigma Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), tripsin-EDTA, fötal sığır serumu (FBS) ve penisilin-streptomisin Capricorn Scientific (Almanya) firmasından alınmıştır. Erastin, ferrostatin-1 ve sisplatin Adooq Bioscience (ABD) firmasından, etopozid ve dosetaksel Sigma Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Oksidatif stres tayininde kullanılan Muse Oxidative Stress Assay Kit ve mitokondriyal membran potansiyelinin ölçümünde kullanılan Muse Mitopotential Assay Kit Luminex (ABD) firmasından temin edilmiştir. Glutasyon peroksidaz (GPX) deney kiti ve Malondialdehit (MDA) deney kiti BT-Lab (Çin) firmasından alınmıştır. Elektroforez deneyinde kullanılan tüm materyaller Bio-Rad (Almanya) firmasından, primer antikorlar FineTest (Çin) firmasından, sekonder antikorlar ise Cell Signaling (Almanya) firmasından alınmıştır.

2.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Hücrelerin inkübe edildiği etüv Thermo Scientific (ABD) firmasından temin edilmiştir. Hücrelerin sayımında kullanılan cihaz Bio-Rad (Almanya) firmasından alınmıştır. Hücre canlılık deneyleri ile kolorimetrik deneylerde kullanılan spektrofotometrik ölçümlerin yapıldığı Multiskan GO Microplate cihazı ThermoFischer Scientific (ABD) firmasından alınmıştır. Oksidatif stres ve mitokondriyal membran potansiyelinin ölçümünde kullanılan Muse Cell Analyzer cihazı Millipore (ABD) firmasından temin edilmiştir. Western blot deneyinde kullanılan cihazlar ise Bio-Rad (Almanya) firmasından alınmıştır.

2.3. Test Örneklerinin Hazırlanması

Tez çalışmasında kullanılan hücreler 75 cm²'lik flasklarda %10 FBS (fötal sığır serumu), %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin) ve %1 L-glutamin içeren DMEM besiyeri ortamında 37°C ve %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Flask yüzeyini %90–95 oranında kaplamış hücreler pasajlanarak subkültür yapıldı. Bunun için hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra etüvden çıkarılarak steril hücre kültür kabinine alındı. Her bir flaska 4 ml tripsin eklenerek hücrelerin yüzeyden kaldırılması sağlandı. Falconlara alınan hücre süspansiyonları 3000 rpm hızda, 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Tripsin uzaklaştırıldıktan sonra yeterli miktar besiyeri ile homojenize edilen hücreler tripan mavisi kullanılarak hücre sayım cihazında sayıldı ve gerekli miktarda DMEM besiyeri ile homojenize edilerek hücre süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyondan plaklara ekim yapıldıktan sonra etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon sonunda etüvden alınan plaklar steril hücre kültür kabinine alınıp her bir kuyucuğa belirlenen dozlarda maddeler uygulandı.

Çalışmada uygulanan maddelerden etopozid, sisplatin, erastin ve ferostatın-1 %100 dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözündü. Dosetaksel ise %70 etanol içinde çözündü. Tüm maddeler çözündükten sonra DMEM besiyeri ile dilüe edildi.

2.4. Sitotoksite Tayini

Tez çalışmasında uygulanan maddelerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT deneyi ile incelenmiştir. Bu amaçla, 96'lık plaklara 5 x 10⁴ cell/ml (180 µl volümde) ekim yapıldı. 24 saat sonra maddeler 4'er tekrarlı olmak üzere hücrelere uygulandı. 24 ve 48 saat sonra plaklar aspire edilerek 20 µl volümde 5 mg/ml MTT ajanı ve 180 µl besiyeri uygulandı. 2 saat sonra plaklar tekrar aspire edilerek 100 µl DMSO ile formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı ve 540 nm'de spektrofotometrik ölçüm alındı.

2.5. Oksidatif Stres Tayini

Kültür edilen hücreler, 1×10^6 hücre/ml konsantrasyonda 12 kuyucuklu plaklara ekildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra maddeler belirlenen dozlarda hücrelere uygulandı. 24 saat sonra hücreler tripsin yardımıyla plak yüzeyinden kaldırılarak 3000 rpm hızda 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen hücre pelletleri 1 ml 1x assay buffer içerisinde süspande edildi. Bu sırada oksidatif stres ajanı 1x assay buffer ile dilüe edilerek her bir örnek için 190 µl volümde eppendorflara dağıtıldı. Üzerine hücre süspansiyonlarından 10'ar µl ilave edildi ve 37 °C 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra Muse Cell Analyzer cihazı kullanılarak tüm örneklerden ölçüm alındı.

2.6. Mitokondriyal Membran Potansiyeli Ölçümü

Kültür edilen hücreler, 2×10^5 hücre/ml konsantrasyonda 12 kuyucuklu plaklara ekildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra maddeler belirlenen dozlarda hücrelere uygulandı. 24 saat sonra hücreler tripsin yardımıyla plak yüzeyinden kaldırılarak 3000 rpm hızda 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen hücre pelletleri 600 µl DMEM besiyeri ortamında süspande edildi. İçlerinden 100'er µl yeni eppendorflara aktarıldı. Bu sırada mitopotential boya 1x assay buffer içerisinde dilüe edildi. Hücre süspansiyonları üzerine 95 µl volümde ilave edildikten sonra tüm örnekler 20 dakika boyunca 37 °C sıcaklıkta ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda her bir örnek üzerine 5 µl 7-aminoaktinomisin D (7-AAD) ilave edildi ve 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra Muse Cell Analyzer cihazı kullanılarak tüm örneklerden ölçüm alındı.

2.7. Lipid Peroksidasyonu Tayini

Lipid peroksidasyonu sonucu hücrelerde malondialdehit (MDA) oluşmaktadır. Oluşan bu ürünün kantitatif tayini tiyobarbitürik asit (TBA) metoduna dayanan MDA Assay Kit (BT-Lab, China) kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla, kültür edilen hücreler

öncelikle $2,5 \times 10^6$ hücre/ml konsantrasyonda 6 kuyucuklu plaklara ekildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra maddeler belirlenen dozlarda hücrelere uygulandı. 24 saat sonra hücreler tripsin yardımıyla plak yüzeyinden kaldırılarak 3000 rpm hızda 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Hücre pelletleri bir defa 1x PBS buffer ile yıkandıktan sonra tekrar santrifüj edildi. Pelletler hücre lizis çözeltisi içerisinde 30 dakika boyunca buzda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 14000 x g hızda $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi ve supernatantlar ayrı eppendorflara aktarıldı. Elde edilen lizatlardan 120 µl cam deney tüplerine aktarıldı. Üzerlerine eşit volümde olacak şekilde kit içerisinde bulunan reagent-1 ilave edildi. Bunun yanında bir tüpe standart çözelti, bir tüpe de absöü etanol eşit miktarlarda eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra tüplerin her birine, kit içerisinde yer alan reagent-2 ve reagent-3 karışımı 1200 µl volümde ilave edildi. Daha sonra tüplerin ağzı film ile kapatılarak 95°C sabit sıcaklıktaki su banyosunda 70 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda her bir tüp içerisinde 100 µl 96'lık plaklara aktarıldı ve 532 nm dalgaboyunda spektrofotometrik ölçüm alındı.

2.8. Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Tayini

Kültür edilen hücreler, $2,5 \times 10^6$ hücre/ml konsantrasyonda 6 kuyucuklu plaklara ekildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra maddeler belirlenen dozlarda hücrelere uygulandı. 24 saat sonra hücreler tripsin yardımıyla plak yüzeyinden kaldırılarak 3000 rpm hızda 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Hücre pelletleri bir defa 1x PBS buffer ile yıkandıktan sonra tekrar santrifüj edildi. Pelletler hücre lizis çözeltisi içerisinde 30 dakika boyunca buzda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 14000 x g hızda $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi ve supernatantlar ayrı eppendorflara aktarıldı. Elde edilen lizatlardan deneyde kullanılmak üzere %10'luk dilüsyonlar hazırlandı. Her bir numune için bir adet non-enzimatik bir adet de enzimatik reaksiyon tüpü hazırlandı. Kit içerisinde yer alan bilgiler doğrultusunda her iki tüpe öncelikle 1 mmol/L GSH standart çözeltisinden 100 µl eklendi. Daha sonra enzimatik reaksiyon tüpüne lizatlardan 100 µl ilave edildi. 5 dk 37°C su banyosunda inkübasyona bırakıldıktan sonra her iki tüpe reagent-1 çözeltisinden 100 µl ilave edildi. Tekrar 5 dk 37°C su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda her iki tüpe reagent-2 çözeltisinden 100 µl ve non-enzimatik tüplere lizatlardan 100 µl ilave edildikten sonra kromojenik

reaksiyon aşamasına geçildi. Bu reaksiyon için bir adet standart, bir adet kör ve her numune için birer non-enzimatik ve enzimatik reaksiyon tüpleri hazırlandı. İçlerine belirtilen miktarlarda reagent-3, reagent-4 ve reagent-5 karışımı ilave edildikten sonra bir önceki aşamada elde edilen karışımlardan 100 µl eklendi. Standartın yer aldığı tüpe ise 20 µmol/L GSH çözeltisinden konuldu. Yeterince karıştırıldıktan sonra 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Oluşan sarı renk 412 nm dalgaboyunda spektrofotometre ile ölçüldü.

2.9. Glutasyon Düzeyleri Tayini

Hücre içi glutasyon düzeyleri kolorimetrik bir yöntemle tayin edilmiştir (Tang ve ark., 2019). Bu amaçla, kültür edilen hücreler, $2,5 \times 10^6$ hücre/ml konsantrasyonda 6 kuyucuklu plaklara ekildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra maddeler belirlenen dozlarda hücrelere uygulandı. 24 saat sonra hücreler tripsin yardımıyla plak yüzeyinden kaldırılarak 3000 rpm hızda 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Hücre pelletleri bir defa 1x PBS buffer ile yıkandıktan sonra tekrar santrifüj edildi. Pelletler hücre lizis çözeltisi içerisinde 30 dakika boyunca buzda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 14000 x g hızda +4° C’de 10 dakika boyunca santrifüj edildi ve supernatantlar ayrı eppendorflara aktarıldı. Elde edilen lizatlardan 100 µl içerisine aynı volümde 200 µM 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) çözeltisi ilave edildi. 30 dakikalık inkübasyondan sonra oluşan sarı rengin absorbansı 412 nm dalgaboyunda bir mikropak okuyucu ile ölçüldü. Elde edilen ölçümler kontrol grubu ile kıyaslanarak % değerler elde edildi.

2.10. Western Blot Analizi

Ferroptotik proteinlerin ekspresyonu western blot yöntemi ile ölçülmüştür. Kültür edilen hücreler, $2,5 \times 10^6$ hücre/ml konsantrasyonda 6 kuyucuklu plaklara ekildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra maddeler belirlenen dozlarda hücrelere uygulandı. 24 saat sonra hücreler tripsin yardımıyla plak yüzeyinden kaldırılarak 3000 rpm hızda 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Hücre pelletleri bir defa 1x PBS buffer ile

yıkandıktan sonra tekrar aynı hızda santrifüj edildi. Pelletler hücre lizis çözeltisi (Cell Signaling, ABD) içerisinde 30 dakika boyunca buzda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 14000 x g hızda +4° C’de 10 dakika boyunca santrifüj edildi ve supernatantlar ayrı eppendorflara aktarıldı. Elde edilen lizatlar 25 µg protein içerecek şekilde SDS-PAGE jel üzerine uygulandı ve 1 saat boyunca elektroforez işlemi ile yürütüldü. Semi-dry transfer cihazı (BioRad, ABD) ile proteinler bir nitrosellüloz membrana aktarıldıktan sonra 1x PBS ile 3 defa yıkama yapıldı. Yıkama işlemini takiben %5 yağsız süt tozu içeren PBS çözeltisinde 1,5 saat boyunca bloklama yapıldı ve daha sonra primer antikorlar membranlar üzerine aktarıldı. Gece boyu +4° C’de inkübasyona bırakıldıktan sonra membranlar 3 defa PBS-Tween ile yıkandı ve membranların üzerine sekonder antikorlar konuldu. 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra tekrar 3 defa PBS-Tween ile yıkama yapıldı. Tüm membranlar Li-cor Odyssey FC cihazı ile görüntülendi.

2.11. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz SPSS 20.0 programı kullanılarak yapılmıştır. İkili karşılaştırmalarda Student-t testi, çoklu karşılaştırmalarda ise One-way ANOVA yöntemi kullanılmıştır. Kombinasyon çalışmalarında ise Chou ve Talalay’ın geliştirdiği yöntem kullanılarak tüm dozlar için kombinasyon indeks (CI) değerleri hesaplanmıştır (Chou ve Talalay, 1984). Buna göre CI<1 ise sinerjik etki, CI=1 ise additif etki, CI>1 ise antagonist etki olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyleri *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, f_p <0.0001, #p<0.00001 şeklinde belirtilmiştir.

3. BULGULAR

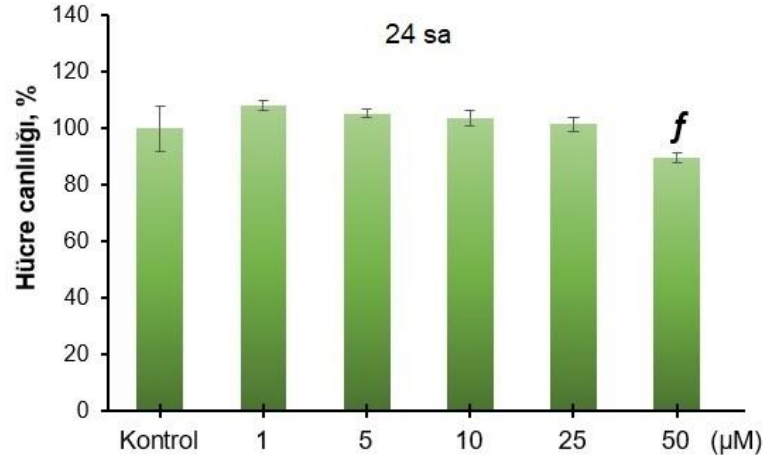
3.1. Hücre Canlılığı Deney Sonuçları

3.1.1. Sisplatinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

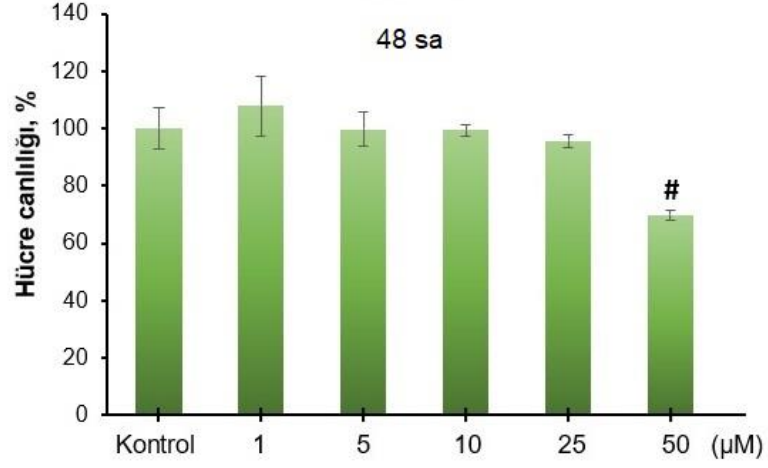
MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine 1-50 μ M dozlarda sisplatin uygulanmıştır. 24 ve 48 saat sonra elde edilen hücre canlılık değerleri Çizelge 3.1, Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te gösterilmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 50 μ M dışındaki dozlarda sitotoksik etki gözlenmemiştir (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4). MCF-10A hücrelerinde ise 24.saatte hiçbir dozda toksik etki gözlenmemiş, yalnızca 48.saatte 50 μ M konsantrasyonda anlamlı etki görülmüştür ($p<0,05$) (Şekil 3.5, Şekil 3.6).

Çizelge 3.1. Sisplatinin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%).

Konsantrasyon	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	
	24.saat	48.saat
Kontrol	100 $\pm$ 7,91	100 $\pm$ 7,21
1 μ M	108,22 $\pm$ 1,72	107,89 $\pm$ 10,33
5 μ M	105,35 $\pm$ 1,49	99,83 $\pm$ 6,00
10 μ M	103,58 $\pm$ 2,74	99,40 $\pm$ 2,15
25 μ M	101,51 $\pm$ 2,68	95,63 $\pm$ 2,08
50 μ M	89,91 $\pm$ 1,75	69,84 $\pm$ 1,89



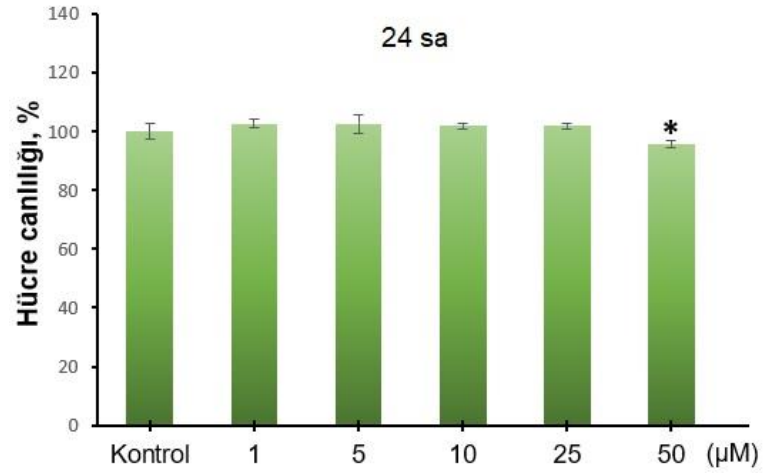
Şekil 3.1. Sisplatinin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) $f_p < 0,0001$.



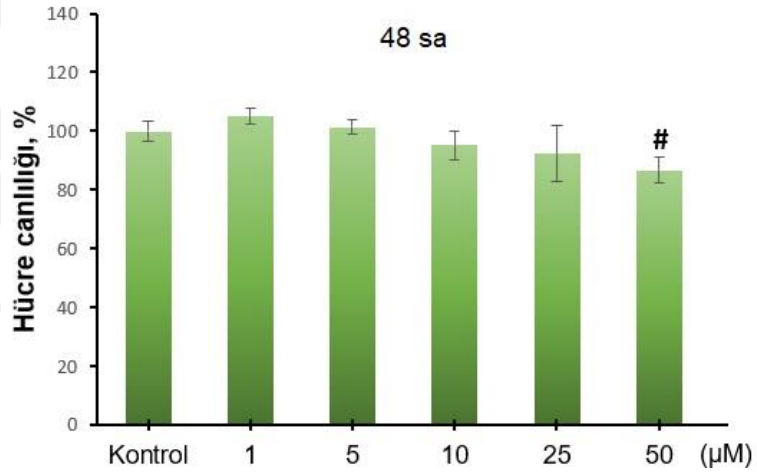
Şekil 3.2. Sisplatinin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat) $\#p < 0,00001$.

Çizelge 3.2. Sisplatinin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%).

Konsantrasyon	Ortalama ± Standart Sapma	
	24.saat	48.saat
Kontrol	100 ± 2,69	100 ± 3,27
1 µM	102,67 ± 1,30	105,03 ± 2,65
5 µM	102,51 ± 3,19	101,40 ± 2,41
10 µM	101,86 ± 0,93	95,19 ± 4,96
25 µM	101,86 ± 0,93	92,32 ± 9,39
50 µM	95,60 ± 1,23	86,69 ± 4,36



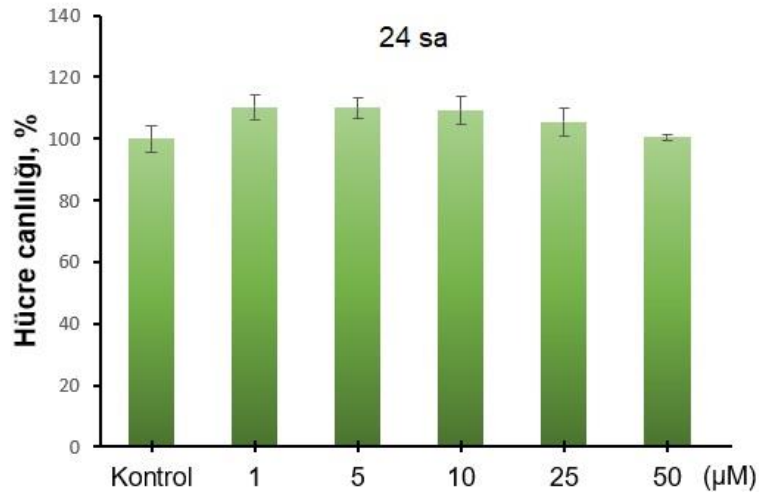
Şekil 3.3. Sisplatinin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) *p<0,05.



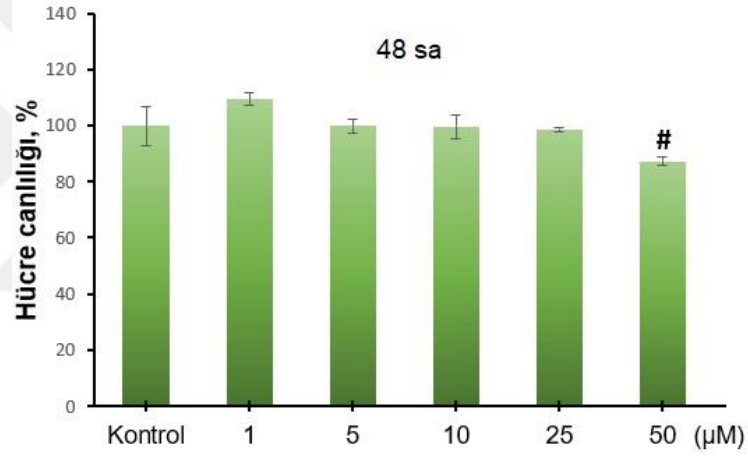
Şekil 3.4. Sisplatinin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat) #p<0,00001.

Çizelge 3.3. Sisplatinin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%).

Konsantrasyon	Ortalama ± Standart Sapma	
	24.saat	48.saat
Kontrol	100 ± 4,17	100 ± 6,97
1 µM	110,18 ± 4,18	109,43 ± 2,14
5 µM	109,94 ± 3,36	100,00 ± 2,50
10 µM	109,13 ± 4,55	99,52 ± 4,18
25 µM	105,37 ± 4,48	98,67 ± 0,70
50 µM	100,40 ± 1,09	87,26 ± 1,46



Şekil 3.5. Sisplatinin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat).



Şekil 3.6. Sisplatin'in MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat) #p<0,00001.

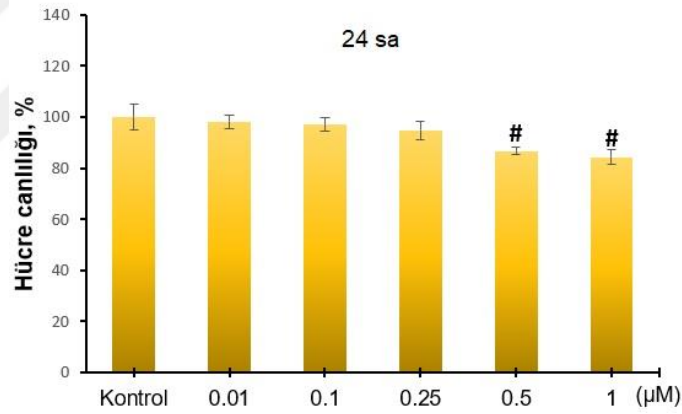
3.1.2. Dosetaksel'in Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine 0,01-1 µM dozlarda dosetaksel uygulanmıştır. 24 ve 48 saat sonra elde edilen hücre canlılık değerleri Çizelge 3.4, Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6'da gösterilmiştir. Buna göre, MCF-7 hücrelerinde 24.saatte 0,5 ve 1 µM dozlarda anlamlı sitotoksik etki gözlenirken, MDA-MB-231 hücrelerinde 0,1; 0,25; 0,5 ve 1 µM dozlarda anlamlı etki gözlenmiştir (p<0,05) (Şekil 3.7, Şekil 3.9). MCF-10A hücrelerinde ise 24.saatte yalnızca 1 µM

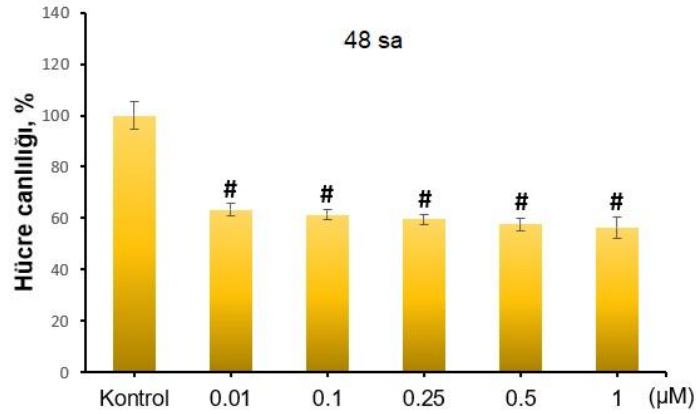
dozda anlamlı sitotoksik etki görülmüştür ($p<0,05$) (Şekil 3.11). 48.saatte ise tüm hücre hatlarında ve tüm dozlarda anlamlı sitotoksik etki tespit edilmiştir (Şekil 3.8, Şekil 3.10, Şekil 3.12).

Çizelge 3.4. Dosetakselin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%).

Konsantrasyon	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	
	24.saatt	48.saatt
Kontrol	100 $\pm$ 5,02	100 $\pm$ 5,33
0,01 μ M	98,24 $\pm$ 2,72	63,29 $\pm$ 2,47
0,1 μ M	97,07 $\pm$ 2,56	61,39 $\pm$ 1,77
0,25 μ M	94,71 $\pm$ 3,65	59,63 $\pm$ 2,04
0,5 μ M	86,60 $\pm$ 1,41	57,63 $\pm$ 2,46
1 μ M	84,17 $\pm$ 2,87	56,13 $\pm$ 4,14



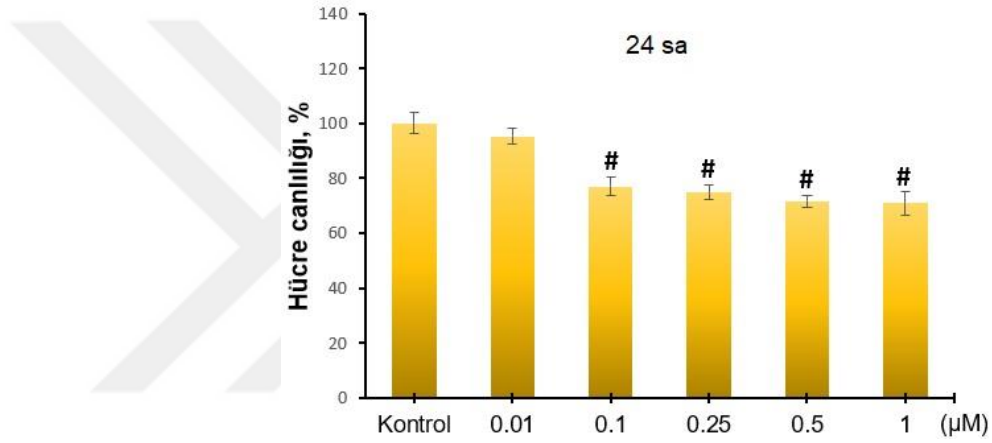
Şekil 3.7. Dosetaksel'in MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saatt) # $p<0,00001$.



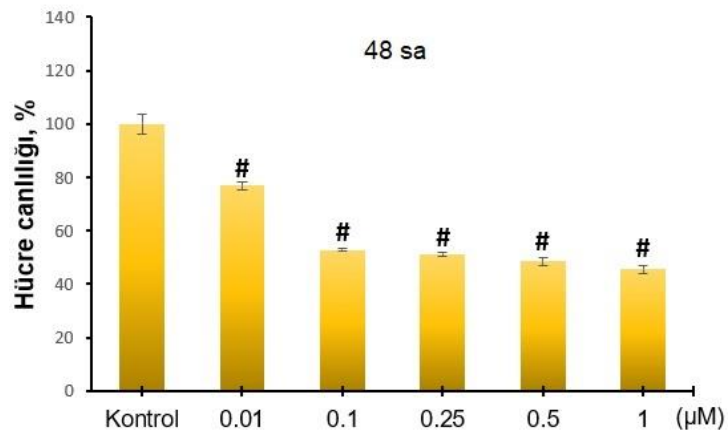
Şekil 3.8. Dosetaksel'in MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saatt) # $p<0,00001$.

Çizelge 3.5. Dosetakselin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%).

Konsantrasyon	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	
	24.saat	48.saat
Kontrol	100 $\pm$ 3,91	100 $\pm$ 3,62
0,01 μ M	95,12 $\pm$ 2,86	76,92 $\pm$ 1,55
0,1 μ M	76,97 $\pm$ 3,28	52,72 $\pm$ 0,50
0,25 μ M	74,75 $\pm$ 2,58	51,39 $\pm$ 0,69
0,5 μ M	71,61 $\pm$ 2,16	48,68 $\pm$ 1,47
1 μ M	70,94 $\pm$ 4,29	45,61 $\pm$ 1,52



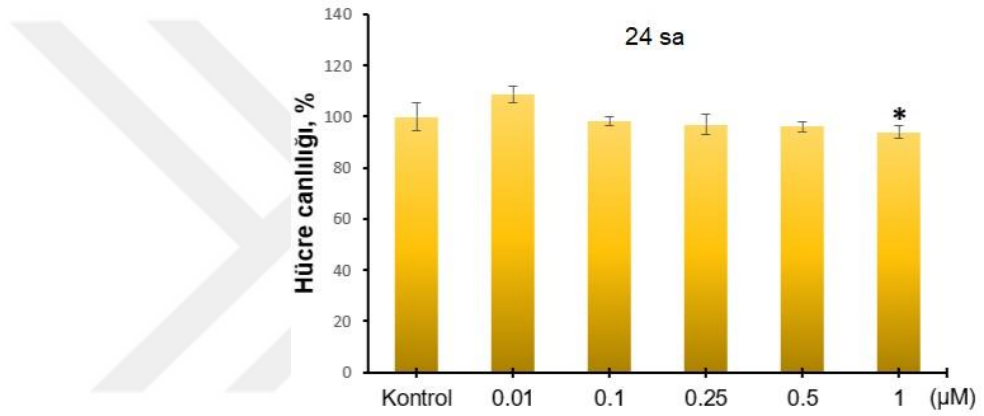
Şekil 3.9. Dosetaksel'in MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat)
#p<0,00001.



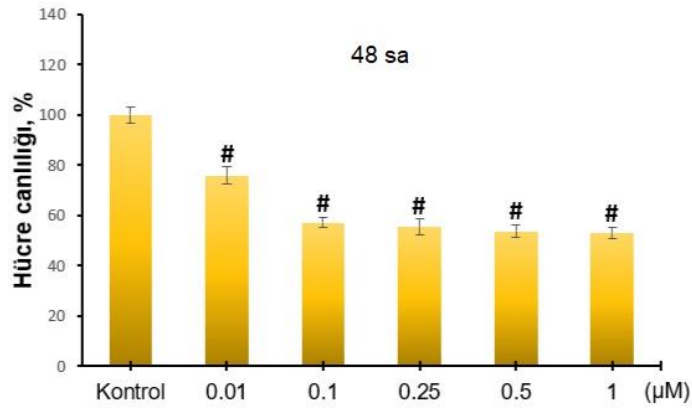
Şekil 3.10. Dosetaksel'in MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat)
#p<0,00001.

Çizelge 3.6. Dosetakselin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%).

Konsantrasyon	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	
	24.saat	48.saat
Kontrol	100 $\pm$ 5,64	100 $\pm$ 3,20
0,01 μ M	108,76 $\pm$ 3,27	75,96 $\pm$ 3,35
0,1 μ M	98,22 $\pm$ 1,70	57,06 $\pm$ 2,00
0,25 μ M	96,89 $\pm$ 3,94	55,32 $\pm$ 3,29
0,5 μ M	96,07 $\pm$ 2,00	53,70 $\pm$ 2,28
1 μ M	93,91 $\pm$ 2,41	52,95 $\pm$ 2,26



Şekil 3.11. Dosetaksel'in MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) *p<0,05.



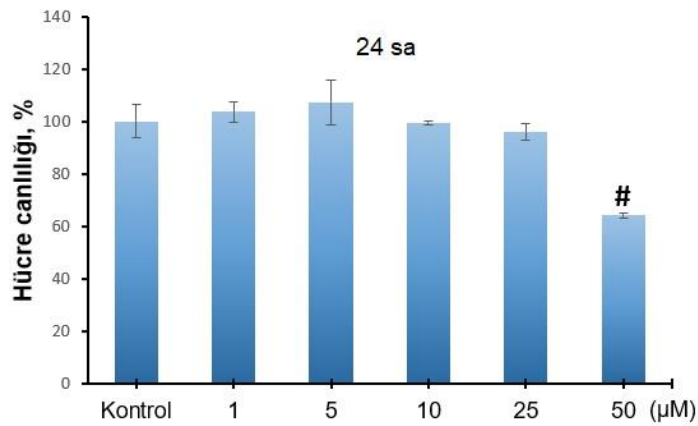
Şekil 3.12. Dosetaksel'in MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat) #p<0,00001.

3.1.3. Etopozidin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

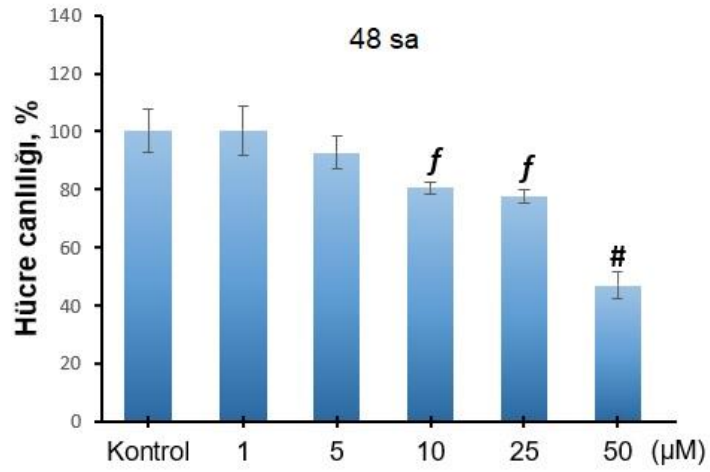
MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine 1-50 μM doz aralığında etopozid uygulanmıştır. 24 ve 48 saat sonra elde edilen hücre canlılık değerleri Çizelge 3.7, Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9'da gösterilmiştir. Buna göre, MCF-7 hücrelerinde 24.saatte 50 μM dozda, 48.saatte ise 10, 25 ve 50 μM dozda anlamlı sitotoksik etki gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.13, Şekil 3.14). MDA-MB-231 hücrelerinde 24.saatte 10, 25 ve 50 μM dozlarda, 48.saatte ise 1 μM dışındaki tüm dozlarda anlamlı etki gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.15, Şekil 3.16). MCF-10A hücrelerinde ise 24.saatte yalnızca 25 ve 50 μM dozlarda, 48.saatte tüm dozlarda anlamlı sitotoksik etki görülmüştür ($p<0,05$) (Şekil 3.17, Şekil 3.18).

Çizelge 3.7. Etopozidin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%).

Konsantrasyon	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	
	24.saat	48.saat
Kontrol	100 $\pm$ 6,30	100 $\pm$ 7,46
1 μM	103,62 $\pm$ 4,01	100,23 $\pm$ 8,30
5 μM	107,21 $\pm$ 8,52	94,92 $\pm$ 4,64
10 μM	99,51 $\pm$ 0,73	80,50 $\pm$ 1,89
25 μM	95,85 $\pm$ 3,23	77,48 $\pm$ 2,21
50 μM	64,21 $\pm$ 0,91	46,99 $\pm$ 4,71



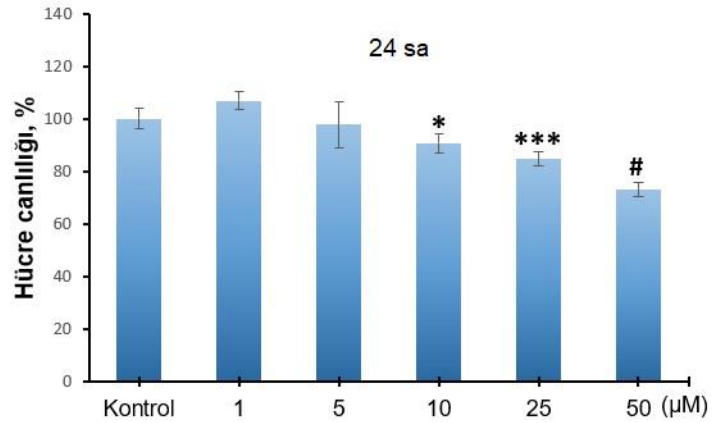
Şekil 3.13. Etopozidin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) # $p<0,00001$.



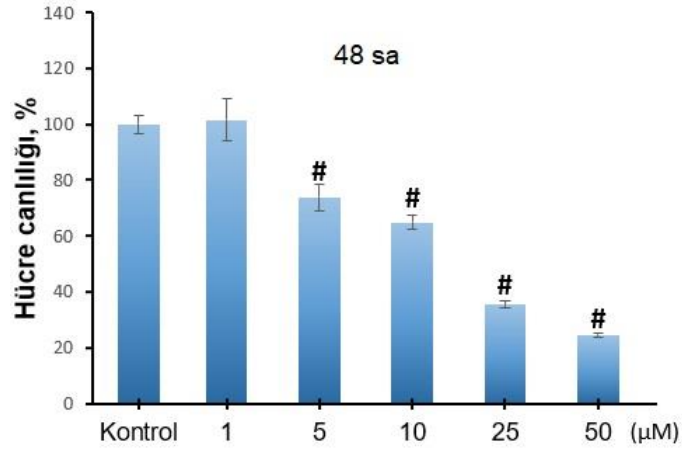
Şekil 3.14. Etopozidin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat) $f p < 0,0001$, $\# p < 0,00001$.

Çizelge 3.8. Etopozidin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%).

Konsantrasyon	Ortalama ± Standart Sapma	
	24.saat	48.saat
Kontrol	100 ± 3,75	100 ± 3,28
1 µM	106,85 ± 3,40	101,55 ± 7,43
5 µM	97,74 ± 8,66	73,73 ± 4,55
10 µM	90,59 ± 3,75	64,78 ± 2,61
25 µM	84,52 ± 2,69	35,33 ± 1,19
50 µM	72,84 ± 2,66	24,44 ± 0,59



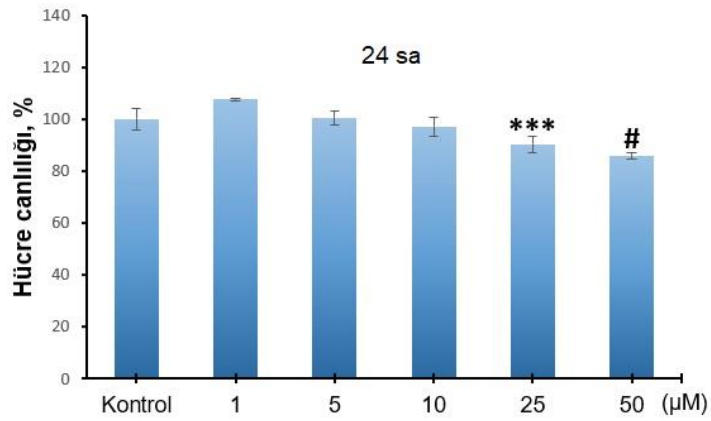
Şekil 3.15. Etopozidin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) $* p < 0,05$, $*** p < 0,001$, $\# p < 0,00001$.



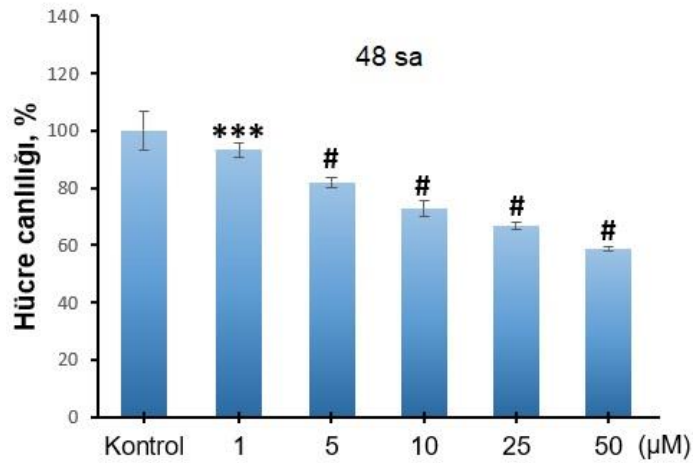
Şekil 3.16. Etopozidin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat) #p<0,00001.

Çizelge 3.9. Etopozidin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%).

Konsantrasyon	Ortalama ± Standart Sapma	
	24.saat	48.saat
Kontrol	100 ± 4,17	100 ± 6,97
1 µM	107,53 ± 0,67	93,28 ± 2,63
5 µM	100,48 ± 2,60	82,04 ± 1,83
10 µM	97,04 ± 3,86	72,65 ± 2,70
25 µM	90,22 ± 3,24	66,79 ± 1,31
50 µM	85,90 ± 1,20	58,64 ± 0,90



Şekil 3.17. Etopozidin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) ***p<0,001, #p<0,00001.



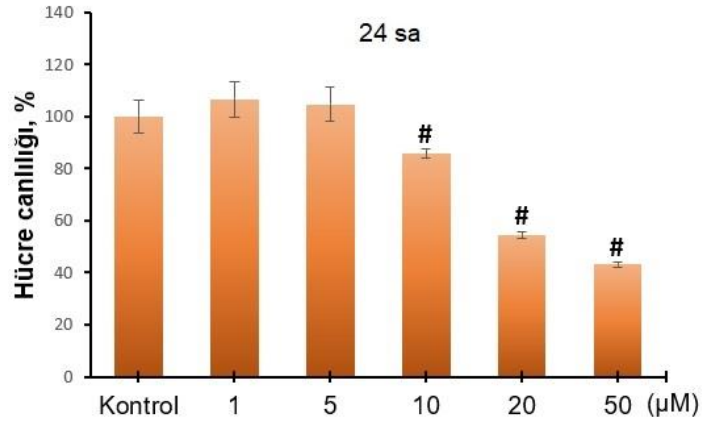
Şekil 3.18. Etopozidin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat) ***p<0,001, #p<0,00001.

3.1.4. Erastinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

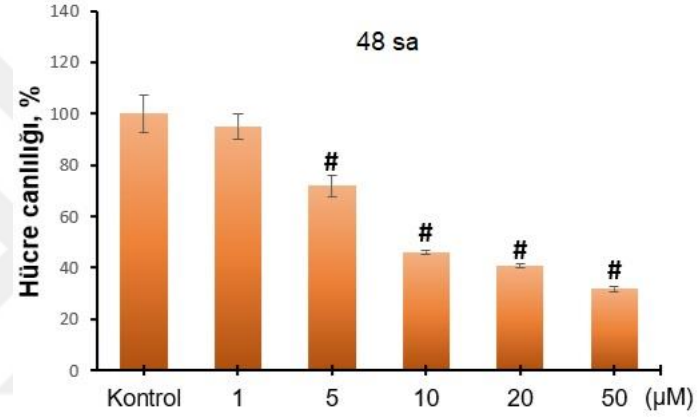
MCF-7, MCF-10A hücrelerine 1-50 µM doz aralığında erastin uygulanmıştır. MDA-MB-231 hücrelerine ise 0,1-1 µM doz aralığında erastin uygulanmıştır. 24 ve 48 saat sonra elde edilen hücre canlılık değerleri Çizelge 3.10, Çizelge 3.11 ve Çizelge 3.12’de gösterilmiştir. Buna göre, MCF-7 hücrelerinde 24.saatte 10, 20 ve 50 µM dozda, 48.saatte ise 5, 10, 20 ve 50 µM dozda anlamlı sitotoksik etki gözlenmiştir (p<0,05) (Şekil 3.19, Şekil 3.20). MDA-MB-231 hücrelerinde 24.saatte 0,75 ve 1 µM dozlarda, 48.saatte ise 0,5; 0,75 ve 1 µM dozlarda anlamlı etki gözlenmiştir (p<0,05) (Şekil 3.21, Şekil 3.22). MCF-10A hücrelerinde ise 24 ve 48.saatte tüm dozlarda anlamlı sitotoksik etki görülmüştür (p<0,05) (Şekil 3.23, Şekil 3.24).

Çizelge 3.10. Erastinin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%).

Konsantrasyon	Ortalama ± Standart Sapma	
	24.saat	48.saat
Kontrol	100 ± 6,30	100 ± 7,46
1 µM	106,59 ± 6,88	94,86 ± 4,95
5 µM	104,72 ± 6,75	61,31 ± 4,72
10 µM	85,70 ± 1,82	46,11 ± 0,94
20 µM	54,30 ± 1,32	40,69 ± 0,77
50 µM	43,08 ± 1,15	31,91 ± 1,05



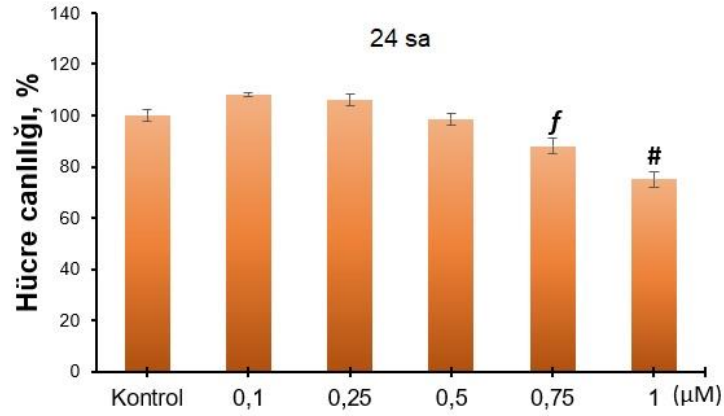
Şekil 3.19. Erastinin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) #p<0,00001.



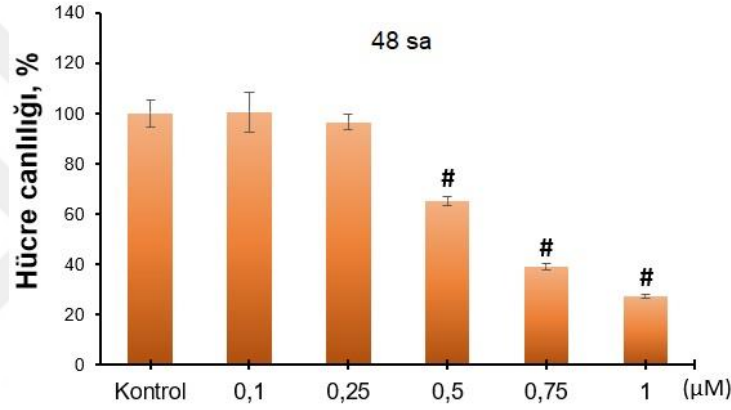
Şekil 3.20. Erastinin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat) #p<0,00001.

Çizelge 3.11. Erastinin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%).

Konsantrasyon	Ortalama ± Standart Sapma	
	24.saat	48.saat
Kontrol	100 ± 4,40	100 ± 5,21
0,1 µM	108,06 ± 0,92	100,51 ± 8,16
0,25 µM	106,08 ± 2,37	96,60 ± 2,94
0,5 µM	98,53 ± 2,03	65,27 ± 1,80
0,75 µM	88,05 ± 2,99	39,14 ± 1,14
1 µM	75,22 ± 3,03	27,12 ± 0,78



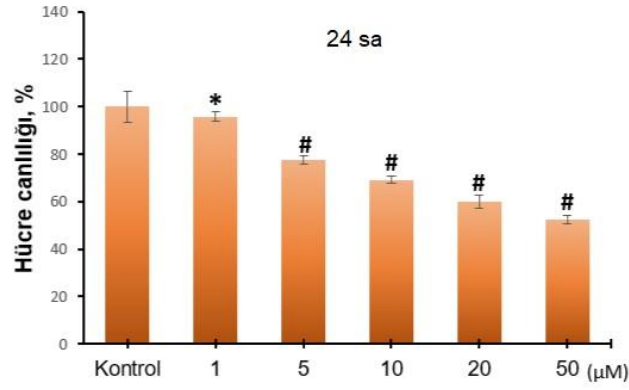
Şekil 3.21. Erastinin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) $f_p < 0,0001$, $\#p < 0,00001$.



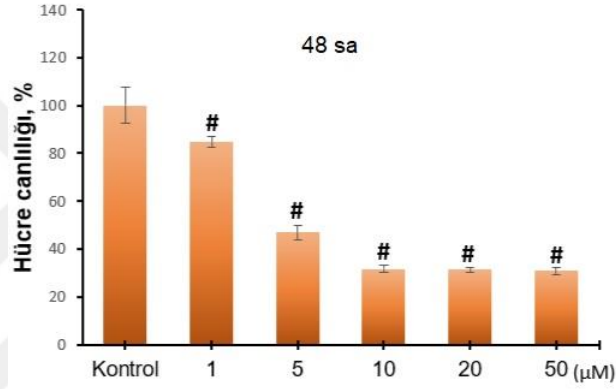
Şekil 3.22. Erastinin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat) $\#p < 0,00001$.

Çizelge 3.12. Erastinin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%).

Konsantrasyon	Ortalama ± Standart Sapma	
	24.saat	48.saat
Kontrol	100 ± 6,56	100 ± 7,58
1 µM	95,79 ± 1,92	84,60 ± 2,32
5 µM	77,53 ± 1,66	46,97 ± 3,03
10 µM	69,11 ± 1,53	31,52 ± 1,54
20 µM	59,84 ± 2,67	31,25 ± 1,09
50 µM	52,46 ± 1,60	30,75 ± 1,64



Şekil 3.23. Erastinin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) * $p < 0,05$, # $p < 0,00001$.



Şekil 3.24. Erastinin MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (48.saat) # $p < 0,00001$.

3.1.5. Sisplatinin Erastin ile Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

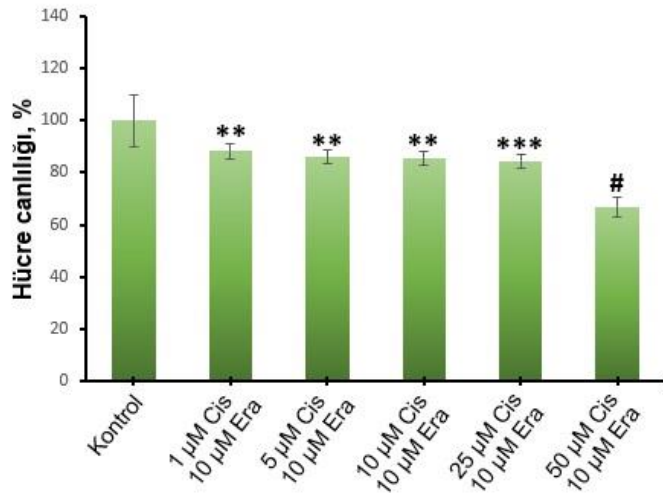
Kombinasyon çalışmalarında ferroptoz indükleyicisi olarak kullanılan erastinin MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinde 10 µM dozunun uygulanması kararlaştırılmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinde ise 1 µM erastin dozu seçilmiştir. MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarına sisplatinin tüm dozları ile 10 µM erastinin kombinasyonu uygulanmış ve 24.saatte elde edilen veriler Çizelge 3.13 ve Çizelge 3.15'te gösterilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde ise sisplatinin tüm dozları 1 µM erastin ile kombinasyon halinde uygulanmış, elde edilen hücre canlılık değerleri Çizelge 3.14'te verilmiştir. Ayrıca sinerjik etkinin olup olmadığının tayin edilmesi amacıyla kombinasyon indeks (CI) değerleri hesaplanmış ve elde edilen değerler ilgili tablolarda belirtilmiştir. Buna göre, MCF-7 hücrelerinde sisplatin ve erastin

kombinasyonlarının hiçbirinde sinerjik etki gözlenmemiştir ($CI>1$) (Şekil 3.25). MDA-MB-231 hücrelerinde ise 50+1 μM dışındaki tüm dozlarda sinerjik etki tespit edilmiştir ($CI<1$) (Şekil 3.26). Buna karşın, MCF-10A hücrelerinde tüm dozlarda sinerjik etki gözlenmiştir (Şekil 3.27).

Çalışmanın devamında MDA-MB-231 hücrelerinde sinerjinin görüldüğü en düşük doz olan 1+1 μM kombinasyonunun uygulanması kararlaştırılmıştır. MCF-7 hücrelerinde sinerjinin görülmemesi sebebiyle bu hücrelerle sisplatin çalışmasına devam edilmemiştir.

Çizelge 3.13. Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI).

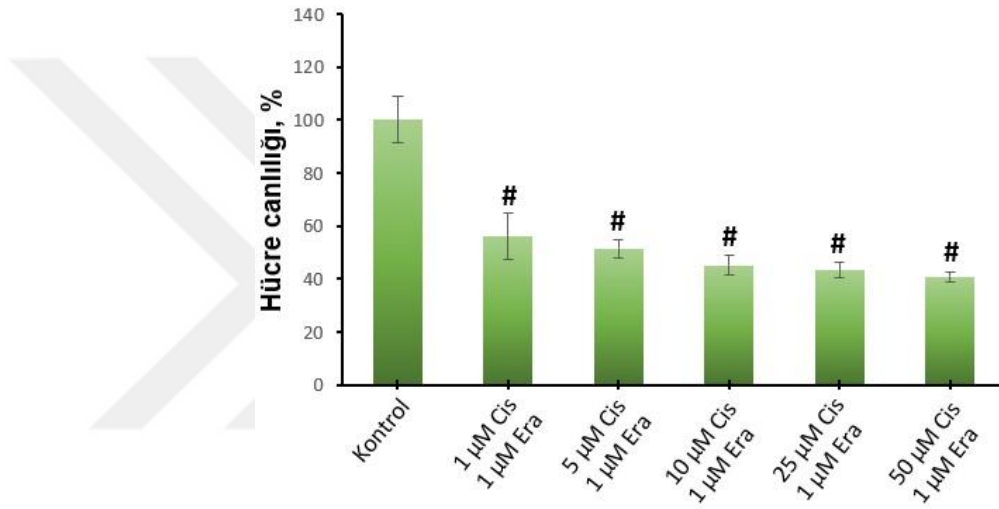
Konsantrasyon	Ortalama $\pm$ SS	CI
1 + 10 μM	88,22 $\pm$ 3,22	1,5743
5 +10 μM	86,13 $\pm$ 2,80	1,4164
10 +10 μM	85,68 $\pm$ 2,51	1,4578
25 + 10 μM	84,44 $\pm$ 2,87	1,5989
50 + 10 μM	66,60 $\pm$ 3,75	1,2357



Şekil 3.25. Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, # $p<0,00001$.

Çizelge 3.14. Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI).

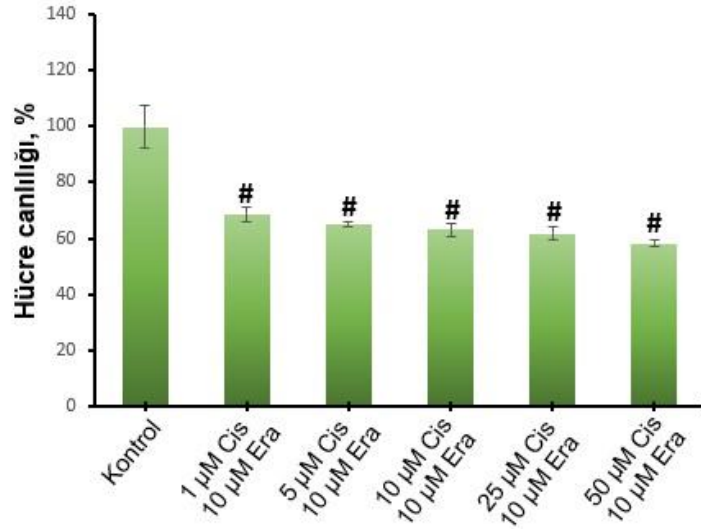
Konsantrasyon	Ortalama $\pm$ SS	CI
1 + 1 μ M	56,04 $\pm$ 8,81	0,9493
5 +1 μ M	51,42 $\pm$ 3,50	0,9437
10 +1 μ M	45,15 $\pm$ 3,76	0,9294
25 + 1 μ M	43,36 $\pm$ 2,96	0,9942
50 + 1 μ M	40,90 $\pm$ 1,98	1,0969



Şekil 3.26. Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) #p<0,00001.

Çizelge 3.15. Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI).

Konsantrasyon	Ortalama $\pm$ SS	CI
1 + 10 μ M	68,57 $\pm$ 2,42	0,7356
5 +10 μ M	65,00 $\pm$ 1,01	0,6182
10 +10 μ M	63,13 $\pm$ 2,46	0,5819
25 + 10 μ M	61,61 $\pm$ 2,38	0,6061
50 + 10 μ M	58,21 $\pm$ 0,92	0,6264



Şekil 3.27. Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) #p<0,00001.

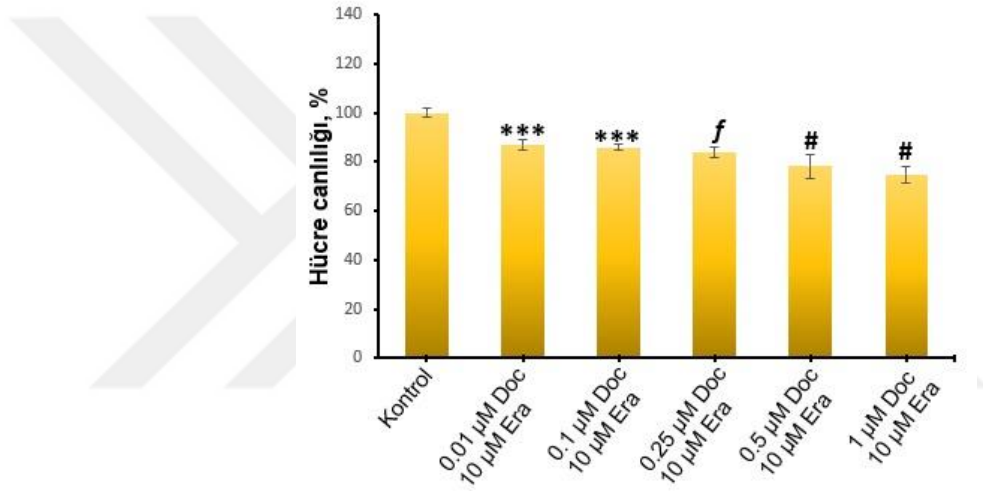
3.1.6. Dosetakselin Erastin ile Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine dosetakselin tüm dozları ile 10 µM erastin kombinasyon halinde uygulanmış ve 24.saatte elde edilen veriler Çizelge 3.16 ve Çizelge 3.18’de gösterilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde ise dosetakselin tüm dozları 1 µM erastin ile kombinasyon halinde uygulanmış, elde edilen hücre canlılık değerleri Çizelge 3.17’de verilmiştir. Ayrıca sinerjik etkinin olup olmadığının tayin edilmesi amacıyla kombinasyon indeks (CI) değerleri hesaplanmış ve elde edilen değerler ilgili tablolarda belirtilmiştir. Buna göre, MCF-7 hücrelerinde dosetaksel ve erastin kombinasyonlarının 0,5 ve 1 µM dozlarında sinerjik etki görülmüştür (CI<1) (Şekil 3.28). MDA-MB-231 hücrelerinde ise 0,01+1 µM dışındaki tüm dozlarda sinerjik etki tespit edilmiştir (CI<1) (Şekil 3.29). Buna karşın, MCF-10A hücrelerinde tüm dozlarda sinerjik etki gözlenmiştir (CI<1) (Şekil 3.30).

Çalışmanın devamında MCF-7 hücrelerinde sinerjinin görüldüğü en düşük doz olan 0,5+10 µM kombinasyonunun uygulanması kararlaştırılmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinde ise sinerjinin görüldüğü en düşük doz olan 0,1+1 µM kombinasyonu seçilmiştir.

Çizelge 3.16. Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI).

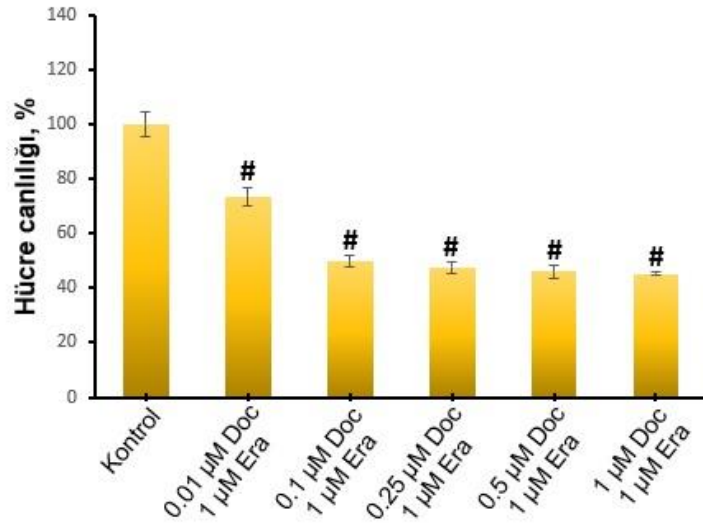
Konsantrasyon	Ortalama $\pm$ SS	CI
0,01 + 10 μ M	86,78 $\pm$ 2,10	1,3979
0,1 + 10 μ M	85,80 $\pm$ 1,18	1,3143
0,25 + 10 μ M	83,79 $\pm$ 2,03	1,1611
0,5 + 10 μ M	78,10 $\pm$ 4,75	0,8514
1 + 10 μ M	74,89 $\pm$ 3,31	0,7363



Şekil 3.28. Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) ***p<0,001, *f*p<0,0001, #p<0,00001.

Çizelge 3.17. Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI).

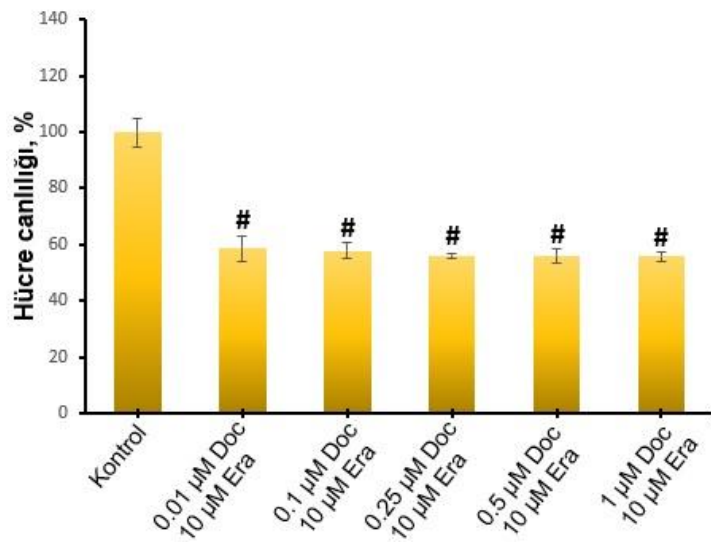
Konsantrasyon	Ortalama $\pm$ SS	CI
0,01 + 1 μ M	73,62 $\pm$ 3,38	1,0577
0,1 + 1 μ M	49,78 $\pm$ 2,21	0,8458
0,25 + 1 μ M	47,53 $\pm$ 2,31	0,8497
0,5 + 1 μ M	46,00 $\pm$ 2,22	0,8673
1 + 1 μ M	45,32 $\pm$ 0,52	0,8319



Şekil 3.29. Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) #p<0,00001.

Çizelge 3.18. Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI).

Konsantrasyon	Ortalama ± SS	CI
0,01 + 10 µM	58,61 ± 4,39	0,4202
0,1 + 10 µM	57,85 ± 2,77	0,4062
0,25 + 10 µM	56,27 ± 0,83	0,3773
0,5 + 10 µM	56,12 ± 2,47	0,3802
1 + 10 µM	55,79 ± 1,49	0,3849



Şekil 3.30. Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) #p<0,00001.

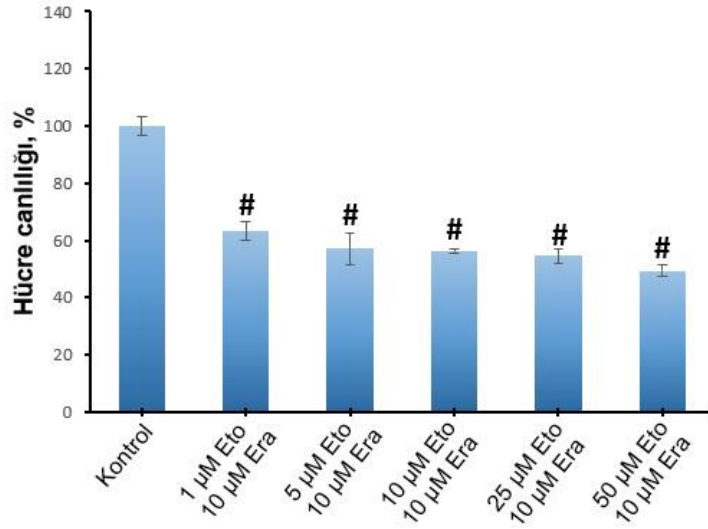
3.1.7. Etopozidin Erastin ile Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarına etopozidin tüm dozları ile 10 μ M erastin kombinasyonu uygulanmış ve 24.saatte elde edilen veriler Çizelge 3.19 ve Çizelge 3.21’de gösterilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde ise etopozidin tüm dozları 1 μ M erastin ile kombinasyon halinde uygulanmış, elde edilen hücre canlılık değerleri Çizelge 3.20’de verilmiştir. Ayrıca sinerjik etki olup olmadığının tayin edilmesi amacıyla kombinasyon indeks (CI) değerleri hesaplanmış ve elde edilen değerler ilgili tablolarda belirtilmiştir. Buna göre, MCF-7 hücrelerinde etopozid ve erastin kombinasyonlarının tüm dozlarında sinerjik etki görülmüştür ($CI < 1$) (Şekil 3.31). Buna karşın, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde hiçbir dozda sinerjik etki tespit edilmemiştir ($CI > 1$) (Şekil 3.32, Şekil 3.33).

Çalışmanın devamında MCF-7 hücrelerinde sinerjinin görüldüğü en düşük doz olan 1+10 μ M kombinasyonunun uygulanması kararlaştırılmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinde sinerji görülmemesi nedeniyle bu hücrelerle etopozid çalışmasına devam edilmemiştir.

Çizelge 3.19. Etopozid ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI).

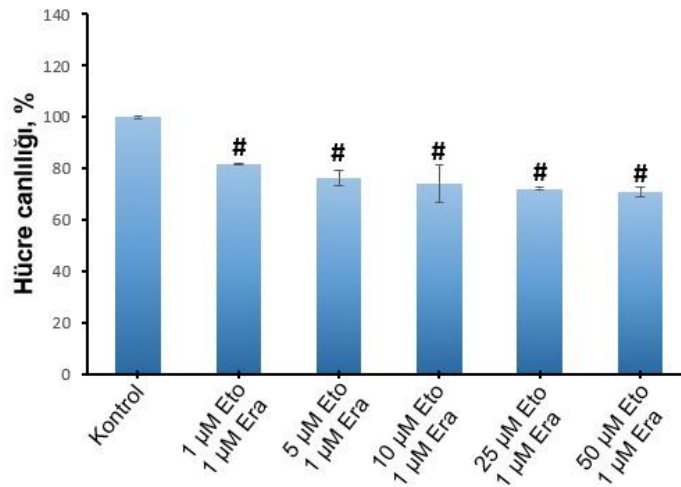
Konsantrasyon	Ortalama $\pm$ SS	CI
1 + 10 μ M	63,42 $\pm$ 3,26	0,5393
5 +10 μ M	57,10 $\pm$ 5,55	0,4707
10 +10 μ M	56,06 $\pm$ 0,75	0,5193
25 + 10 μ M	54,50 $\pm$ 2,52	0,6862
50 + 10 μ M	49,26 $\pm$ 2,07	0,8880



Şekil 3.31. Etopozid ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) #p<0,00001.

Çizelge 3.20. Etopozid ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI).

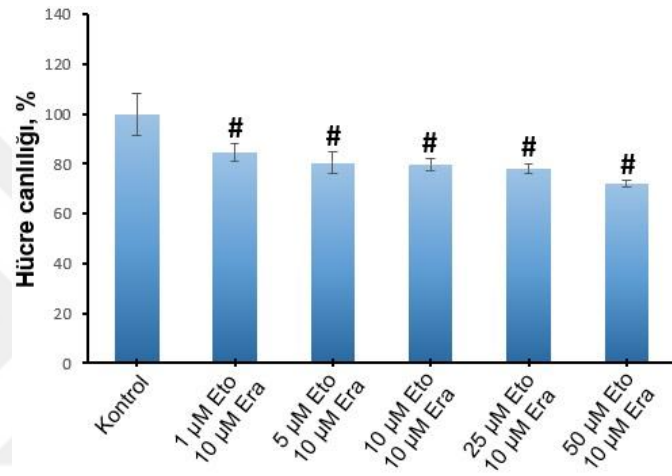
Konsantrasyon	Ortalama ± SS	CI
1 + 1 µM	81,70 ± 0,14	1,1609
5 + 1 µM	76,10 ± 2,97	1,1733
10 + 1 µM	74,15 ± 7,21	1,2547
25 + 1 µM	72,10 ± 0,42	1,5295
50 + 1 µM	70,70 ± 1,84	1,9829



Şekil 3.32. Etopozid ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) #p<0,00001.

Çizelge 3.21. Etopozid ve erastin kombinasyonunun MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (%) ve kombinasyon indeks değerleri (CI).

Konsantrasyon	Ortalama $\pm$ SS	CI
1 + 10 μ M	81,69 $\pm$ 3,53	1,8429
5 +10 μ M	80,45 $\pm$ 4,15	1,7185
10 +10 μ M	79,63 $\pm$ 2,27	1,6774
25 + 10 μ M	77,91 $\pm$ 1,86	1,6557
50 + 10 μ M	72,15 $\pm$ 1,45	1,3563



Şekil 3.33. Etopozid ve erastin kombinasyonunun MCF-10A hücre canlılığı üzerindeki etkisi (24.saat) #p<0,00001.

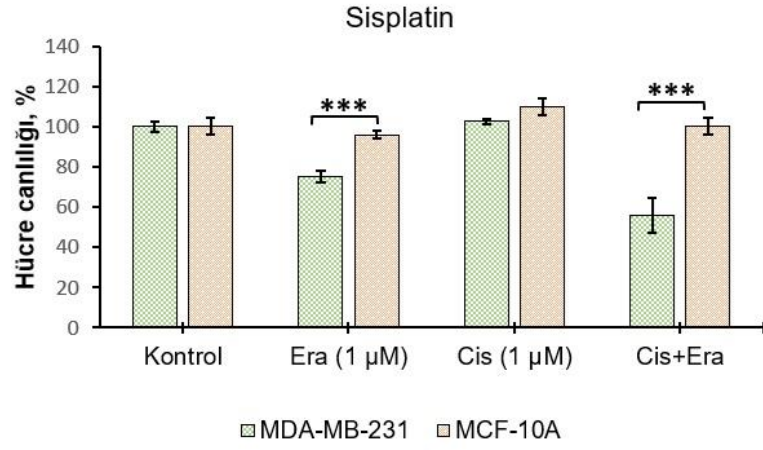
3.1.8. Kemoterapötik Uygulamaların Kanser Hücreleri ve Sağlıklı Hücrelerdeki Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması

Tez çalışmasının devamında uygulanması kararlaştırılan kemoterapötik dozlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ile sağlıklı MCF-10A meme dokusu hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri ilgili grafiklerde karşılaştırılmıştır. MDA-MB-231 hücrelerine uygulanması kararlaştırılan 1 μ M sisplatin ile 1 μ M erastinin tekli ve kombinasyon halinde MCF-10A hücrelerine uygulanmasıyla elde edilen hücre canlılık değerlerine ait karşılaştırmalı grafik Şekil 3.34'te gösterilmiştir. Buna göre, sisplatin ve erastin kombinasyonu MCF-10A hücrelerine uygulandığında, hücre canlılık değerleri kontrol grubuna kıyasla %100,38

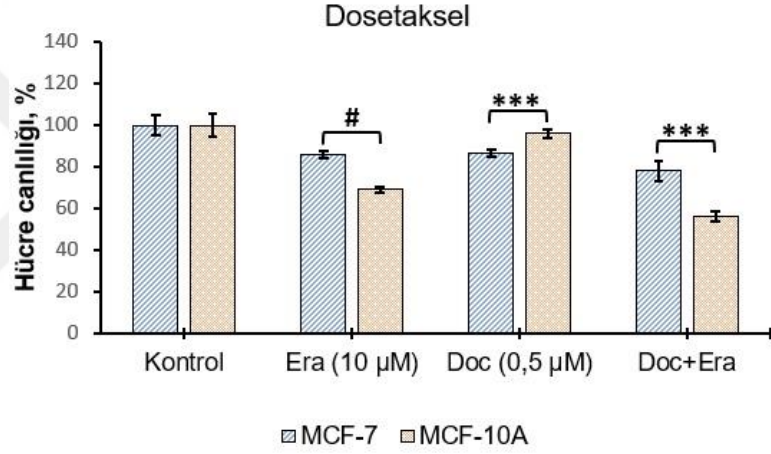
$\pm 4,18$ olarak ölçülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinde ise bu değer $\%56,04 \pm 8,81$ olarak tespit edilmiştir. Bu bağlamda MCF-10A hücrelerinde anlamlı oranda daha az sitotoksik etki gözlenmiştir ($p<0,05$).

MCF-7 hücrelerine uygulanması kararlaştırılan $0,5 \mu\text{M}$ dosetaksel ile $10 \mu\text{M}$ erastinin tekli ve kombinasyon halinde MCF-10A hücrelerine uygulanmasıyla elde edilen hücre canlılık değerlerine ait karşılaştırmalı grafik Şekil 3.35'te gösterilmiştir. Buna göre, dosetaksel ile erastin tekli olarak veya kombinasyon halinde uygulandığında her iki hücre hattında sitotoksik etki görülmüştür. Ancak kombinasyon uygulamasının MCF-10A hücrelerinde anlamlı düzeyde daha fazla sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). Kombinasyon uygulaması sonucu MCF-7 hücrelerinden elde edilen hücre canlılık değeri $\%78,10 \pm 4,75$ iken, MCF-10A'dan elde edilen canlılık değeri $\%56,12 \pm 2,47$ olarak tespit edilmiştir. Buna karşın, MDA-MB-231 hücrelerine uygulanması kararlaştırılan $0,1 \mu\text{M}$ dosetaksel ile $1 \mu\text{M}$ erastin MCF-10A hücrelerine uygulandığında, bu hücrelerde anlamlı oranda daha az sitotoksik etki tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.36). Kombinasyon uygulaması sonucu elde edilen hücre canlılık değerleri MDA-MB-231 hücreleri için $\%49,78 \pm 2,21$ iken, MCF-10A hücreleri için bu değer $\%84,13 \pm 1,70$ olarak ölçülmüştür.

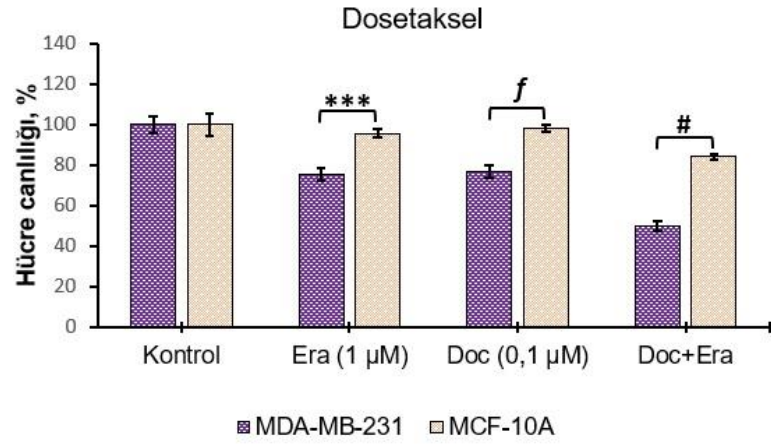
MCF-7 hücrelerine uygulanması kararlaştırılan $1 \mu\text{M}$ etopozid ile $10 \mu\text{M}$ erastinin tekli ve kombinasyon halinde MCF-10A hücrelerine uygulanmasıyla elde edilen hücre canlılık değerlerine ait karşılaştırmalı grafik Şekil 3.37'de gösterilmiştir. Buna göre, etopozid ile erastin kombinasyonu MCF-10A hücrelerine uygulandığında her iki hücre hattında sitotoksik etki görülmüştür. Ancak kombinasyon uygulamasının MCF-10A hücrelerinde anlamlı düzeyde daha az sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). Kombinasyon uygulaması sonucu MCF-7 hücrelerinden elde edilen hücre canlılık değeri $\%63,42 \pm 3,26$ iken, MCF-10A'dan elde edilen canlılık değeri $\%81,69 \pm 3,53$ olarak tespit edilmiştir.



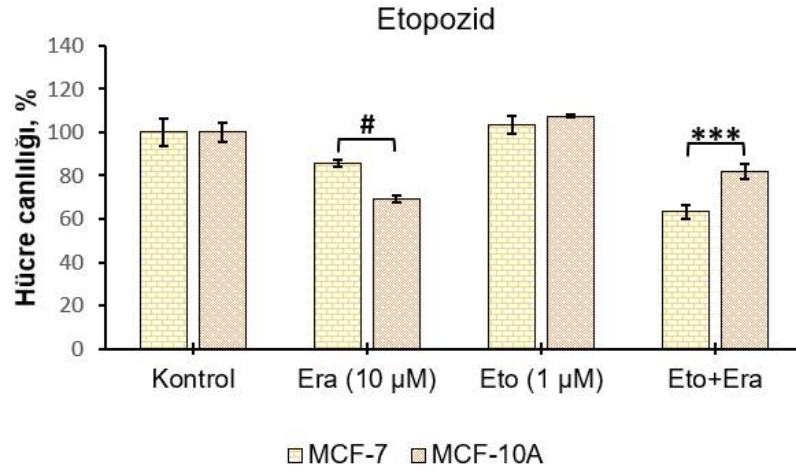
Şekil 3.34. Sisplatin ve erastin uygulamalarının MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri üzerindeki etkisinin karşılaştırılması *** $p < 0,001$.



Şekil 3.35. Dosetaksel ve erastin uygulamalarının MCF-7 ve MCF-10A hücreleri üzerindeki etkisinin karşılaştırılması *** $p < 0,001$, # $p < 0,00001$.



Şekil 3.36. Dosetaksel ve erastin uygulamalarının MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri üzerindeki etkisinin karşılaştırılması *** $p < 0,001$, # $p < 0,00001$.

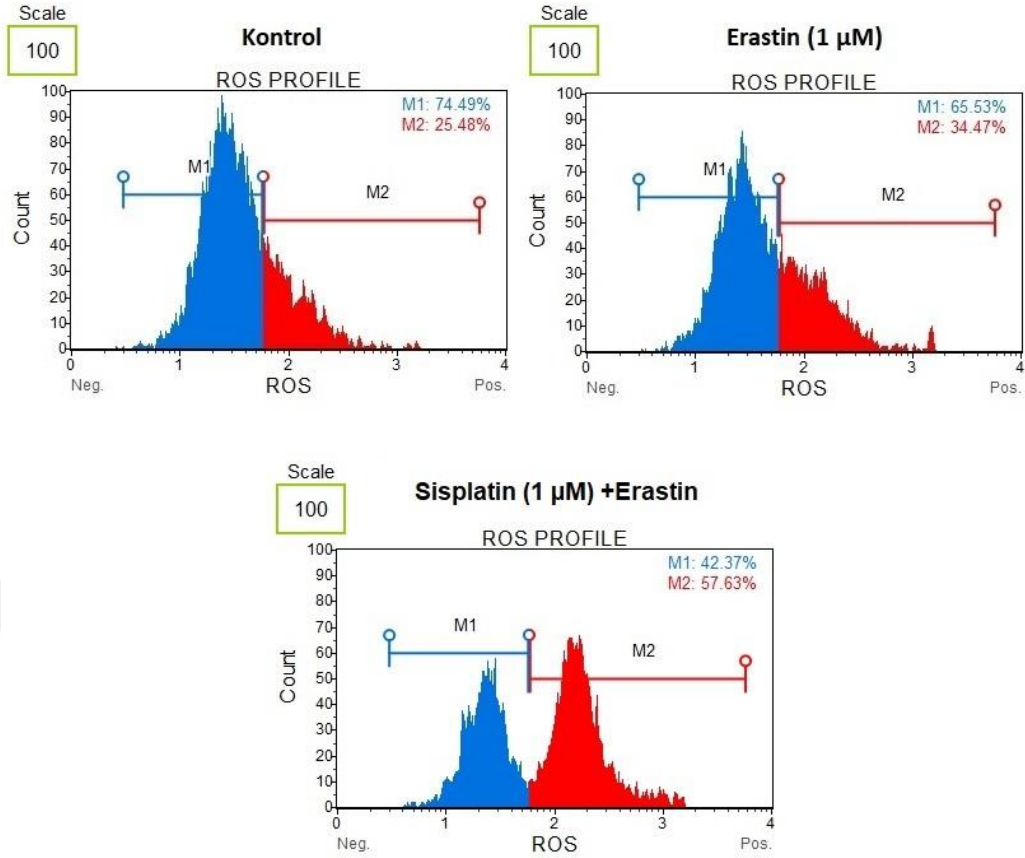


Şekil 3.37. Etopozid ve erastin uygulamalarının MCF-7 ve MCF-10A hücreleri üzerindeki etkisinin karşılaştırılması ***p<0,001, #p<0,00001.

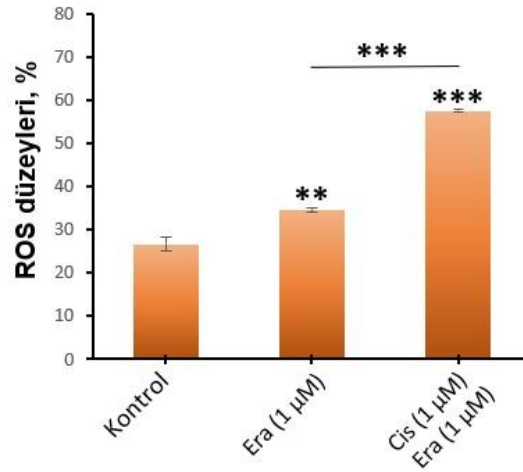
3.2.Oksidatif Stres Tayini Deney Sonuçları

3.2.1.Sisplatin ve Erastin Kombinasyonunun Oksidatif Stres Üzerindeki Etkileri

Çalışmanın devamında MDA-MB-231 hücrelerinde sisplatin ve erastin kombinasyonunun hücre içi oksidatif stres üzerindeki etkileri Muse Oxidative Stress Assay Kit kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen plotlar Şekil 3.38’de gösterilmektedir. Sayısal veriler % olarak Şekil 3.39’da grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre, ölçülen ROS miktarı kontrol grubunda $26,57 \pm 1,53$, erastinin uygulandığı hücrelerde ROS miktarı $34,47 \pm 0,37$, sisplatin ve erastin kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde ise bu miktar $57,43 \pm 0,28$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla her iki uygulama da ROS miktarını anlamlı oranda arttırmıştır ($p<0,05$). Ancak kombinasyon uygulamasının erastine kıyasla daha yüksek oranda ROS miktarını arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).



Şekil 3.38. MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen ROS düzeylerinin gösterimi. M1 ROS(-) hücre popülasyonunu, M2 ise ROS(+) hücre popülasyonunu ifade etmektedir.

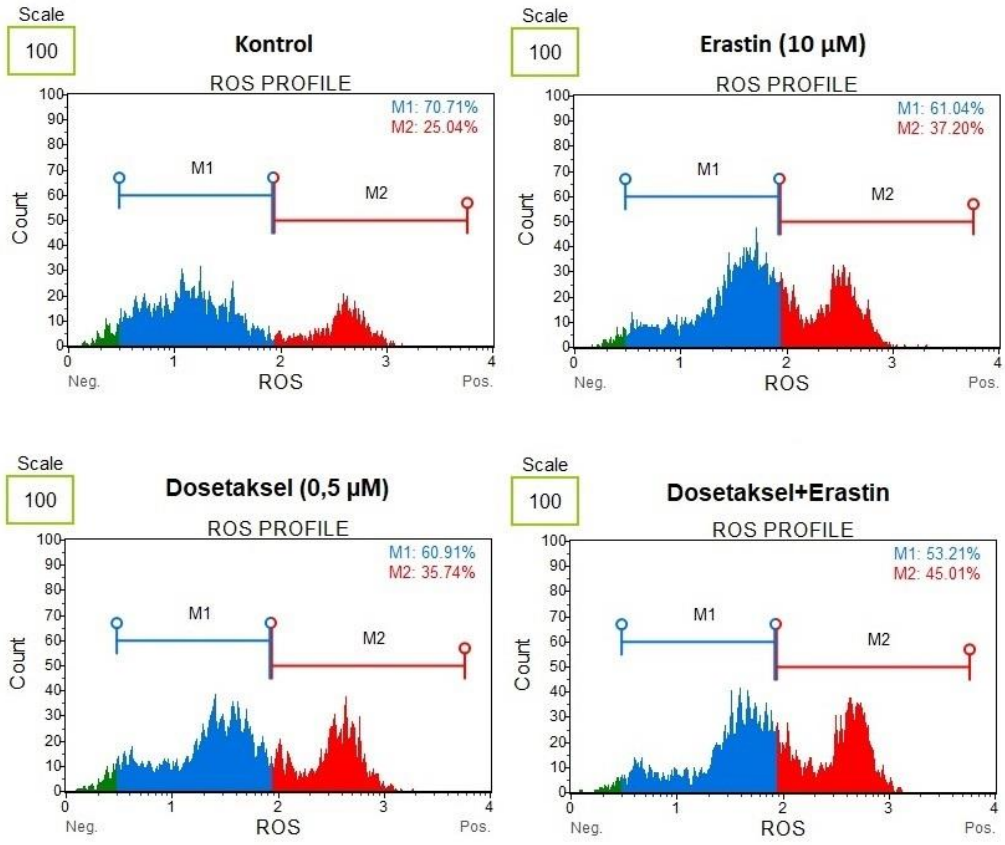


Şekil 3.39. MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen ROS düzeylerinin grafiksel gösterimi
p<0,01, *p<0,001.

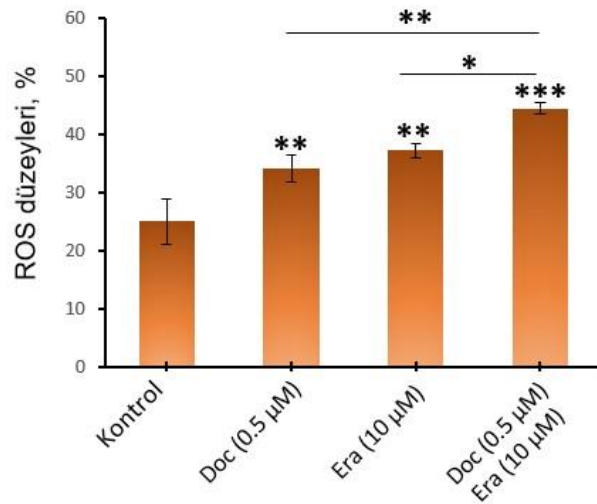
3.2.2.Dosetaksel ve Erastin Kombinasyonunun Oksidatif Stres Üzerindeki Etkileri

MCF-7 hücrelerinde dosetaksel ve erastin kombinasyonunun hücre içi oksidatif stres üzerindeki etkileri Muse Oxidative Stress Assay Kit kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen plotlar Şekil 3.40'da gösterilmektedir. Sayısal veriler % olarak Şekil 3.41'de grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre, ölçülen ROS miktarı kontrol grubunda $25,04 \pm 3,89$, erastinin uygulandığı hücrelerde ROS miktarı $37,20 \pm 1,26$, dosetakselin uygulandığı hücrelerde $34,05 \pm 2,39$, dosetaksel ve erastin kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde ise bu miktar $44,32 \pm 0,98$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla her üç uygulama da ROS miktarını anlamlı oranda arttırmıştır ($p < 0,05$). Ancak kombinasyon uygulamasının erastin ve dosetaksele kıyasla daha yüksek oranda ROS miktarını arttırdığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

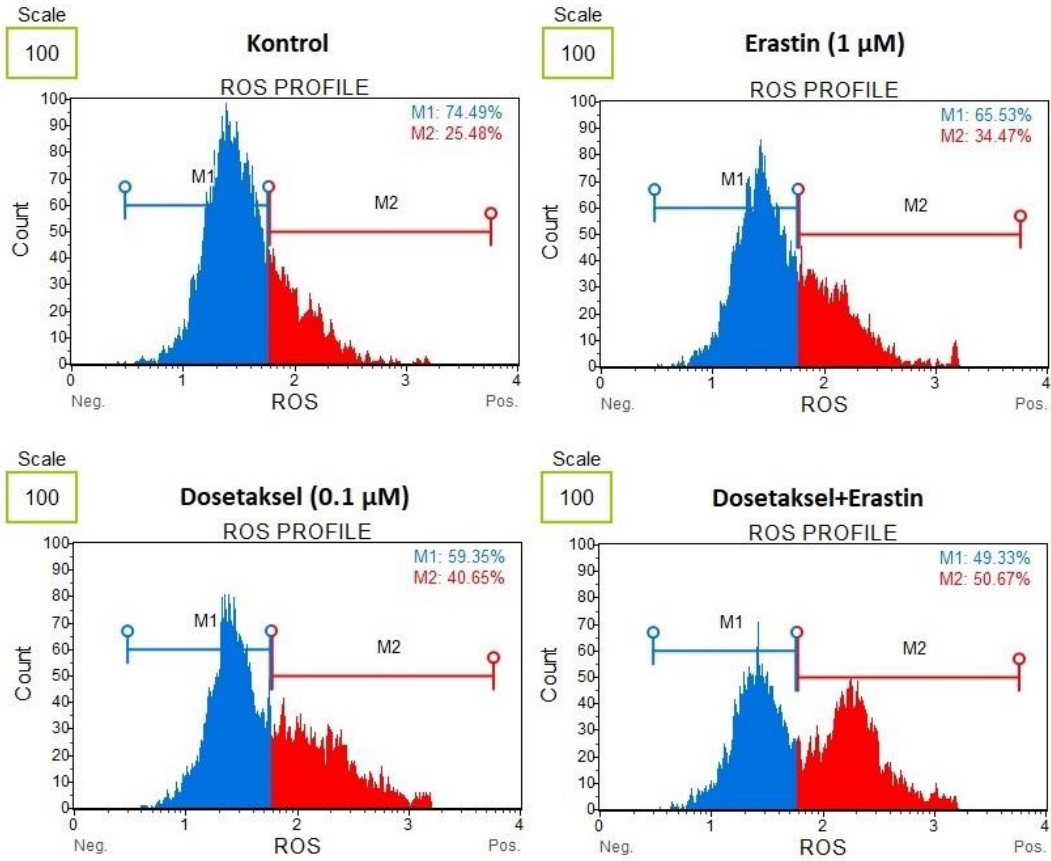
MDA-MB-231 hücrelerinden ölçülen değerler ise kontrol grubunda $26,57 \pm 1,53$, erastinin uygulandığı hücre grubunda $34,47 \pm 0,37$, dosetakselin uygulandığı hücre grubunda $40,65 \pm 0,25$, dosetaksel ve erastin kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde ise bu miktar $50,42 \pm 0,35$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.42). MCF-7 hücrelerine benzer şekilde, kontrol grubuna kıyasla tüm uygulamalar hücre içi ROS miktarını anlamlı düzeyde arttırmıştır. Ancak kombinasyon uygulaması sonucunda tekli uygulamalara kıyasla daha yüksek oranda ROS gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 3.43).



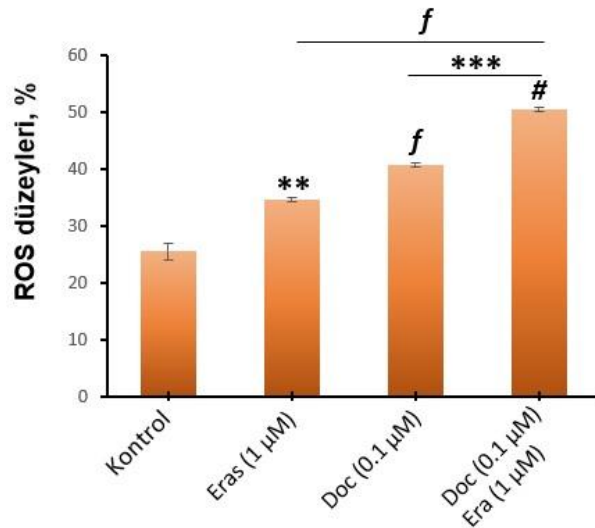
Şekil 3.40. MCF-7 hücrelerinde tespit edilen ROS düzeylerinin gösterimi. M1 ROS(-) hücre popülasyonunu, M2 ise ROS(+) hücre popülasyonunu ifade etmektedir.



Şekil 3.41. MCF-7 hücrelerinde tespit edilen ROS düzeylerinin grafiksel gösterimi *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.



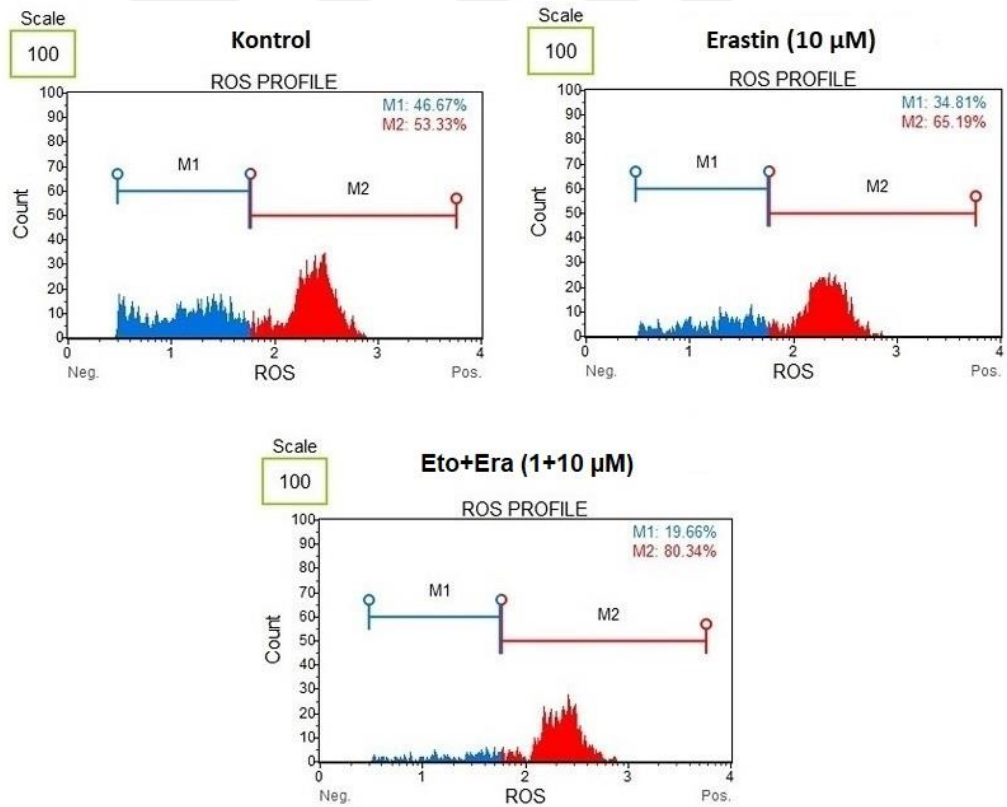
Şekil 3.42. MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen ROS düzeylerinin gösterimi. M1 ROS(-) hücre popülasyonunu, M2 ise ROS(+) hücre popülasyonunu ifade etmektedir.



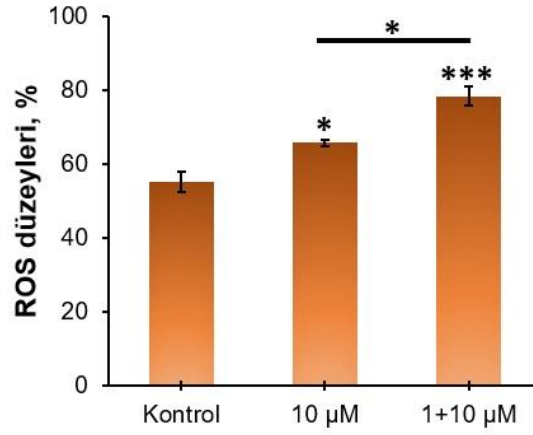
Şekil 3.43. MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen ROS düzeylerinin grafiksel gösterimi
 ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, *f* $p < 0,0001$, # $p < 0,00001$.

3.2.3.Etopozid ve Erastin Kombinasyonunun Oksidatif Stres Üzerindeki Etkileri

MCF-7 hücrelerinde etopozid ve erastin kombinasyonunun hücre içi oksidatif stres üzerindeki etkileri Muse Oxidative Stress Assay Kit kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen plotlar Şekil 3.44'te gösterilmektedir. Sayısal veriler % olarak Şekil 3.45'te grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre, ölçülen ROS miktarı kontrol grubunda $55,31 \pm 2,79$, erastinin uygulandığı hücrelerde ROS miktarı $65,74 \pm 0,78$, etopozid ve erastin kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde ise bu miktar $78,45 \pm 2,67$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla her iki uygulama da ROS miktarını anlamlı oranda arttırmıştır ($p<0,05$). Ancak kombinasyon uygulamasının erastine kıyasla daha yüksek oranda ROS miktarını arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).



Şekil 3.44. MCF-7 hücrelerinde tespit edilen ROS düzeylerinin gösterimi. M1 ROS(-) hücre popülasyonunu, M2 ise ROS(+) hücre popülasyonunu ifade etmektedir.

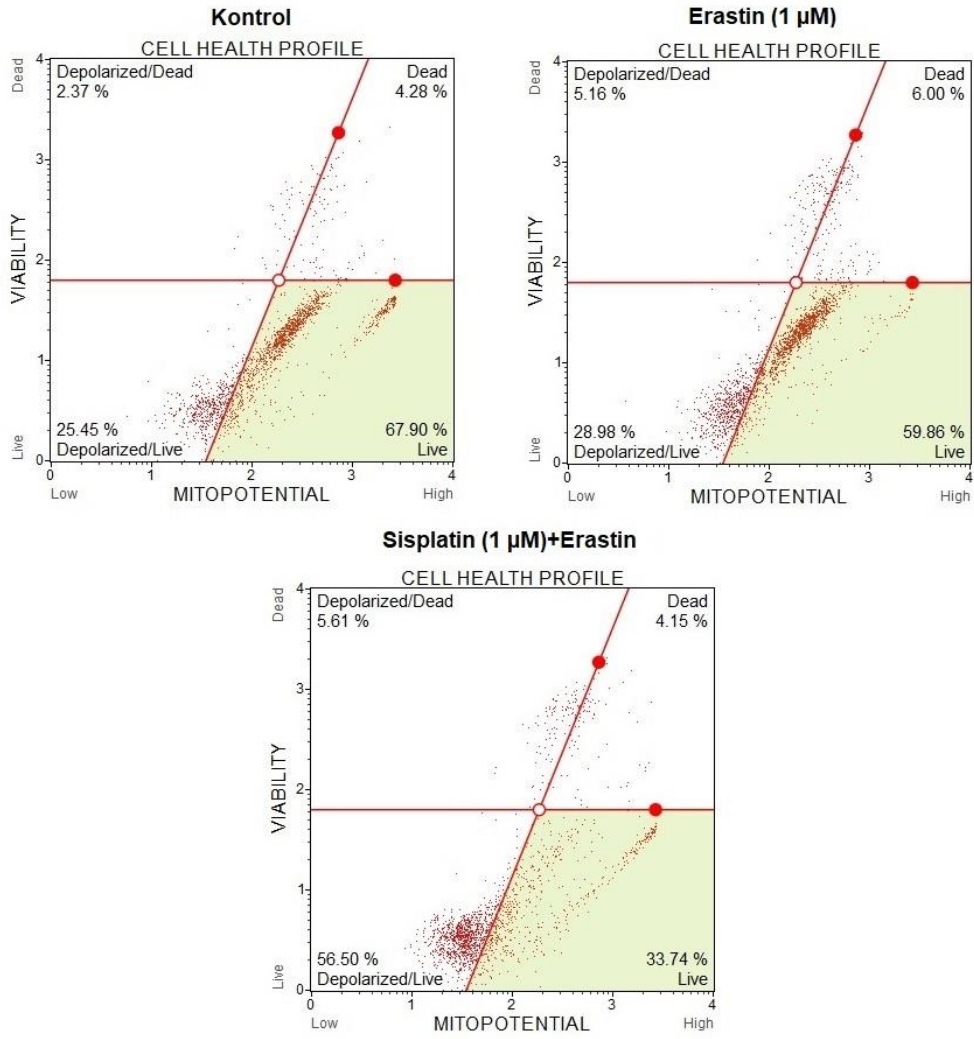


Şekil 3.45. MCF-7 hücrelerinde tespit edilen ROS düzeylerinin gösterimi * $p<0,05$, *** $p<0,001$.

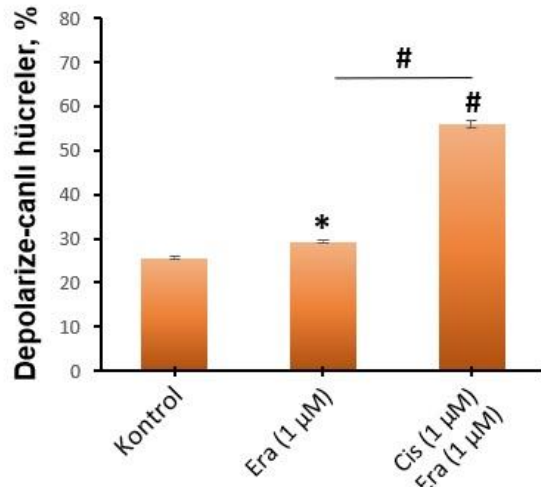
3.3.Mitokondriyal Membran Potansiyeli Ölçüm Sonuçları

3.3.1.Sisplatin ve Erastin Kombinasyonunun Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerindeki Etkileri

MDA-MB-231 hücrelerinde sisplatin ve erastin kombinasyonunun mitokondriyal membran potansiyeli üzerindeki etkileri Muse Mitopotential Assay Kit kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen plotlar Şekil 3.46’da gösterilmektedir. Sayısal veriler % olarak Şekil 3.47’de grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre, mitokondri membranında depolarizasyonun görüldüğü canlı hücre popülasyonu kontrol grubunda $25,64 \pm 0,26$, erastinin uygulandığı hücrelerde $29,27 \pm 0,41$, sisplatin ve erastin kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde ise bu miktar $55,95 \pm 0,78$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla her iki uygulama da mitokondri membran depolarizasyonunu anlamlı oranda arttırmıştır ($p<0,05$). Ancak kombinasyon uygulamasının erastine kıyasla daha yüksek oranda arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).



Şekil 3.46. MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen mitokondriyel membran potansiyeli ölçüm sonuçları. Plotlar canlı, depolarize-canlı, depolarize-ölü ve ölü hücre popülasyonlarını belirtmektedir.

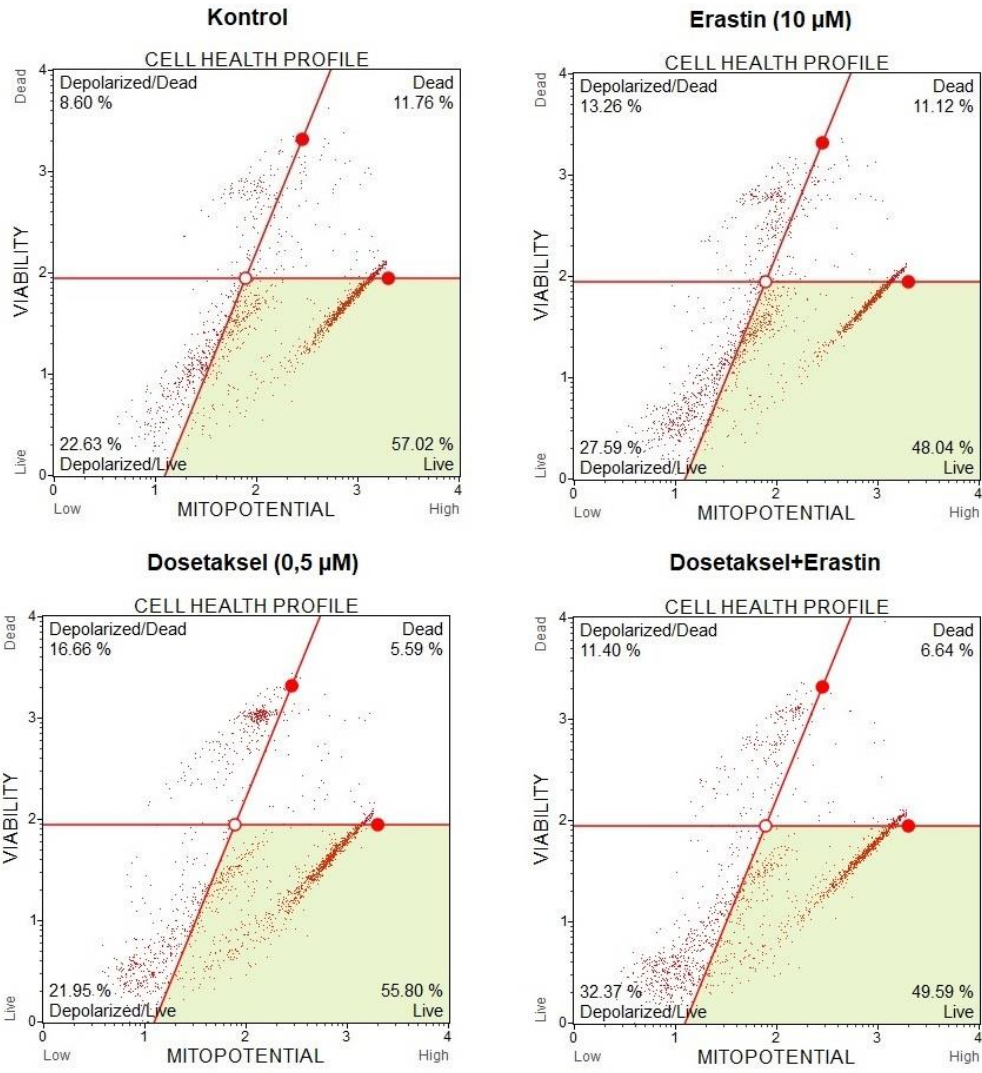


Şekil 3.47. MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen depolarize-canlı hücre popülasyonunun grafiksel gösterimi * $p < 0,05$, # $p < 0,00001$.

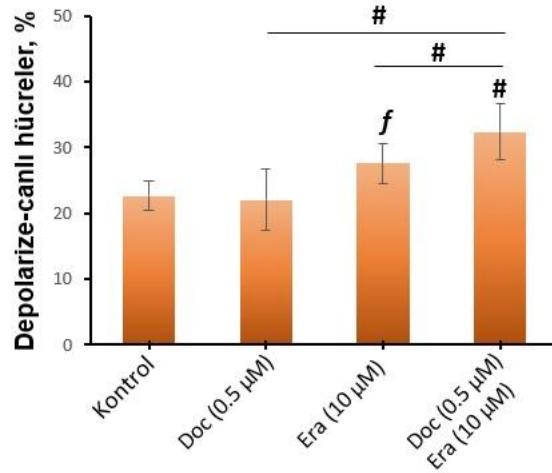
3.3.2.Dosetaksel ve Erastin Kombinasyonunun Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerindeki Etkileri

MCF-7 hücrelerinde dosetaksel ve erastin kombinasyonunun mitokondriyal membran potansiyeli üzerindeki etkileri Muse Mitopotential Assay Kit kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen plotlar Şekil 3.48’de gösterilmektedir. Sayısal veriler % olarak Şekil 3.49’da grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre, mitokondri membran depolarizasyonunun görüldüğü canlı hücre popülasyonu kontrol grubunda $22,63 \pm 2,24$, erastinin uygulandığı hücrelerde $27,59 \pm 3,05$, dosetakselin uygulandığı hücrelerde $21,95 \pm 4,67$, dosetaksel ve erastin kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde ise bu miktar $32,37 \pm 4,24$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla dosetaksel uygulamasında anlamlı bir etki gözlenmemiştir ($p>0,05$). Buna karşın, erastin ile kombinasyon uygulamalarında mitokondri membran depolarizasyonunun anlamlı oranda arttığı görülmüştür ($p<0,05$). Ayrıca kombinasyon uygulamasının erastin ve dosetaksele kıyasla depolarize canlı hücre sayısını daha yüksek oranda arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

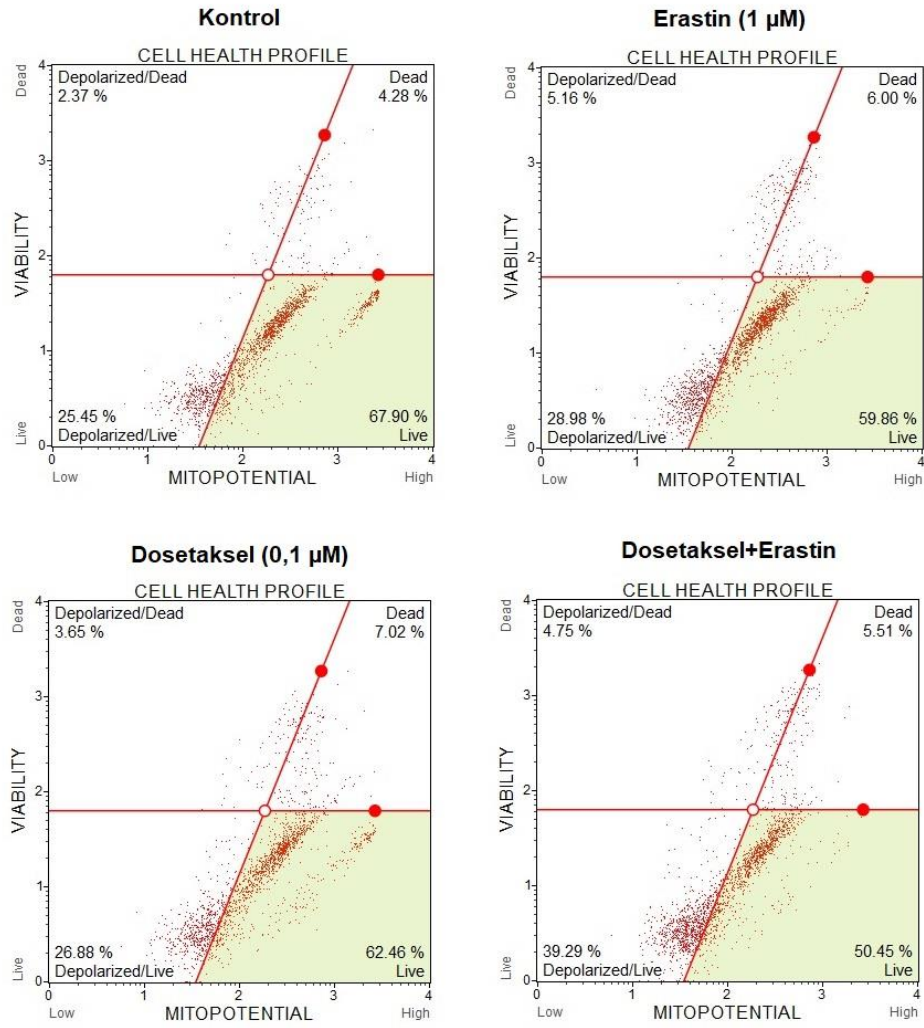
MDA-MB-231 hücrelerinde yapılan ölçümlerde, mitokondri membran depolarizasyonunun görüldüğü canlı hücre popülasyonu kontrol grubunda $25,64 \pm 0,26$, erastinin uygulandığı hücrelerde $29,27 \pm 0,41$, dosetakselin uygulandığı hücrelerde $26,45 \pm 0,62$, dosetaksel ve erastin kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde ise bu miktar $37,94 \pm 1,92$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.50). Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla dosetaksel uygulamasında anlamlı bir etki gözlenmemiştir ($p>0,05$). Buna karşın, erastin ile kombinasyon uygulamalarında mitokondri membran depolarizasyonunun anlamlı oranda arttığı görülmüştür ($p<0,05$). Ayrıca kombinasyon uygulamasının erastin ve dosetaksele kıyasla depolarize canlı hücre sayısını daha yüksek oranda arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.51).



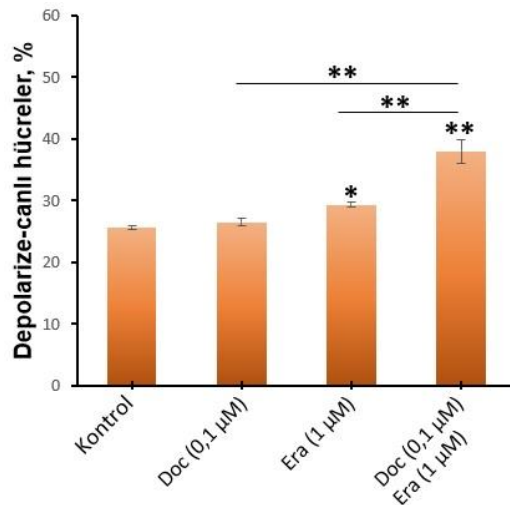
Şekil 3.48. MCF-7 hücrelerinde tespit edilen mitokondriyel membran potansiyeli ölçüm sonuçları. Plotlar canlı, depolarize-canlı, depolarize-ölü ve ölü hücre popülasyonlarını belirtmektedir.



Şekil 3.49. MCF-7 hücrelerinde tespit edilen depolarize-canlı hücre popülasyonunun grafiksel gösterimi $f_p < 0,0001$, $\#p < 0,00001$.



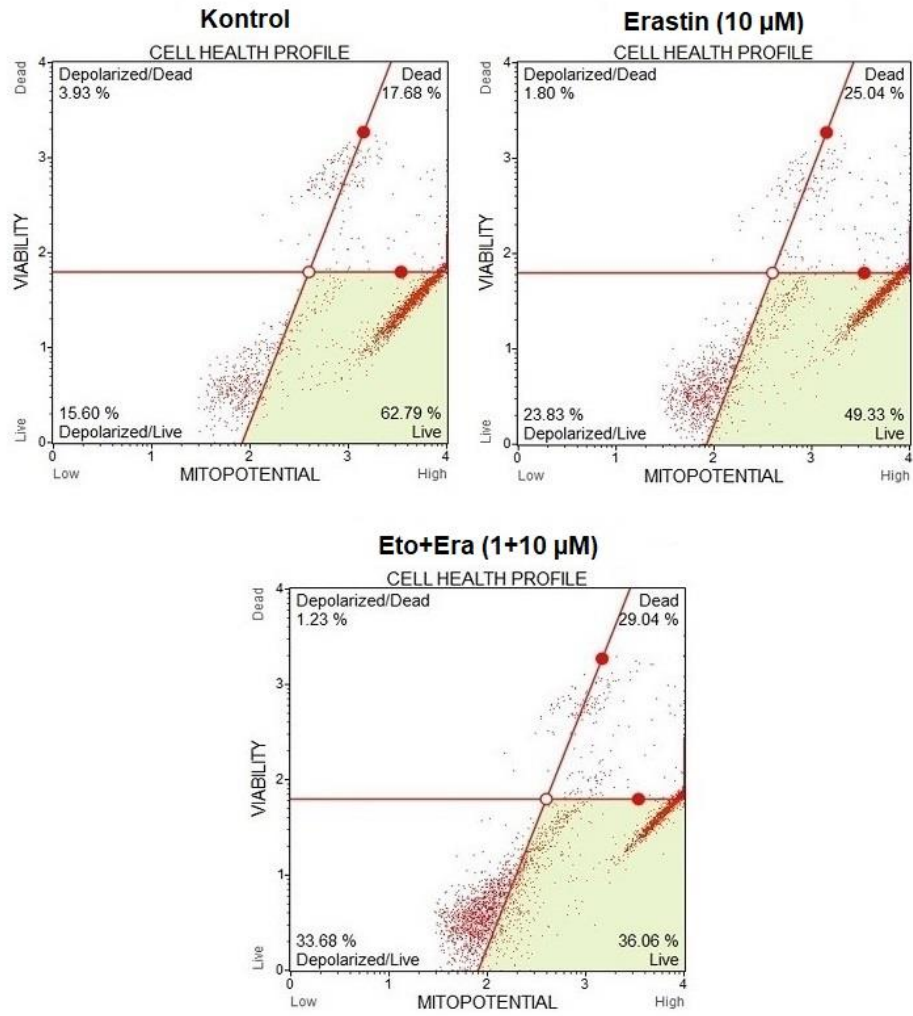
Şekil 3.50. MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen mitokondriyel membran potansiyeli ölçüm sonuçları. Plotlar canlı, depolarize-canlı, depolarize-ölü ve ölü hücre popülasyonlarını belirtmektedir.



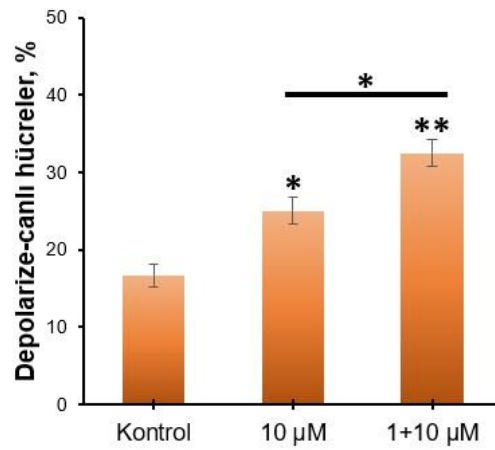
Şekil 3.51. MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen depolarize-canlı hücre popülasyonunun grafiksel gösterimi *p<0,05, **p<0,01.

3.3.3.Etopozid ve Erastin Kombinasyonunun Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerindeki Etkileri

MCF-7 hücrelerinde etopozid ve erastin kombinasyonunun mitokondriyal membran potansiyeli üzerindeki etkileri Muse Mitopotential Assay Kit kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen plotlar Şekil 3.52’de gösterilmektedir. Sayısal veriler % olarak Şekil 3.53’te grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre, mitokondri membranında depolarizasyonun görüldüğü canlı hücre popülasyonu kontrol grubunda $16,63 \pm 1,46$, erastinin uygulandığı hücrelerde $25,06 \pm 1,74$, etopozid ve erastin kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde ise bu miktar $32,45 \pm 1,74$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla erastin ve kombinasyon uygulamalarında mitokondri membran depolarizasyonunun anlamlı oranda arttığı görülmüştür ($p<0,05$). Ayrıca kombinasyon uygulamasının erastine göre depolarize canlı hücre sayısını daha yüksek oranda arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).



Şekil 3.52. MCF-7 hücrelerinde tespit edilen mitokondriyel membran potansiyeli ölçüm sonuçları. Plotlar canlı, depolarize-canlı, depolarize-ölü ve ölü hücre popülasyonlarını belirtmektedir.



Şekil 3.53. MCF-7 hücrelerinde tespit edilen depolarize-canlı hücre popülasyonunun grafiksel gösterimi * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

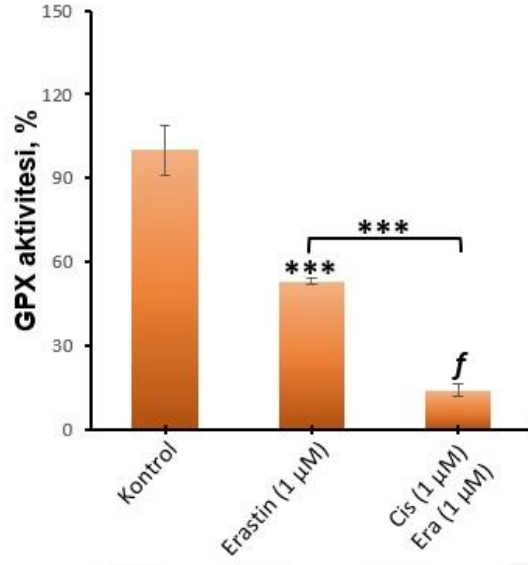
3.4.Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Deney Sonuçları

3.4.1.Sisplatin ve Erastin Kombinasyonunun Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkileri

MDA-MB-231 hücrelerinde sisplatin ve erastin kombinasyonunun glutatyon peroksidaz (GPX) enzim aktivitesi üzerindeki etkileri GPX Assay Kit kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen aktivite değerleri Çizelge 3.22’de gösterilmektedir. Sayısal veriler % olarak Şekil 3.54’te grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre, glutatyon peroksidaz aktivitesi kontrol grubuna kıyaslandığında, erastinin uygulandığı hücrelerde $52,91 \pm 1,04$, sisplatin ve erastin kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde ise $13,95 \pm 2,20$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla her iki uygulamada da glutatyon peroksidaz aktivitesi anlamlı oranda azalmıştır ($p<0,05$). Ancak kombinasyon uygulamasının erastine kıyasla daha güçlü şekilde enzim aktivitesini baskıladığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 3.22. Sisplatin ve erastinin uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen GPX aktivite düzeyleri (%).

Ortalama $\pm$ Standart Sapma	
Kontrol	$100 \pm 8,83$
Erastin	$52,91 \pm 1,04$
Sisplatin + Erastin	$13,95 \pm 2,20$



Şekil 3.54. Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde GPX aktivitesi üzerindeki etkisi *** $p < 0,001$, $f_p < 0,0001$.

3.4.2. Dosetaksel ve Erastin Kombinasyonunun Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkileri

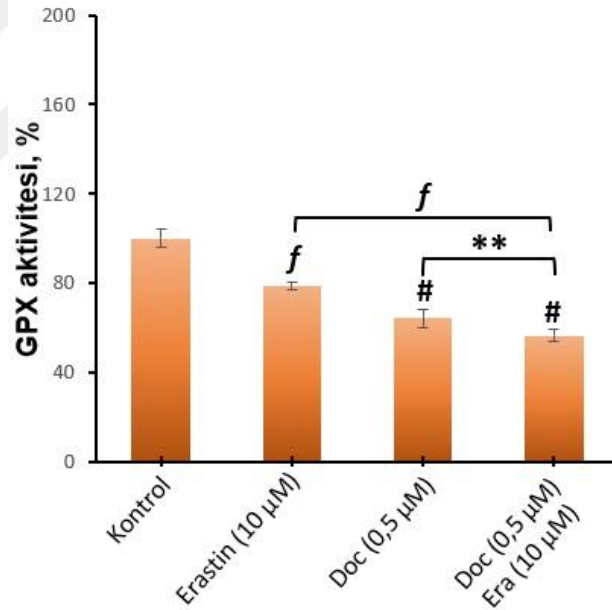
MCF-7 hücrelerinde dosetaksel ve erastin kombinasyonunun glutasyon peroksidaz (GPX) enzim aktivitesi üzerindeki etkileri GPX Assay Kit kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen aktivite değerleri Çizelge 3.23'te gösterilmektedir. Sayısal veriler % olarak Şekil 3.55'te grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre, glutasyon peroksidaz aktivitesi kontrol grubuna kıyaslandığında, erastinin uygulandığı hücrelerde $78,44 \pm 1,63$, dosetakselin uygulandığı hücrelerde $61,48 \pm 4,09$, dosetaksel ve erastin kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde ise $58,41 \pm 2,86$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla tüm uygulamalarda glutasyon peroksidaz aktivitesi anlamlı oranda azalmıştır ($p < 0,05$). Ancak kombinasyon uygulamasının erastine ve dosetaksele kıyasla daha güçlü şekilde enzim aktivitesini baskıladığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

MDA-MB-231 hücrelerinde ölçülen glutasyon peroksidaz aktivitesi ise kontrol grubuna kıyaslandığında, erastinin uygulandığı hücrelerde $52,91 \pm 1,04$, dosetakselin uygulandığı hücrelerde $48,98 \pm 3,17$, dosetaksel ve erastin kombinasyonunun

uygulandığı hücrelerde ise $32,63 \pm 3,48$ olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.24). Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla tüm uygulamalarda glutatyon peroksidaz aktivitesi anlamlı oranda azalmıştır ($p<0,05$). Ancak kombinasyon uygulamasının erastin ve dosetaksele kıyasla daha güçlü şekilde enzim aktivitesini baskıladığı tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.56).

Çizelge 3.23. Dosetaksel ve erastinin uygulandığı MCF-7 hücrelerinden elde edilen GPX aktivite düzeyleri (%).

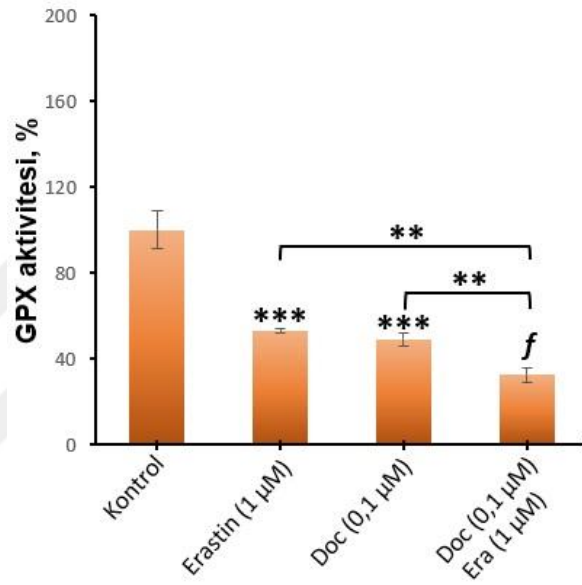
	Ortalama $\pm$ Standart Sapma
Kontrol	$100 \pm 4,04$
Erastin	$78,44 \pm 1,63$
Dosetaksel	$61,48 \pm 4,09$
Dosetaksel + Erastin	$58,41 \pm 2,86$



Şekil 3.55. Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinde GPX aktivitesi üzerindeki etkisi ** $p<0,01$, $f p<0,0001$, # $p<0,00001$.

Çizelge 3.24. Dosetaksel ve erastinin uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen GPX aktivite düzeyleri (%).

Ortalama ± Standart Sapma	
Kontrol	100 ± 8,83
Erastin	52,91 ± 1,04
Dosetaksel	48,98 ± 3,17
Dosetaksel + Erastin	32,63 ± 3,48



Şekil 3.56. Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde GPX aktivitesi üzerindeki etkisi **p<0,01, ***p<0,001, fp<0,0001.

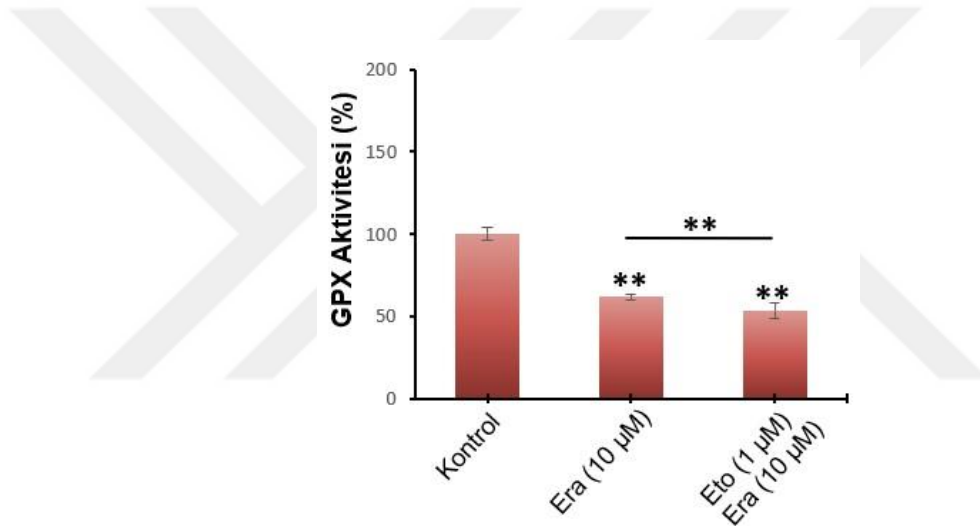
3.4.3.Etopozid ve Erastin Kombinasyonunun Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkileri

MCF-7 hücrelerinde etopozid ve erastin kombinasyonunun glutasyon peroksidaz (GPX) enzim aktivitesi üzerindeki etkileri GPX Assay Kit kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen aktivite değerleri Çizelge 3.25'te gösterilmektedir. Sayısal veriler % olarak Şekil 3.57'de grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre, glutasyon peroksidaz aktivitesi kontrol grubuna kıyaslandığında, erastinin uygulandığı hücrelerde %61,66 ± 1,49, etopozid ve erastin kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde ise %53,16 ± 4,94 olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre,

kontrol grubuna kıyasla her iki uygulamada da glutasyon peroksidaz aktivitesi anlamlı oranda azalmıştır ($p<0,05$). Ancak kombinasyon uygulamasının erastine kıyasla daha güçlü şekilde enzim aktivitesini baskıladığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 3.25. Etopozid ve erastinin uygulandığı MCF-7 hücrelerinden elde edilen GPX aktivite düzeyleri (%).

	Ortalama $\pm$ Standart Sapma
Kontrol	100 $\pm$ 4,04
Erastin	61,66 $\pm$ 1,49
Etopozid + Erastin	53,16 $\pm$ 4,94



Şekil 3.57. Etopozid ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinde GPX aktivitesi üzerindeki etkisi ** $p<0,01$.

3.5.Hücre içi Glutasyon Düzeyleri Ölçüm Sonuçları

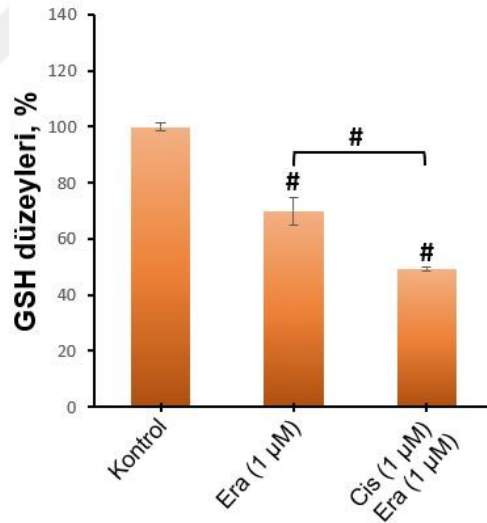
3.5.1.Sisplatin ve Erastin Kombinasyonunun Hücre içi Glutasyon Düzeyleri Üzerindeki Etkileri

MDA-MB-231 hücrelerinde sisplatin ve erastin kombinasyonunun glutasyon (GSH) düzeyleri üzerindeki etkileri kolorimetrik bir yöntem kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen değerler % olarak Çizelge 3.26’da gösterilmektedir. Şekil 3.58’de ise

grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre, GSH düzeyleri kontrol grubuna kıyaslandığında, erastinin uygulandığı hücrelerde $69,86 \pm 4,97$, sisplatin ve erastin kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde ise $49,24 \pm 0,66$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla her iki uygulamada da GSH düzeyleri anlamlı oranda azalmıştır ($p < 0,05$). Ancak kombinasyon uygulamasının erastine kıyasla GSH düzeylerini daha güçlü şekilde baskıladığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Çizelge 3.26. Sisplatin ve erastinin uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen GSH düzeyleri (%).

	Ortalama $\pm$ Standart Sapma
Kontrol	$100 \pm 1,22$
Erastin	$69,86 \pm 4,97$
Sisplatin + Erastin	$49,24 \pm 0,66$



Şekil 3.58. Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde GSH düzeyleri üzerindeki etkisi # $p < 0,00001$.

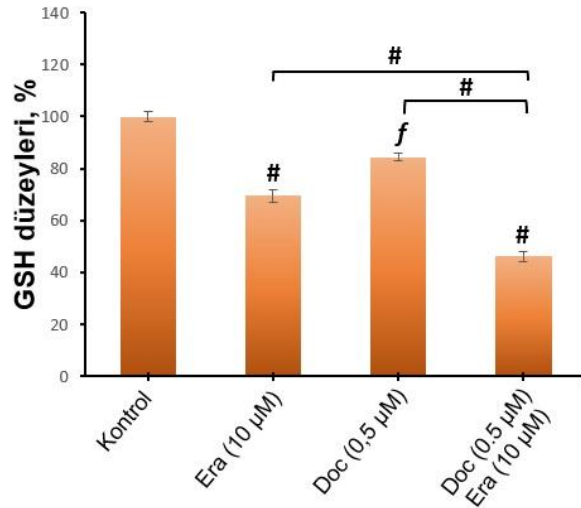
3.5.2.Dosetaksel ve Erastin Kombinasyonunun Hücre İçi Glutatyon Düzeyleri Üzerindeki Etkileri

MCF-7 hücrelerinde dosetaksel ve erastin kombinasyonunun GSH düzeyleri üzerindeki etkileri % olarak Çizelge 3.27’de gösterilmektedir. Şekil 3.59’da ise grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre, GSH düzeyleri kontrol grubuna kıyaslandığında, erastinin uygulandığı hücrelerde $69,50 \pm 2,32$, dosetakselin uygulandığı hücrelerde $84,40 \pm 1,33$, kombinasyonun uygulandığı hücrelerde ise $46,12 \pm 2,01$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla tüm uygulamalarda GSH düzeyleri anlamlı oranda azalmıştır ($p<0,05$). Ancak kombinasyon uygulamasının tekli uygulamalara kıyasla GSH düzeylerini daha güçlü şekilde baskıladığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

MDA-MB-231 hücrelerinde dosetaksel ve erastin kombinasyonunun GSH düzeyleri üzerindeki etkileri % olarak Çizelge 3.28’de gösterilmektedir. Şekil 3.60’da ise grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre, GSH düzeyleri kontrol grubuna kıyaslandığında, erastinin uygulandığı hücrelerde $69,86 \pm 4,97$, dosetakselin uygulandığı hücrelerde $82,70 \pm 3,29$, kombinasyonun uygulandığı hücrelerde ise $64,54 \pm 1,65$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla tüm uygulamalarda GSH düzeyleri anlamlı oranda azalmıştır ($p<0,05$). Ancak kombinasyon uygulamasının tekli uygulamalara kıyasla GSH düzeylerini daha güçlü şekilde baskıladığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 3.27. Dosetaksel ve erastinin uygulandığı MCF-7 hücrelerinden elde edilen GSH düzeyleri (%).

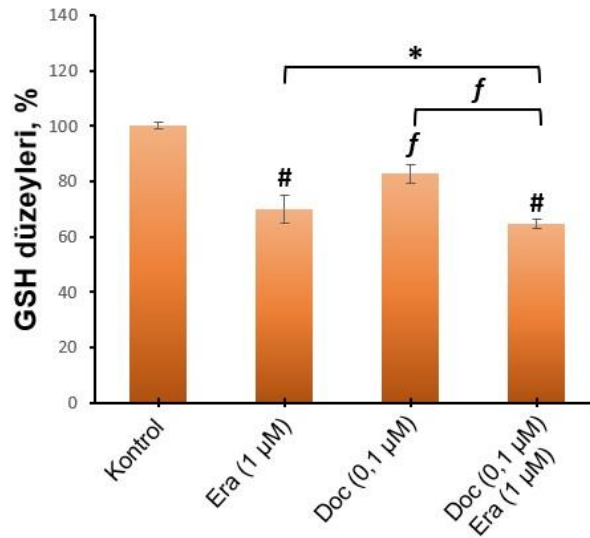
	Ortalama $\pm$ Standart Sapma
Kontrol	$100 \pm 2,01$
Erastin	$69,50 \pm 2,32$
Dosetaksel	$84,40 \pm 1,33$
Dosetaksel + Erastin	$46,12 \pm 2,01$



Şekil 3.59. Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinde GSH düzeyleri üzerindeki etkisi $f_p < 0,0001$, $\#p < 0,00001$.

Çizelge 3.28. Dosetaksel ve erastinin uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen GSH düzeyleri (%).

Ortalama ± Standart Sapma	
Kontrol	100 ± 1,22
Erastin	69,86 ± 4,97
Dosetaksel	82,70 ± 3,29
Dosetaksel + Erastin	64,54 ± 1,65



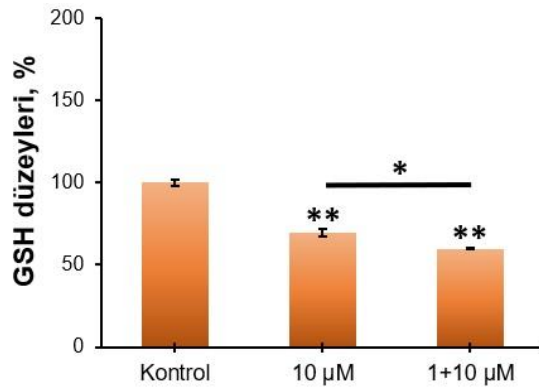
Şekil 3.60. Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde GSH düzeyleri üzerindeki etkisi $*p < 0,05$, $f_p < 0,0001$, $\#p < 0,00001$.

3.5.3.Etopozid ve Erastin Kombinasyonunun Hücre İçi Glutatyon Düzeyleri Üzerindeki Etkileri

MCF-7 hücrelerinde etopozid ve erastin kombinasyonunun GSH düzeyleri üzerindeki etkileri % olarak Çizelge 3.29’da gösterilmektedir. Şekil 3.61’de ise grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre, GSH düzeyleri kontrol grubuna kıyaslandığında, erastinin uygulandığı hücrelerde $69,50 \pm 2,32$, erastin ile etopozid kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde ise $59,96 \pm 0,13$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla iki uygulamada da GSH düzeyleri anlamlı oranda azalmıştır ($p<0,05$). Ancak kombinasyon uygulamasının tekli uygulamalara kıyasla GSH düzeylerini daha güçlü şekilde baskıladığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 3.29. Etopozid ve erastinin uygulandığı MCF-7 hücrelerinden elde edilen GSH düzeyleri (%).

Ortalama $\pm$ Standart Sapma	
Kontrol	$100 \pm 2,01$
Erastin	$69,50 \pm 2,32$
Etopozid + Erastin	$59,96 \pm 0,13$



Şekil 3.61. Etopozid ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinde GSH düzeyleri üzerindeki etkisi * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

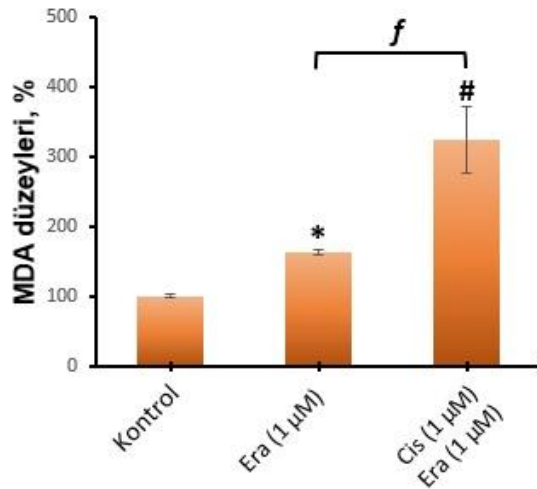
3.6.Lipid Peroksidasyonu Tayini Deney Sonuçları

3.6.1.Sisplatin ve Erastin Kombinasyonunun Lipid Peroksidasyonu Üzerindeki Etkileri

MDA-MB-231 hücrelerinde sisplatin ve erastin kombinasyonunun lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyleri üzerindeki etkileri MDA tayin kiti kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen değerler % olarak Çizelge 3.30’da gösterilmektedir. Şekil 3.62’de ise grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre, MDA düzeyleri kontrol grubuna kıyaslandığında, erastinin uygulandığı hücrelerde $162,63 \pm 3,69$, sisplatin ve erastin kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde ise $323,45 \pm 48,15$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla her iki uygulamada da MDA düzeyleri anlamlı oranda artmıştır ($p<0,05$). Ancak kombinasyon uygulamasının erastine kıyasla daha güçlü şekilde artırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 3.30. MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen MDA düzeyleri (%).

Ortalama $\pm$ Standart Sapma	
Kontrol	$100 \pm 2,07$
Erastin	$162,63 \pm 3,69$
Sisplatin + Erastin	$323,45 \pm 48,15$



Şekil 3.62. Sisplatin ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde MDA düzeyleri üzerindeki etkisi * $p<0,05$, $f p<0,0001$, # $p<0,00001$.

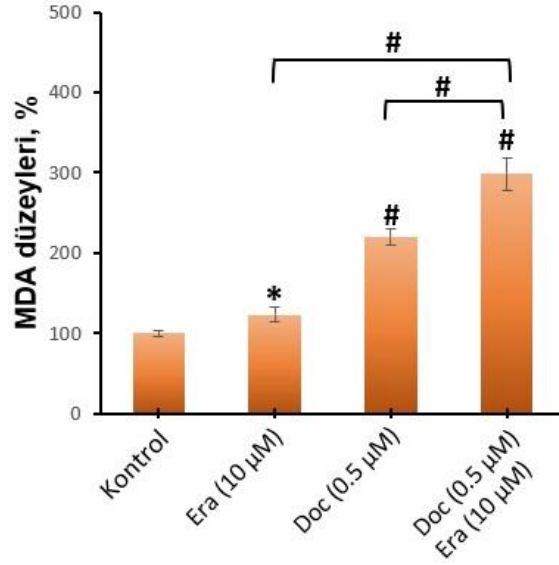
3.6.2.Dosetaksel ve Erastin Kombinasyonunun Lipid Peroksidasyonu Üzerindeki Etkileri

MCF-7 hücrelerinde dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MDA düzeyleri üzerindeki etkileri % olarak Çizelge 3.31’de gösterilmektedir. Şekil 3.63’te ise grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre, MDA düzeyleri kontrol grubuna kıyaslandığında, erastinin uygulandığı hücrelerde $123,36 \pm 9,06$, dosetakselin uygulandığı hücrelerde $219,30 \pm 10,26$, kombinasyonun uygulandığı hücrelerde ise $298,11 \pm 20,31$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla tüm uygulamalarda MDA düzeyleri anlamlı oranda artmıştır ($p<0,05$). Ancak kombinasyon uygulamasının tekli uygulamalara kıyasla daha güçlü şekilde arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

MDA-MB-231 hücrelerinde dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MDA düzeyleri üzerindeki etkileri % olarak Çizelge 3.32’de gösterilmektedir. Şekil 3.64’te ise grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre, MDA düzeyleri kontrol grubuna kıyaslandığında, erastinin uygulandığı hücrelerde $162,63 \pm 3,69$, dosetakselin uygulandığı hücrelerde $142,09 \pm 25,59$, kombinasyonun uygulandığı hücrelerde ise $229,62 \pm 34,10$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla tüm uygulamalarda MDA düzeyleri anlamlı oranda artmıştır ($p<0,05$). Ancak kombinasyon uygulamasının tekli uygulamalara kıyasla daha güçlü şekilde arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 3.31. Dosetaksel ve erastinin uygulandığı MCF-7 hücrelerinden elde edilen MDA düzeyleri (%).

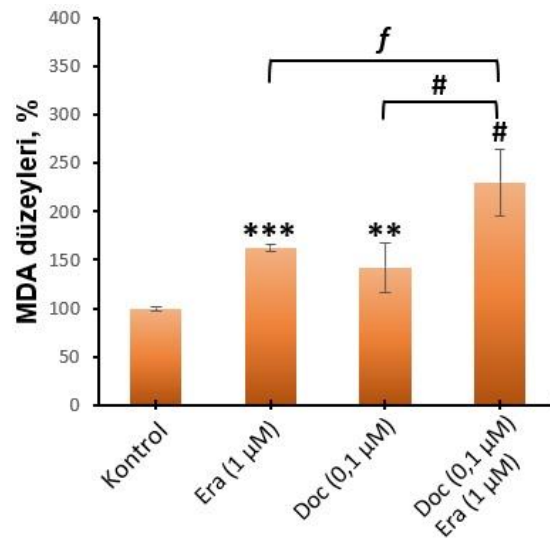
Ortalama ± Standart Sapma	
Kontrol	100 ± 3,54
Erastin	123,36 ± 9,06
Dosetaksel	219,30 ± 10,26
Dosetaksel + Erastin	298,11 ± 20,31



Şekil 3.63. Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinde MDA düzeyleri üzerindeki etkisi * $p < 0,05$, # $p < 0,00001$.

Çizelge 3.32. Dosetaksel ve erastinin uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen MDA düzeyleri (%).

Ortalama ± Standart Sapma	
Kontrol	100 ± 2,07
Erastin	162,63 ± 3,69
Dosetaksel	142,09 ± 25,59
Dosetaksel + Erastin	229,62 ± 34,10



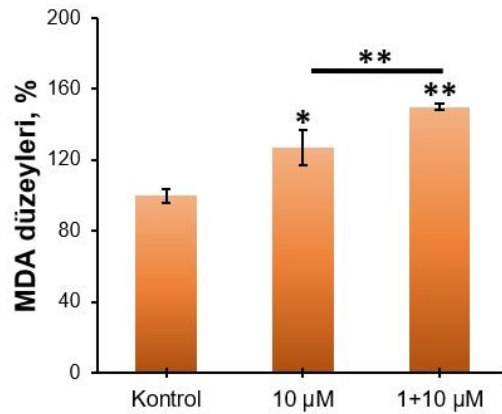
Şekil 3.64. Dosetaksel ve erastin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde MDA düzeyleri üzerindeki etkisi ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $f p < 0,0001$, # $p < 0,00001$.

3.6.3.Etopozid ve Erastin Kombinasyonunun Lipid Peroksidasyonu Üzerindeki Etkileri

MCF-7 hücrelerinde etopozid ve erastin kombinasyonunun MDA düzeyleri üzerindeki etkileri % olarak Çizelge 3.33’de gösterilmektedir. Şekil 3.65’te ise grafiksel olarak ifade edilmiştir. Buna göre, MDA düzeyleri kontrol grubuna kıyaslandığında, erastinin uygulandığı hücrelerde $127,14 \pm 10,10$, erastin ile etopozid kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde ise $150 \pm 2,02$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre, kontrol grubuna kıyasla iki uygulamada da MDA düzeyleri anlamlı oranda artmıştır ($p<0,05$). Ancak kombinasyon uygulamasının tekli uygulamalara kıyasla daha güçlü şekilde artırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 3.33. MCF-7 hücrelerinden elde edilen MDA düzeyleri (%).

Ortalama $\pm$ Standart Sapma	
Kontrol	$100 \pm 10,10$
Erastin	$127,14 \pm 10,10$
Etopozid + Erastin	$150 \pm 2,02$

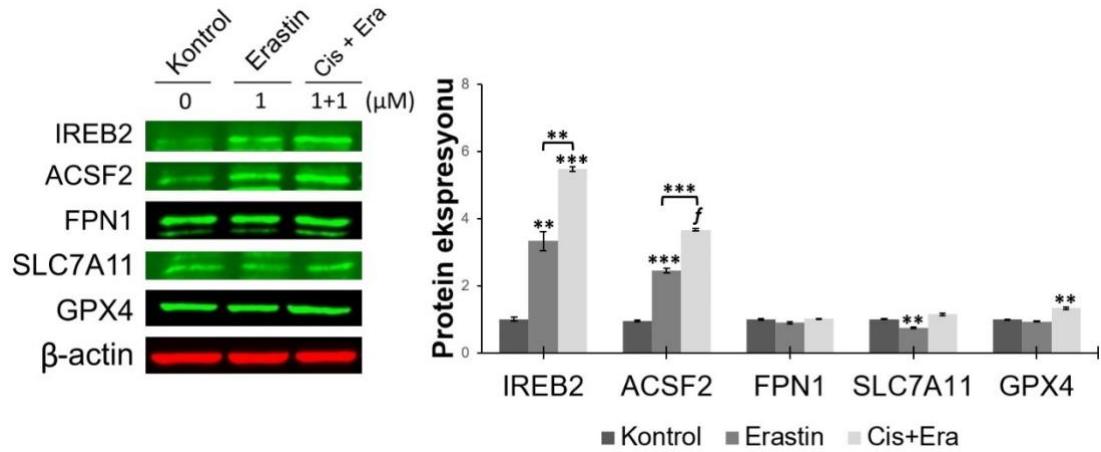


Şekil 3.65. Etopozid ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinde MDA düzeyleri üzerindeki etkisi * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

3.7. Ferroptotik Protein Ekspresyonu Analiz Sonuçları

3.7.1. Sisplatin ve Erastin Kombinasyonunun Ferroptotik Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

MDA-MB-231 hücrelerinde sisplatin ve erastin kombinasyonunun ferroptotik protein ekspresyonu üzerindeki etkisi western blot yöntemi ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar görsel ve grafiksel olarak Şekil 3.66'da gösterilmiştir. Buna göre, hücre içi demir düzeylerinin regülasyonunda rol oynayan IREB2 protein ekspresyonu sisplatin ve erastin kombinasyonunun uygulanması sonucu erastin ile kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde artış göstermiştir ($p<0,05$). Buna karşın, FPN1 protein ekspresyonunda anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$). Lipid peroksidasyonunda rol alan ACSF2 protein ekspresyonu ise erastin ve kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde artış göstermiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte, hücre içi antioksidan sistem elemanlarından GPX4 ekspresyonu ile glutatyon üretiminden sorumlu SLC7A11 protein ekspresyonlarının kombinasyon uygulanması ile azalmadığı tespit edilmiştir (Şekil 3.66).

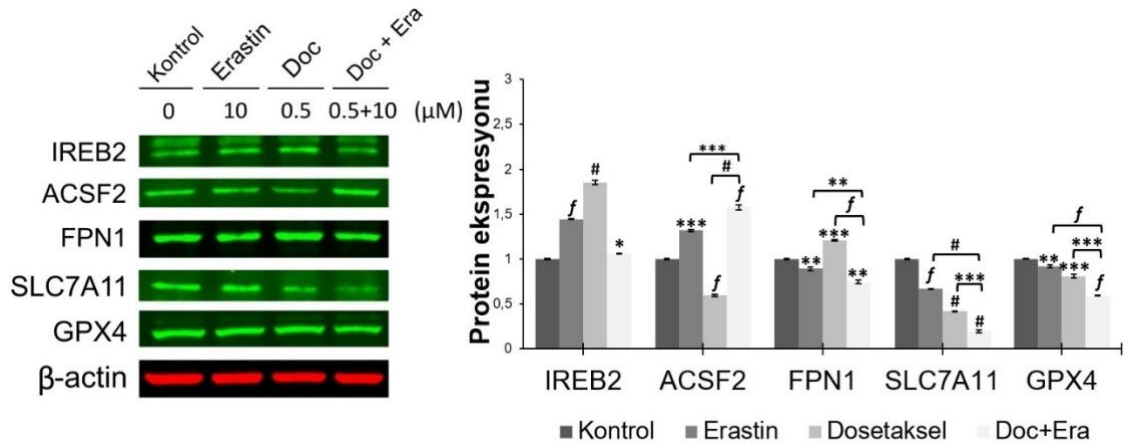


Şekil 3.66. MDA-MB-231 hücrelerinde sisplatin ve erastin kombinasyonunun ferroptotik proteinler üzerindeki etkisi ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

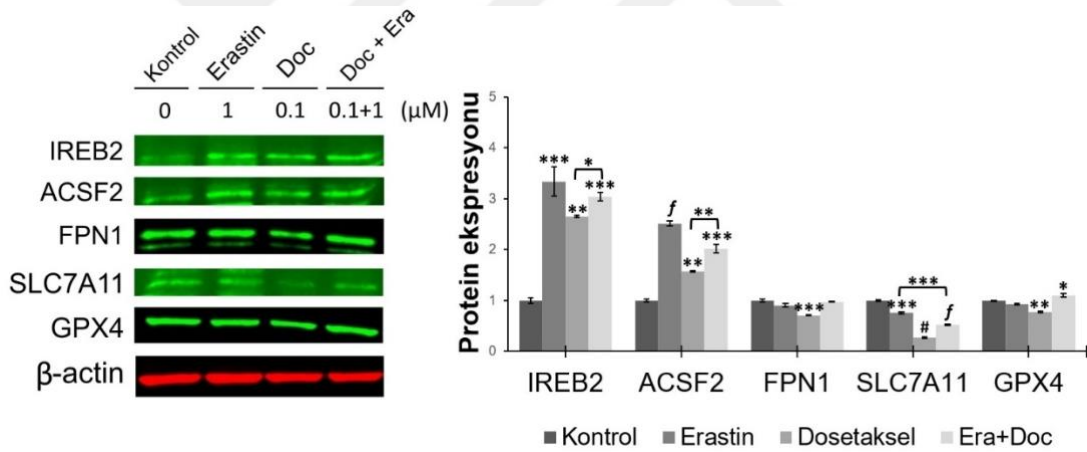
3.7.2. Dosetaksel ve Erastin Kombinasyonunun Ferroptotik Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

MCF-7 hücrelerinde dosetaksel ve erastin kombinasyonunun ferroptotik protein ekspresyonu üzerindeki etkisi western blot yöntemi ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar görsel ve grafiksel olarak Şekil 3.67’de gösterilmiştir. Buna göre, hücre içi demir düzeylerinin regülasyonunda rol oynayan IREB2 protein ekspresyonu, dosetaksel ve erastin uygulamaları ile kombinasyon uygulaması sonucu kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde artış göstermiştir ($p<0,05$). Ancak tekli uygulamalarda bu artış daha yüksek düzeyde görülmüştür. Buna paralel olarak, FPN1 protein ekspresyonu kombinasyon uygulamasında kontrol grubuna ve tekli uygulamalara kıyasla anlamlı oranda azalış göstermiştir ($p<0,05$). Lipid peroksidasyonunda rol alan ACSF2 protein ekspresyonu ise kombinasyon uygulamasında tekli uygulamalara ve kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde artış göstermiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte, hücre içi antioksidan sistem elemanlarından GPX4 ekspresyonu ile glutatyon üretiminden sorumlu SLC7A11 protein ekspresyonlarının kombinasyon uygulaması ile anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.67).

MDA-MB-231 hücrelerinde ise dosetaksel ve erastinin tekli ve kombinasyon şeklinde IREB2 protein ekspresyonunu kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde arttırdığı gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.68). Buna karşın, FPN1 protein ekspresyonunda kombinasyon uygulaması ile kontrol ve tekli uygulamalar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$). Lipid peroksidasyonunda rol alan ACSF2 protein ekspresyonu ise tüm uygulamalarda kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde artış göstermiştir ($p<0,05$). Kombinasyon uygulaması ile dosetaksel uygulaması arasında da anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte, hücre içi antioksidan sistem elemanlarından GPX4 ekspresyonunda azalma gözlenmezken, glutatyon üretiminden sorumlu SLC7A11 protein ekspresyonlarının kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.68).



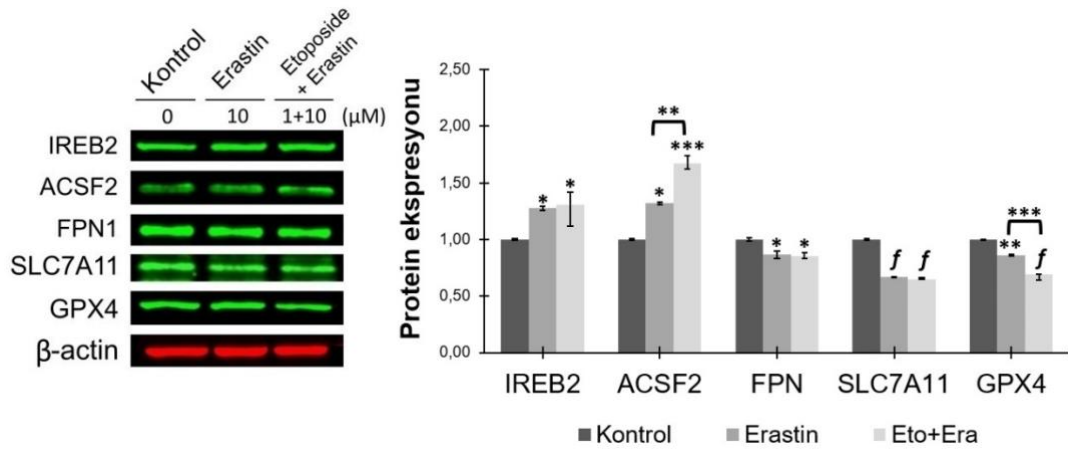
Şekil 3.67. MCF-7 hücrelerinde dosetaksel ve erastin kombinasyonunun ferroptotik proteinler üzerindeki etkisi * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $f p < 0,0001$, $\# p < 0,00001$.



Şekil 3.68. MDA-MB-231 hücrelerinde dosetaksel ve erastin kombinasyonunun ferroptotik proteinler üzerindeki etkisi * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $f p < 0,0001$, $\# p < 0,00001$.

3.7.3. Etopozid ve Erastin Kombinasyonunun Ferroptotik Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

MCF-7 hücrelerinde etopozid ve erastin kombinasyonunun ferroptotik protein ekspresyonu üzerindeki etkisi western blot yöntemi ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar görsel ve grafiksel olarak Şekil 3.69’da gösterilmiştir. Buna göre, hücre içi demir düzeylerinin regülasyonunda rol oynayan IREB2 protein ekspresyonu, etopozid ve erastin uygulamaları ile kombinasyon uygulaması sonucu kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde artış göstermiştir ($p<0,05$). Buna paralel olarak, FPN1 protein ekspresyonu kombinasyon uygulamasında kontrol grubuna kıyasla anlamlı oranda azalış göstermiştir ($p<0,05$). Lipid peroksidasyonunda rol alan ACSF2 protein ekspresyonu ise kombinasyon uygulamasında tekli uygulamalara ve kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde artış göstermiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte, hücre içi antioksidan sistem elemanlarından GPX4 ekspresyonu ile glutatyon üretiminden sorumlu SLC7A11 protein ekspresyonlarının kombinasyon uygulaması ile anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.69).



Şekil 3.69. MCF-7 hücrelerinde etopozid ve erastin kombinasyonunun ferroptotik proteinler üzerindeki etkisi * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, $f p<0,0001$.

4. TARTIŞMA

Kanser tedavisinde tümör hücrelerinin tamamen elimine edilebilmesi için etkin bir tedavi yaklaşımına ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde kullanılan antikanser ilaçların etkinliğini sınırlayan en önemli faktörler arasında ilaç direncinin gelişmesi ve/veya hastalığın bir süre sonra nüks etmesi yer almaktadır. Bunun temel sebebi, bazı kanser hücrelerinin çeşitli metabolik düzenlemeler aracılığıyla mevcut kemoterapötiklere karşı tolerans kazanabilmesidir. Genetik mutasyonlar, epitelial-mezenkimal dönüşüm, apoptotik yolların inaktivasyonu gibi düzenlemelerin yanı sıra, hücrelerin GPX4 aktivitesini ve GSH düzeylerini arttırarak antioksidan savunma sistemini desteklemesi de kanser tedavisinin yetersiz olmasına sebep olmaktadır (Bansal ve Simon, 2018; Housman ve ark., 2014). Bu noktada ferroptoz, hücrelerin antioksidan sistemini doğrudan hedef alan mekanizması nedeniyle kanser tedavisinde umut vadeden bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca apoptozdan farklı bir mekanizmaya sahip olması nedeniyle apoptotik yolların inaktif olduğu dirençli hücrelerde alternatif yollardan ölümün indüklenmesine olanak sağlamaktadır. Bu nedenle, son yıllarda ferroptozu konu alan çalışmalar kanser tedavisindeki potansiyeli nedeniyle dikkat çekmektedir. Çok sayıda araştırmacı, ferroptoz indüksiyonunun kanser hücrelerinde kemoterapiye karşı hassasiyeti arttırdığını bildirmiştir. Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, ferroptoz indükleyicisi olan erastinin glioblastoma hücrelerinde temozolomide karşı hassasiyeti arttırdığı tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2015). Benzer şekilde Gao ve arkadaşları ferroptoz indüksiyonunun over kanserinde çoklu ilaç direncine karşı etkili olduğunu rapor etmiştir (Gao ve ark., 2019).

Bu tez çalışmasında, yukarıdaki verilere paralel olarak, klinikte yaygın kullanılan kemoterapötiklerden sisplatin, dosetaksel ve etopozidin ferroptoz indüksiyonu üzerinden çeşitli meme kanseri hücrelerindeki etkinliklerinin arttırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, öncelikle kemoterapötiklere ait sitotoksik dozların belirlenmesi için hücre canlılık testleri yapılmış, daha sonra ferroptoz indükleyicisi olan erastin ile kombinasyonları uygulanarak sinerjik etkinin görüldüğü doz aralıkları belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında, tekli uygulamaların ve ferroptoz

indükleyicisi erastin ile birlikte kombinasyon uygulamalarının ferroptotik yollar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ayrıca iki farklı meme kanseri hücre hattı kullanılarak elde edilen sonuçların karşılaştırılması yapılmış, çalışmada kullanılan dozların sağlıklı meme dokusu hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri de incelenmiştir.

Sisplatin, yaygın olarak kullanılan antikanser ajanlardan biri olmasına rağmen, ciddi toksik yan etkileri bulunmaktadır. Ayrıca sıklıkla direnç gelişimi sebebiyle tedavide istenen etkinliği gösterememektedir (Köberle ve ark., 2010). Bu dezavantajları elimine edebilmek için karboplatin, oksaliplatin gibi farklı platin türevleri denenmiş olsa da, benzer yan etkiler ve/veya direnç gelişimi bu türevlerde de görülmüştür. Bu nedenle platin bileşiklerin etkinliğinin artırılmasında kombinasyon uygulamaları ön plana çıkmaktadır (Cocetta ve ark., 2020).

Sisplatin ile indüklenen sitotoksitenin artan ROS düzeyleri ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Obre ve Rossignol, 2015). Sisplatinin GSH düzeylerini azalttığı, NADPH oksidaz sistemini indüklediği ve bu nedenle antioksidan kullanımının sisplatin etkilerini reverse ettiği rapor edilmiştir (Banfi ve ark., 2004; Volarevic ve ark., 2019). Sisplatin etkinliğinin kanser hücrelerinde yetersiz olmasının temel sebepleri arasında sisplatin-DNA etkileşiminin engellenmesi ve apoptotik yolların baskılanması yer almaktadır (Galluzzi ve ark., 2012). Bu bağlamda, sisplatinin oksidatif stresi arttırıcı etkisi baz alınarak alternatif yollar üzerinden kanserde hücre ölümünü indükleme potansiyelinin olduğu düşünülmektedir. Örneğin Zhang ve arkadaşlarının akciğer kanseri üzerine yaptıkları bir çalışmada kanser hücrelerinde GPX4 ekspresyonunun normal hücrelere oranla artış gösterdiği rapor edilmiştir. GPX4 inhibitörü olan RSL3'ün uygulanması sonucunda ferroptoz aktivasyonu üzerinden hücrelerin sisplatine karşı hassasiyetinin arttığı *in vitro* ve *in vivo* deneylerle gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2019). Benzer şekilde, Liu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sisplatine dirençli osteosarkom hücreleri ele alınmış, bu hücrelerde ferroptoz inhibitörü Nrf2 ekspresyonunun ve ayrıca GPX4 ekspresyonunun artış gösterdiği tespit edilmiştir. RSL3 ve erastin uygulanan dirençli osteosarkom hücrelerinde ferroptoz belirteçleri olan lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres

düzeylerinin arttığı, buna bağlı olarak sisplatin direncinin kırıldığı rapor edilmiştir (Liu ve Wang, 2019).

Bu tez çalışmasında, sisplatin tekli olarak ve erastin ile kombinasyon şeklinde meme kanseri hücrelerine uygulanmıştır. Hücre canlılık deneylerinden elde edilen verilere göre, sisplatinin uygulanması sonucu 24.saatte 50 μ M'dan düşük dozlarda hiçbir hücre hattında sitotoksik etki gözlenmemiştir. Ancak erastin ile kombinasyon şeklinde uygulandığında, üçlü negatif MDA-MB-231 hücrelerinde 1 μ M dahil olmak üzere sisplatinin tüm dozlarında anlamlı sinerjik etki tespit edilmiştir ($CI < 1$). MCF-7 hücrelerinde ise tüm dozlarda antagonist etki görülmüştür ($CI > 1$). Bu nedenle, çalışmanın devamında erastin (1 μ M) ve sisplatin (1 μ M) kombinasyonunun yalnızca MDA-MB-231 hücrelerindeki ferroptotik etki mekanizması araştırılmıştır. Ferroptozda oksidatif stres artışı görüldüğünden, bu hücrelerde öncelikle ROS düzeyleri ölçülmüş, kontrol grubuna ve erastin uygulamalarına kıyasla sisplatin-erastin kombinasyonunun ROS düzeylerini anlamlı oranda arttırdığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). ROS düzeylerinin artmasına paralel olarak hücrede GSH düzeyleri ve GPX enzim aktivitesi de ölçülmüştür. Her ikisinin de kontrol grubuna ve erastin uygulamalarına kıyasla anlamlı oranda baskılandığı belirlenmiştir ($p < 0,05$).

Ferroptotik hücre ölümünde mitokondri membran hasarı da görülmektedir. Mitokondri membran potansiyelinin bozulması sonucu, mitokondriyal demir ve ROS moleküllerinin sitoplazmaya dağılarak ferroptoz indüksiyonuna katkı sağladıkları bildirilmektedir (Takashi ve ark., 2020). Tez çalışması kapsamında yapılan deneylerle sisplatin ve erastin kombinasyonunun mitokondri membran potansiyeli üzerindeki etkisi incelenmiş ve depolarize-canlı hücre popülasyonunda kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde artış görülmüştür ($p < 0,05$). Ferroptozda görülen önemli olaylardan biri de demir bağımlı lipid peroksidasyonudur (Cao ve Dixon, 2016). Bu nedenle, sisplatin-erastin uygulamalarının hücre içi demir düzeylerini regüle eden IREB2 ve FPN1 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi ve ayrıca lipid peroksidasyonunda görevli olan ACSF2 protein ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Western blot analizinden elde edilen sonuçlara göre, FPN1 protein ekspresyonunda anlamlı bir farklılık gözlenmezken, sisplatin-erastin kombinasyonunun IREB2 protein ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla 5,47 kat arttırdığı tespit edilmiştir. ACSF2

ekspresyonunda ise 3,84 kat artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyleri de ölçülmüş, beklendiği üzere MDA düzeylerinin de kontrol grubuna ve erastin uygulamasına kıyasla anlamlı oranda arttığı görülmüştür ($p<0,05$). MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan sisplatin ($1 \mu\text{M}$) ve erastin ($1 \mu\text{M}$) kombinasyonu sağlıklı meme dokusu hücreleri MCF-10A'ya uygulandığında ise elde edilen hücre canlılık değerleri $\% 100,38 \pm 4,18$ olarak tespit edilmiştir. Bu değer MDA-MB-231 hücrelerinde $\% 56,04 \pm 8,81$ olarak ölçülmüştür. Bu verilere göre, erastin ile ferroptoz indüksiyonunun sisplatinin etkinliğini selektif olarak arttırdığı, üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde güçlü sinerjik etki göstermesine karşın, sağlıklı hücelere zarar vermediği gözlenmektedir.

Erastinin östrojen reseptörü pozitif MCF-7 hücrelerinde sisplatin etkinliğini arttırmadığı görülmüştür. Bu durumun muhtemel sebebi olarak östrojen reseptörünün ferroptotik yolların inhibisyonunda rol alması düşünülmektedir. Yu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, transferrin ekspresyonunun, östrojenik aktivite varlığında down-regüle olduğu, östrojen reseptörü baskılandığında ise ferroptotik aktivitede artış görüldüğü tespit edilmiştir (Yu ve ark., 2019). Belkaid ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise östrojenik aktivitenin meme kanseri hücrelerinde doymamış yağ asiti üretiminde görev yapan stearoil-coA desatüraz-1 (SCD-1) ekspresyonunu up-regüle ettiği görülmüştür (Belkaid ve ark., 2015). SCD-1 enzimi kanserlerde yüksek düzeyde bulunmaktadır ve baskılanması ile ferroptotik aktivitede artış gözlenmektedir (Xuan ve ark., 2022). Ayrıca östrojen reseptörünün baskılanmasına bağlı olarak ferroptoz inhibitörü Nrf2'nin de baskılandığı belirtilmiştir (Cook ve ark., 2014). Tüm bu veriler, östrojen reseptörü varlığının ferroptotik yolların inhibisyonuna yol açabildiğini göstermektedir. Ayrıca hem SCD-1 enziminin hem de östrojen reseptörünün çeşitli kanserlerde sisplatin direncine yol açtığı da literatürde belirtilmektedir (Goto ve ark., 2020; Matsumura ve ark., 2017; Xuan ve ark., 2022). Bu durum, MCF-7 hücrelerinde sisplatin ve erastin uygulanması sonucu sinerjik etkinin görülmemesi sebebiyle açıklayıcı niteliktedir.

Dosetaksel, meme kanserinde yaygın olarak kullanılan antikanser bileşiklerden biridir. Ancak ciddi toksik yan etkileri sebebiyle monoterapi şeklinde kullanımı

sınırlıdır ve genellikle diğer antikanser bileşiklerle kombinasyonu tercih edilmektedir (Karki ve ark., 2014; Radaideh ve Sledge, 2008). Dosetakselin mikrotübül inhibisyonu yanında hücrelerde oksidatif stresi de arttırdığı literatürde bildirilmektedir (Hung ve ark., 2015). Ayrıca yapılan bir çalışmada dosetaksele dirençli meme kanseri hücrelerinde antioksidan enzimlere ait gen ekspresyonlarının arttığı belirtilmiştir (Pennington ve ark., 2005). Bu bilgilerden hareketle, oksidatif stresin rol oynadığı ferroptotik hücre ölümünün indüklenmesi ile dosetakselin etkinliğinin artırılması hedeflenmiştir.

Literatürde dosetakselin ferroptotik hücre ölümü üzerindeki etkisi ile ilgili oldukça sınırlı veri bulunmaktadır. Zhou ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, erastinin ferroptozu indükleyerek over kanseri hücrelerinde dosetakselin etkinliğini arttırdığı tespit edilmiştir (Zhou ve ark., 2019). Benzer şekilde, yakın zamanda yapılan iki ayrı çalışmada, dirençli prostat kanseri hücrelerinde ferroptoz indüksiyonunun dosetakselin etkinliğini arttırdığı bildirilmiştir. Yang ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada, erastinin ferroptozu indüklemenin yanı sıra androjen reseptörünü de down-regüle ettiği ve dosetakselin sitotoksik etkisini arttırdığı rapor edilmiştir (Yang ve ark., 2021). Ayrıca, aynı hücre hatlarına artesunat uygulanması ile ferroptoz aktivasyonu üzerinden dosetakselin etkinliğinin arttığı da bildirilmiştir (Vakhrusheva ve ark., 2022).

Tez çalışması kapsamında meme kanseri hücrelerine dosetakselin erastinle kombinasyonu uygulanmış ve ferroptotik yollar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hücre canlılık testlerinden elde edilen verilere göre 24 saatte MCF-7 hücrelerinde 0,5 μ M ve üzeri dozlarda anlamlı sitotoksikite gözlenirken, MDA-MB-231 hücrelerinde 0,1 μ M ve üzeri dozlarda anlamlı sitotoksikite tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Kombinasyon uygulamalarında ise her iki hücre hattında da sinerjik etki gözlenmiştir. Ancak sinerjik etkinin görüldüğü en düşük dozlar MCF-7 hücreleri için 0,5 μ M dosetaksel ve 10 μ M erastin iken, MDA-MB-231 hücrelerinde 0,1 μ M dosetaksel ve 1 μ M erastin şeklindedir. Dosetakselin östrojen reseptörü pozitif ve negatif hastalarda tedavi etkinliği yönünden herhangi bir fark oluşturmadığı yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (Andre ve ark., 2010). Bu nedenle sisplatin ve erastin uygulamalarından

farklı olarak dosetaksel ve erastin kombinasyonunda sinerjik etki gözlemlendiği düşünülmektedir. Ancak bu sinerjik etki üçlü negatif hücrelere uygulanan dozdan daha yüksek dozlarda gözlenmiştir.

Çalışmanın devamında ferroptotik yollar incelenmiştir. Öncelikle, her iki maddenin uygulandığı hücrelerde ROS düzeyleri ölçülmüş, her iki hücre hattında da kontrol grubuna ve tekli uygulamalara oranla ROS düzeylerinin anlamlı oranda arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Benzer şekilde, dosetaksel ve erastinin uygulandığı hücrelerde GSH düzeyleri ve GPX enzim aktiviteleri incelenmiş, her iki hücre hattında da kontrol grubuna ve tekli uygulamalara oranla anlamlı düzeyde baskılanma tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna paralel olarak, glutatyon üretiminde görev alan SLC7A11 protein ekspresyonu tüm uygulamalarda her iki hücre hattında da kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde baskılanmıştır ($p<0,05$). Ancak MCF-7 hücrelerinde kombinasyon uygulaması SLC7A11 ekspresyonunu daha güçlü düzeyde baskılamıştır.

Dosetakselin melanoma hücrelerinde mitokondriyal membran depolarizasyonunu indüklediği belirtilmektedir (Mhaidat ve ark., 2007). Pawar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre ise, MCF-7 hücrelerinde dosetaksel uygulamasının çok düşük oranda depolarizasyonu arttırdığı bildirilmiştir (Pawar ve ark., 2015). Bu tez çalışmasında farklı olarak, dosetaksel uygulamasının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde mitokondriyal membran depolarizasyonunu değiştirmediği görülmüştür ($p>0,05$). Ancak dosetaksel ve erastin kombinasyonu kontrol grubuna ve tekli uygulamalara oranla depolarizasyonu her iki hücre hattında da anlamlı oranda arttırmıştır ($p<0,05$). Bunun yanında, ferroptozun en önemli belirteçlerinden lipid peroksidasyon düzeyleri de incelenmiştir. Dosetaksel ve erastinin tekli ve kombinasyon uygulamalarında lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyleri her iki hücre hattında da anlamlı oranda artmıştır. Ancak kombinasyon uygulaması tekli uygulamalara oranla MDA miktarını daha yüksek düzeyde arttırmıştır ($p<0,05$). Buna karşın, lipid peroksidasyonunda görev alan ACSF2 protein ekspresyonu tüm uygulamalarda kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde artarken, tekli uygulamalarla kıyaslandığında kombinasyon uygulaması ACSF2 ekspresyonunu MCF-7 hücrelerinde daha yüksek düzeyde arttırmıştır ($p<0,05$).

Ferroptozda hücre içi demir düzeylerinin regülasyonunda görev yapan proteinlerden IREB2 ve FPN1 ekspresyon düzeyleri, dosetaksel ve erastine maruz bırakılan hücrelerde western blot yöntemi ile ölçülmüştür. Elde edilen verilere göre, her iki hücre hattında da kontrol grubuna oranla IREB2 ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Ancak MDA-MB-231 hücrelerinde bu artış daha güçlü düzeyde gerçekleşmiştir. Bununla birlikte dosetaksel ve erastin kombinasyonu FPN1 ekspresyon düzeylerini MDA-MB-231 hücrelerinde değiştirmezken, MCF-7 hücrelerinde anlamlı oranda baskılamıştır. Bu bulgular demir düzeylerini regüle eden proteinlerin hücre içi demir miktarını arttıracak yönde eksprese olduğunu göstermektedir.

Dosetaksel ve erastin uygulamalarında kullanılan dozların, normal meme dokusu hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri de incelenmiştir. Hücre canlılık testlerinden elde edilen verilere göre, MCF-7 hücrelerine uygulanan dozların (0,5 μ M dosetaksel ve 10 μ M erastin), MCF-10A hücrelerinde anlamlı oranda daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Kombinasyon uygulamalarından elde edilen hücre canlılık değerleri MCF-7 için $78,10 \pm 4,75$ iken, MCF-10A'dan elde edilen canlılık değeri $56,12 \pm 2,47$ olarak tespit edilmiştir. Buna karşın, MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan dozların (0,1 μ M dosetaksel ve 1 μ M erastin) MCF-10A hücrelerine uygulanması ile elde edilen canlılık değerleri $84,13 \pm 1,70$ olarak ölçülmüştür. Bu değer MDA-MB-231 hücrelerinde $49,78 \pm 2,21$ olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). Tüm bu verilere göre, dosetaksel ve erastin kombinasyonunun üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde, sağlıklı ve östrojen reseptörü pozitif meme kanseri hücrelerine kıyasla daha güçlü sitotoksik etki gösterdiği görülmektedir. Ayrıca ferroptotik belirteçlerin araştırılmasından elde edilen sonuçlara göre, dosetakselin tekli olarak da ferroptozu indüklemeye potansiyelinin olduğu anlaşılmaktadır.

Etopozid, oksidatif stresi indüklediği bilinen antikanser bileşiklerden biridir. Ayrıca mitokondri membran hasarına yol açtığı da literatürde rapor edilmiştir (Lee ve ark., 2016). Temel etki mekanizması DNA replikasyonunun inhibisyonu olmasına karşın, kanser hücreleri etopozidin bu etkisine yönelik sıklıkla direnç geliştirebilmektedir (Alpsoy ve ark., 2014; Shin ve ark., 2016). Bu nedenle, ferroptoz

aktivasyonu ile etopozidin etkinliğinin arttırılması hedeflenmiştir. Literatürde etopozidin ferroptotik potansiyeli ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Ancak etopozid etkinliğinin ferroptoz aktivasyonu üzerinden arttırılabileceğine dair iki çalışma yer almaktadır. Hassannia ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada, doğal kaynaklı bir bileşik olan *Withaferin*'in nöroblastoma hücrelerinde Nrf2 ve GPX4 inhibisyonu üzerinden ferroptozu aktive ederek, hücrelerde etopozide karşı hassasiyeti arttırdığı gözlenmiştir (Hassannia ve ark., 2018). Diğer çalışmada ise etopozid ile ferroptozu indüklediği bilinen sulfasalazin kombinasyon şeklinde nöroblastoma kök hücrelerine uygulanmış ve etopozid etkinliğinin ferroptoz indüksiyonu üzerinden arttığı tespit edilmiştir (Monteleone ve ark., 2021).

Bu amaçla, etopozid ve erastin meme kanseri hücrelerine uygulanmış ve ferroptotik yollar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hücre canlılık testlerinden elde edilen verilere göre, etopozid ve erastin kombinasyonunun uygulanması sonucu yalnızca MCF-7 hücrelerinde sinerjik etki görölmüştür ($p<0,05$) ($CI<1$). Bu nedenle çalışmaya MCF-7 hücreleri ile devam edilmiştir. 24.saatte etopozid uygulamasında yalnızca 50 μM dozda anlamlı sitotoksik etki gözlenirken, erastin ile kombinasyonunda 1 μM dahil etopozidin tüm dozlarında sinerjik etkiye rastlanmıştır ($CI<1$). Çalışmanın devamında 1 μM etopozid ile 10 μM erastin kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinde ROS düzeylerine etkisi incelenmiş, kontrol grubuna ve erastin uygulamasına kıyasla ROS düzeylerinin anlamlı oranda arttığı görölmüştür ($p<0,05$). Benzer şekilde GSH düzeyleri ile GPX enzim aktivitelerinin de kontrol grubuna ve erastin uygulamasına kıyasla güçlü şekilde baskılandığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ayrıca mitokondriyal membran depolarizasyonunun da kombinasyon uygulaması ile anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$).

Etopozid ve erastin kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinde lipid peroksidasyonu üzerindeki etkisi incelendiğinde, kontrol grubuna ve erastin grubuna oranla MDA miktarının anlamlı oranda arttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna paralel olarak lipid peroksidasyonunu regüle eden ACSF2 protein ekspresyonu da kombinasyon uygulaması ile anlamlı oranda artış göstermiştir ($p<0,05$). Demir metabolizmasının regölasyonunda görev alan IREB2 protein ekspresyonunun kontrol

grubuna oranla arttığı görülürken, FPN1 protein ekspresyonunun da kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde azaldığı gözlenmiştir. Ancak erastin ile kombinasyon uygulamaları arasında anlamlı farklılık tespit edilememiştir ($p>0,05$). Buna karşın, GPX4 protein ekspresyonunun kombinasyon uygulaması ile daha güçlü oranda baskılandığı görülmüştür. Bu verilere göre, etopozid ve erastin kombinasyonunun oksidatif stres ve lipid peroksidasyon indüksiyonu üzerinden ferroptotik yolları aktive ettiği düşünülmektedir.

MCF-7 hücrelerine uygulanan etopozid ve erastin dozlarının sağlıklı MCF-10A hücrelerine uygulanmasıyla elde edilen sitotoksik etkiler karşılaştırılmıştır. Buna göre, 1 μ M etopozidin her iki hücre hattında nontoksik olduğu gözlenirken, 10 μ M erastinin MCF-10A hücrelerine daha toksik olduğu tespit edilmiştir. Ancak kombinasyon uygulamasının MCF-7 hücrelerine anlamlı oranda daha toksik olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Söz konusu uygulama sonucu MCF-7 hücrelerinde tespit edilen hücre canlılık oranı $63,42 \pm 3,26$ iken, MCF-10A hücrelerinde bu değerin $81,69 \pm 3,53$ olduğu görülmüştür.

Literatürde östrojenik aktivitenin ferroptotik yolları inhibe ettiğine dair bulgular yer almasına rağmen, etopozid ve erastin kombinasyonunun diğer uygulamalardan farklı olarak östrojen reseptörü-pozitif MCF-7 hücreleri üzerinde sinerjik etki göstermesi, farklı hücresel mekanizmaların aktif olduğunu düşündürmektedir. Bu bağlamda, ilaç dışı atım (*drug efflux*) pompalarının fonksiyonu öne çıkmaktadır. Literatürde ABC transportları olarak bilinen dışı atım pompalarından üç tanesinin (ABCB1, ABCC1, ABCC3) etopozid direncine yol açtığı bildirilmektedir (Cao ve ark., 2021). Hücre içine giren etopozid molekülleri kısa sürede hücre dışına pompalanmakta ve böylece yeterli etki gösterememektedir. MCF-7 hücrelerinde ağırlıklı olarak ABCB1 transportu eksprese olurken, üçlü negatif MDA-MB-231 ve sağlıklı MCF-10A hücrelerinde diğer iki transport (ABCC1, ABCC3) eksprese olmaktadır (Hiraga ve ark., 2011; Saxena ve ark., 2011). Zhou ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, MCF-7 hücrelerinde bulunan ABCB1 transportunun erastinin hedef moleküllerinden biri olduğu, erastin tarafından ABCB1 transportunun bloke edilerek ilaç moleküllerinin hücre dışına pompalanmasının engellendiği tespit

edilmiştir (Zhou ve ark., 2019). Bu veriye dayanarak, MCF-7 hücrelerinde erastinin etopozidin dışarı atılmasını engellediği ve böylece etkinliğini arttırdığı düşünülmektedir. Diğer iki hücre hattında ise ABCC1 ve ABCC3 transportları üzerinden etopozidin hücre dışına atıldığı ve bu sebeple sinerjik etkinin görülmediği muhtemel bir mekanizma olarak değerlendirilmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, ferroptoz indüksiyonu ile yaygın olarak kullanılan kemoterapötiklerden sisplatin, dosetaksel ve etopozidin çeşitli meme kanseri hücrelerindeki etkinliklerinin artırılması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, ferroptotik hücre ölümünün kemoterapötik etkinliğinin artırılmasına olumlu yönde katkı sağladığını göstermektedir. Ancak bu katkı, kullanılan antikanser bileşiğe göre ve meme kanseri alt türüne göre değişkenlik gösterebilmektedir. Çalışmadan elde edilen verilere göre, üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde sisplatin ve erastin kombinasyonu sinerjik etki gösterirken, östrojen reseptörü-pozitif meme kanseri hücrelerinde etopozid ve erastin kombinasyonu sinerjik etki göstermiştir. Dosetaksel uygulamalarında ise her iki hücre hattında da sinerjik etki görülmüştür. Ancak uygulanan dozlar hücrenin türüne göre değişkenlik göstermiştir.

Literatürde yer alan bulgulara ve bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre, ferroptoz indüksiyonunun kanser tedavisinde olumlu yönde etkilerinin olduğu görülmekle beraber, daha kapsamlı pre-klinik ve klinik çalışmaların yapılması gerekmektedir. Ayrıca ferroptoz indüksiyonunun olası yan etkilerinin de aydınlatılması, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi açısından önem arz etmektedir.

ÖZET

Çeşitli Kemoterapötiklerin Meme Kanseri Hücreleri Üzerinde Ferroptozu İndükleyici Etkilerinin Araştırılması

Meme kanseri dünyada ve ülkemizde kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türüdür. Mevcut tedavilerin yetersizliği sebebiyle, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Bu bağlamda, yakın zamanda tanımlanmış olan ferroptoz, bilinen diğer hücre ölüm mekanizmalarından farklı olması ve geleneksel tedavilere dirençli hücrelerde dahi etkili sonuç vermesi nedeniyle kanser tedavisinde ümit vadeden bir yaklaşım olarak görülmektedir. Ferroptotik hücre ölümü, demir bağımlı lipid peroksidasyonu, glutatyon eksikliği, glutatyon peroksidaz-4 inaktivasyonu ve buna bağlı olarak artan oksidatif stres ile karakterizedir. Yapılan çok sayıda çalışma, ferroptotik hücre ölümünün indüklenmesi ile kanser tedavisinde kemoterapi etkinliğinin artırılması, ilaç direncinin önlenmesi gibi başarılı sonuçların elde edilebildiğini göstermiştir. Bu tez çalışması kapsamında yaygın olarak kullanılan antikanser bileşiklerden sisplatin, dosetaksel ve etopozidin östrojen reseptörü-pozitif ve üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde ferroptotik etkileri araştırılmış ve ayrıca ferroptoz indükleyicisi erastin ile kombinasyonlarının etkileri incelenmiştir. Bu bağlamda, hücre canlılığının araştırılmasında MTT deneyi uygulanmış, oksidatif stres, glutatyon düzeyleri, glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve mitokondriyal membran potansiyeli ilgili kitlerle ölçülmüştür. Ferroptotik proteinlerin ekspresyonu ise western blot yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, sisplatin ve erastin kombinasyonunun üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde ferroptoz aktivasyonu üzerinden sinerjik etki gösterdiği, buna karşın etopozid ve erastin kombinasyonunun östrojen reseptörü-pozitif meme kanseri hücrelerinde sinerjik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Dosetakselin ise her iki hücre hattında da ferroptozu aktive ettiği ve ayrıca erastin ile kombinasyonlarının hem üçlü negatif hem de östrojen reseptörü pozitif meme kanseri hücrelerinde ferroptozu sinerjik olarak indüklediği gözlenmiştir. Sonuç olarak, ferroptoz aktivasyonunun meme kanseri hücrelerinde kemoterapötiklerin etkinliğini anlamlı oranda arttırdığı tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Dosetaksel, etoposide, ferroptoz, meme kanseri, sisplatin.

SUMMARY

Investigating Ferroptosis Inducing Effects of Various Chemotherapeutics on Breast Cancer Cells

Breast cancer is the most commonly diagnosed type of cancer among women in the world. Due to the inadequacy of existing treatments, it is particularly important to develop new treatment strategies. In this context, ferroptosis, a recently defined cell death mechanism, is considered to be a promising approach in cancer treatment, because it is different from other known cell death mechanisms and yields effective results even in cells resistant to conventional therapies. Ferroptotic cell death is characterized by iron-dependent lipid peroxidation, glutathione deficiency, glutathione peroxidase-4 inactivation and consequently increased oxidative stress. Numerous studies have shown that successful results can be achieved by inducing ferroptotic cell death, such as increasing the effectiveness of chemotherapy in cancer treatment and preventing drug resistance. In the present study, the ferroptotic potential of commonly used anticancer compounds, cisplatin, docetaxel and etoposide, were investigated in estrogen receptor-positive and triple-negative breast cancer cells. Additionally, the effect of their combinations with ferroptosis inducer erastin were also investigated. In this context, cell viability was assessed by the MTT assay. Oxidative stress, glutathione levels, the activity of glutathione peroxidase, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential were measured using relevant kits. Ferroptotic protein expressions were investigated by western blot analysis. Results obtained from the study demonstrated that the combination of cisplatin and erastin had a synergistic effect on the activation of ferroptosis in triple negative breast cancer cells, whereas the combination of etoposide and erastin showed a synergistic effect in estrogen receptor-positive breast cancer cells. On the other hand, it was observed that docetaxel as a single treatment activates ferroptosis in both cell lines, and its combination with erastin synergistically induces ferroptosis in both triple negative and estrogen receptor positive breast cancer cells. In conclusion, the present study demonstrated that the activation of ferroptosis significantly increases the efficacy of chemotherapeutics in breast cancer cells.

Keywords: Breast cancer, cisplatin, docetaxel, etoposide, ferroptosis.

KAYNAKLAR

- ALMANSOUR NM (2022). Triple-negative breast cancer: A brief review about epidemiology, risk factors, signaling pathways, treatment and role of artificial intelligence. *Front Mol Biosci* **9**:836417.
- ALPSOY A, YASA S, GÜNDÜZ U (2014). Etoposide resistance in MCF-7 breast cancer cell line is marked by multiple mechanisms. *Biomed Pharmacother* **68**: 351–355.
- ANDRE F, BROGLIO K, PUSZTAI L, BERRADA N, MACKEY JR, NABHOLTZ JM, CHAN S, HORTOBAGYI GN (2010). Estrogen receptor expression and docetaxel efficacy in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of four randomized trials. *Oncologist* **15**(5):476-83.
- AYALA A, MUÑOZ MF, ARGÜELLES S (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev* **2014**: 1–31.
- BACHEGOWDA LS, MAKOWER DF, SPARANO JA (2014). Taxanes: impact on breast cancer therapy. *Anticancer Drugs* **25**: 512–521.
- BALDWIN E, OSHEROFF N (2005). Etoposide, Topoisomerase II and Cancer. *Curr Med Chem Agents* **5**: 363–372.
- BA'NFI B, MALGRANGE B, KNISZ J, STEGER K, DUBOIS-DAUPHIN M, KRAUSE K.-H (2004). NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem* **279**: 46065–46072.
- BANSAL A, SIMON MC (2018). Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *J Cell Biol* **217**(7):2291–8.
- BAO Z-H, HOU X-B, LI H-L, MAO Y-F, WANG W-R (2022). The mechanism and progress of ferroptosis in pancreatic cancer. *Acta Histochem* **124**: 151919.
- BATTAGLIA AM, CHIRILLO R, AVERSA I, SACCO A, COSTANZO F, BIAMONTE F (2020). Ferroptosis and Cancer: Mitochondria Meet the “Iron Maiden” Cell Death. *Cells* **9**: 1505.
- BELKAID A, DUGUAY SR, OUELLETTE RJ, SURETTE ME (2015). 17 β -estradiol induces stearyl-CoA desaturase-1 expression in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *BMC Cancer* **15**(1):440.
- CAO J, ZHANG M, WANG B, ZHANG L, ZHOU F, FANG M (2021). Chemoresistance and Metastasis in Breast Cancer Molecular Mechanisms and Novel Clinical Strategies. *Front Oncol* **11**:1–11.
- CAO JY, DIXON SJ (2016). Mechanisms of ferroptosis. *Cell Mol Life Sci* **73**: 2195–

2209.

- CAO W, SHIVERICK KT, NAMIKI K, SAKAI Y, PORVASNIK S, URBANEK C, ROSSER CJ (2008). Docetaxel and bortezomib downregulate Bcl-2 and sensitize PC-3-Bcl-2 expressing prostate cancer cells to irradiation. *World J Urol* **26**(5):509-16.
- CHEN L, LI X, LIU L, YU B, XUE Y, LIU Y (2015). Erastin sensitizes Glioblastoma cells to temozolomide by restraining xCT and cystathionine- γ -lyase function. *Oncol Rep* **33**(3):1465–74.
- CHOU TC, TALALAY P (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* **22**:27–55.
- COCETTA V, RAGAZZI E, MONTOPOLI M (2020). Links between cancer metabolism and cisplatin resistance. *Int Rev Cell Mol Biol* **354**:107-164.
- COOK KL, CLARKE PAG, PARMAR J, HU R, SCHWARTZ-ROBERTS JL, ABU-ASAB M, WÄRRI A, BAUMANN WT, CLARKE R (2014). Knockdown of estrogen receptor- α induces autophagy and inhibits antiestrogen-mediated unfolded protein response activation, promoting ROS-induced breast cancer cell death. *FASEB J* **28**(9):3891–905.
- DASARI S, BERNARD TCHOUNWOU P (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* **740**: 364–378.
- DAVIES MJ (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J* **473**: 805–825.
- DIXON SJ (2017). Ferroptosis: bug or feature? *Immunol Rev* **277**: 150–157.
- DIXON SJ, LEMBERG KM, LAMPRECHT MR, SKOUTA R, ZAITSEV EM, GLEASON CE, PATEL DN, BAUER AJ, CANTLEY AM, YANG WS, III BM, STOCKWELL BR (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. *Cell* **149**: 1060–1072.
- DIXON SJ, PATEL DN, WELSCH M, SKOUTA R, LEE ED, HAYANO M, THOMAS AG, GLEASON CE, TATONETTI NP, SLUSHER BS, STOCKWELL BR (2014). Pharmacological inhibition of cystine–glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *Elife* **3**: 1–25.
- DIXON SJ, STOCKWELL BR (2014). The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol* **10**: 9–17.
- DOLMA S, LESSNICK SL, HAHN WC, STOCKWELL BR (2003). Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell* **3**: 285–296.
- ELING N, REUTER L, HAZIN J, HAMACHER-BRADY A, BRADY NR (2015). Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic

- cancer cells. *Oncoscience* **2**: 517.
- ESTRELA JM, ORTEGA A, OBRADOR E (2006). Glutathione in Cancer Biology and Therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* **43**: 143–181.
- FAN Z, WIRTH A-K, CHEN D, WRUCK CJ, RAUH M, BUCHFELDER M, SAVASKAN N (2017). Nrf2-Keap1 pathway promotes cell proliferation and diminishes ferroptosis. *Oncogenesis* **6**: e371–e371.
- FEDERICO A, MORGILLO F, TUCCILLO C, CIARDIELLO F, LOGUERCIO C (2007). Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer* **121**: 2381–2386.
- FENG H, STOCKWELL BR (2018). Unsolved mysteries: How does lipid peroxidation cause ferroptosis? *PLOS Biol* **16**: e2006203.
- GALLUZZI L, VITALE I, MICHELS J, BRENNER C, SZABADKAI G, HARELBELLAN A, CASTEDO M, KROEMER G (2014). Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis* **5**: e1257.
- GAO M, DENG J, LIU F, FAN A, WANG Y, WU H, DING D, KONG D, WANG Z, PEER D, ZHAO Y. (2019). Triggered ferroptotic polymer micelles for reversing multidrug resistance to chemotherapy. *Biomaterials* **223**:119486.
- GAO X, GUO N, XU H, PAN T, LEI H, YAN A, MI Y, XU L (2020). Ibuprofen induces ferroptosis of glioblastoma cells via downregulation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling pathway. *Anticancer Drugs* **31**: 27–34.
- GARCIA SC, GROTTTO D, BULCÃO RP, MORO AM, ROEHRS M, VALENTINI J, DE FREITAS FA, PANIZ C, BUBOLS GB, CHARÃO MF (2013). Evaluation of lipid damage related to pathological and physiological conditions. *Drug Chem Toxicol* **36**: 306–312.
- GASCHLER MM, HU F, FENG H, LINKERMANN A, MIN W, STOCKWELL BR (2018). Determination of the Subcellular Localization and Mechanism of Action of Ferrostatins in Suppressing Ferroptosis. *ACS Chem Biol* **13**: 1013–1020.
- GASCHLER MM, STOCKWELL BR (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **482**: 419–425.
- GHOSH S (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem* **88**:102925.
- GIAQUINTO AN, SUNG H, MILLER KD, KRAMER JL, NEWMAN LA, MINIHAN A, JEMAL A, SIEGEL RL (2022). Breast Cancer Statistics, 2022. *Ca Cancer J Clin* **0**:1–18.
- GLOBOCAN (2020). Erişim:
[<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>]
Erişim Tarihi: 28.06.2022

- GOGVADZE V, ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B (2006). Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1757**: 639–647.
- GÖRLACH A, DIMOVA EY, PETRY A, MARTÍNEZ-RUIZ A, HERNANSANZ-AGUSTÍN P, ROLO AP, PALMEIRA CM, KIETZMANN T (2015). Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved? *Redox Biol* **6**: 372–385.
- GOTO T, KASHIWAGI E, JIANG G, NAGATA Y, TERAMOTO Y, BARAS AS, YAMASHITA S, ITO A, ARAI Y, MIYAMOTO H (2020). Estrogen receptor- β signaling induces cisplatin resistance in bladder cancer. *Am J Cancer Res* **10**(8):2523-2534.
- HASSANNIA B, WIERNICKI B, INGOLD I, QU F, VAN HERCK S, TYURINA YY, BAYIR H, ABHARI BA, ANGELI JPF, CHOI SM, MEUL E, HEYNINCK K, DECLERCK K, CHIRUMAMILLA CS, LAHTELA-KAKKONEN M, VAN CAMP G, KRYSKO DV, EKERT PG, FULDA S, DE GEEST BG, CONRAD M, KAGAN VE, VANDEN BERGHE W, VANDENABEELE P, VANDEN BERGHE T (2018). Nano-targeted induction of dual ferroptotic mechanisms eradicates high-risk neuroblastoma. *J Clin Invest* **128**(8):3341–55.
- HAUCK AK, BERNLOHR DA (2016). Oxidative stress and lipotoxicity. *J Lipid Res* **57**: 1976–1986.
- HENRY NL, SHAH PD, HAIDER I, FREER PE, JAGSI R, SABEL MS (2020). Cancer of the Breast. In *Abeloff's Clinical Oncology*, 6th Edit., p. 1560-1603. Elsevier.
- HIRAGA T, ITO S, NAKAMURA H (2011). Side population in MDA-MB-231 human breast cancer cells exhibits cancer stem cell-like properties without higher bone-metastatic potential. *Oncol Rep* **25**(1):289-96.
- HOUSMAN G, BYLER S, HEERBOTH S, LAPINSKA K, LONGACRE M, SNYDER N, SARKAR S (2014). Drug resistance in cancer:An overview. *Cancers (Basel)* **6**(3): 1769-1792.
- HOWLADER N, CRONIN KA, KURIAN AW, ANDRIDGE R (2018). Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **27**(6):619-626.
- HUNG CH, CHAN SH, CHU PM, TSAI KL (2015). Docetaxel Facilitates Endothelial Dysfunction through Oxidative Stress via Modulation of Protein Kinase C Beta: The Protective Effects of Sotrastaurin. *Toxicol Sci* **145**(1):59-67.
- JIANG L, KON N, LI T, WANG S-J, SU T, HIBSHOOSH H, BAER R, GU W (2015). Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature* **520**: 57–62.
- KARKI R, SEAGLE B-LL, NIEVES-NEIRA W, SHAHABI S (2014). Taxanes in

- combination with biologic agents for ovarian and breast cancers. *Anticancer Drugs* **25**: 536–554.
- KENNEDY L, SANDHU JK, HARPER M-E, CUPERLOVIC-CULF M (2020). Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules* **10**: 1429.
- KÖBERLE B, TOMICIC MT, USANOVA S, KAINA B (2010). Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* **1806**: 172–182.
- KUMAR P, AGGARWAL R (2016). An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet* **293**: 247–269.
- KUMARI S, BADANA AK, G MM, G S, MALLA R (2018). Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomark Insights* **13**: 117727191875539.
- LACHAIE E, LOUANDRE C, GODIN C, SAIDAK Z, BAERT M, DIOUF M, CHAUFFERT B, GALMICHE A (2014). Sorafenib induces ferroptosis in human cancer cell lines originating from different solid tumors. *Anticancer Res* **34**: 6417–6422.
- LEE KI, SU CC, YANG CY, HUNG DZ, LIN CT, LU TH, LIU SH, HUANG CF (2016). Etoposide induces pancreatic β -cells cytotoxicity via the JNK/ERK/GSK-3 signaling-mediated mitochondria-dependent apoptosis pathway. *Toxicol Vitro* **36**: 142–52.
- LI Y, YAN H, XU X, LIU H, WU C, ZHAO L (2019). Erastin/sorafenib induces cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell ferroptosis through inhibition of the Nrf2/xCT pathway. *Oncol Lett* **19**: 323–333.
- LIU Q, WANG K (2019). The induction of ferroptosis by impairing STAT3/Nrf2/GPx4 signaling enhances the sensitivity of osteosarcoma cells to cisplatin. *Cell Biol Int* **43**(11):1245-1256.
- LOUANDRE C, EZZOUKHRY Z, GODIN C, BARBARE J-C, MAZIÈRE J-C, CHAUFFERT B, GALMICHE A (2013). Iron-dependent cell death of hepatocellular carcinoma cells exposed to sorafenib. *Int J Cancer* **133**: 1732–1742.
- MA S, HENSON ES, CHEN Y, GIBSON SB (2016). Ferroptosis is induced following siramesine and lapatinib treatment of breast cancer cells. *Cell Death Dis* **7**: e2307–e2307.
- MAHDAVI M, NASSIRI M, KOOSHYAR MM, VAKILI-AZGHANDI M, AVAN A, SANDRY R, PILLAI S, LAM AK, GOPALAN V (2019). Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA. *J Cell Physiol* **234**: 5741–5750.

- MARTIN M, PIENKOWSKI T, MACKEY J, PAWLICKI M, GUASTALLA JP, WEAVER C, TOMIAK E, AL-TWEIGERI T, CHAP L, JUHOS E, GUEVIN R, HOWELL A, FORNANDER T, HAINSWORTH J, COLEMAN R, VINHOLES J, MODIANO M, PINTER T, TANG SC, COLWELL B, PRADY C, PROVENCHER L, WALDE D, RODRIGUEZ-LESCURE A, HUGH J, LORET C, RUPIN M, BLITZ S, JACOBS P, MURAWSKY M, RIVA A, VOGEL C (2005). Adjuvant Docetaxel for Node-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* **352**: 2302–2313.
- MATSUMURA S, OHTA T, YAMANOUCHI K, LIU Z, SUDO T, KOJIMAHARA T, SEINO M, NARUMI M, TSUTSUMI S, TAKAHASHI T, TAKAHASHI K, KURACHI H, NAGASE S (2017). Activation of estrogen receptor α by estradiol and cisplatin induces platinum-resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* **18**(9):730-739.
- MERESSE P, DECHAUX E, MONNERET C, BERTOUNESQUE E (2004). Etoposide: Discovery and Medicinal Chemistry. *Curr Med Chem* **11**: 2443–2466.
- MHAIDAT NM, WANG Y, KIEJDA KA, ZHANG XD, HERSEY P (2007). Docetaxel-induced apoptosis in melanoma cells is dependent on activation of caspase-2. *Mol Cancer Ther* **6**(2):752-61.
- MOHAMMAD RM, MUQBIL I, LOWE L, YEDJOU C, HSU HY, LIN LT, SIEGELIN MD, FIMOGNARI C, KUMAR NB, DOU QP, YANG H, SAMADI AK, RUSSO GL, SPAGNUOLO C, RAY SK, CHAKRABARTI M, MORRE JD, COLEY HM, ET AL (2015). Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin Cancer Biol* **35**: S78–S103.
- MONTELEONE L, SPECIALE A, VALENTI GE, TRAVERSO N, RAVERA S, GARBARINO O, LEARDI R, FARININI E, ROVERI A, URSINI F, CANTONI C, PRONZATO MA, MARINARI UM, MARENGO B, DOMENICOTTI C (2021). PKC α Inhibition as a Strategy to Sensitize Neuroblastoma Stem Cells to Etoposide by Stimulating Ferroptosis. *Antioxidants* **10**(5):691.
- MUCKENTHALER MU, GALY B, HENTZE MW (2008). Systemic Iron Homeostasis and the Iron-Responsive Element/Iron-Regulatory Protein (IRE/IRP) Regulatory Network. *Annu Rev Nutr* **28**: 197–213.
- NEMADE H, CHAUDHARI U, ACHARYA A, HESCHELER J, HENGSTLER JG, PAPADOPOULOS S, SACHINIDIS A (2018). Cell death mechanisms of the anti-cancer drug etoposide on human cardiomyocytes isolated from pluripotent stem cells. *Arch Toxicol* **92**: 1507–1524.
- NISHIYAMA M, WADA S (2009). Docetaxel: its role in current and future treatments for advanced gastric cancer. *Gastric Cancer* **12**: 132–141.
- OBRE E, ROSSIGNOL R (2015). Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy. *Int J Biochem Cell*

Biol **59**: 167–181.

ORTEGA AL, MENA S, ESTRELA JM (2011). Glutathione in Cancer Cell Death. *Cancers (Basel)* **3**: 1285–1310.

PAWAR VK, GUPTA S, SINGH Y, MEHER JG, SHARMA K, SINGH P, GUPTA A, BORA HK, CHAURASIA M, CHOURASIA MK (2015). Pluronic F-127 Stabilised Docetaxel Nanocrystals Improve Apoptosis by Mitochondrial Depolarization in Breast Cancer Cells: Pharmacokinetics and Toxicity Assessment. *J Biomed Nanotechnol* **11**(10):1747-1763.

PENNINGTON JD, WANG TJC, NGUYEN P, SUN L, BISHT K, SMART D, GIUS D (2005). Redox-sensitive signaling factors as a novel molecular targets for cancer therapy. *Drug Resist Updat* **8**: 322–330.

RADAIDEH SM, SLEDGE GW (2008). Taxane vs. taxane: is the duel at an end? A commentary on a phase-III trial of doxorubicin and docetaxel versus doxorubicin and paclitaxel in metastatic breast cancer: results of the ERASME 3 study. *Breast Cancer Res Treat* **111**: 203–208.

ROH JL, KIM EH, JANG HJ, PARK JY, SHIN D (2016). Induction of ferroptotic cell death for overcoming cisplatin resistance of head and neck cancer. *Cancer Lett* **381**: 96–103.

RUGO HS, RUMBLE RB, MACRAE E, BARTON DL, CONNOLLY HK, DICKLER MN, FALLOWFIELD L, FOWBLE B, INGLE JN, JAHANZEB M, JOHNSTON SRD, KORDE LA, KHATCHERESSIAN JL, MEHTA RS, MUSS HB, BURSTEIN HJ (2016). Endocrine Therapy for Hormone Receptor–Positive Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Guideline. *J Clin Oncol* **34**: 3069–3103.

SATO H, TAMBA M, ISHII T, BANNAI S (1999). Cloning and Expression of a Plasma Membrane Cystine/Glutamate Exchange Transporter Composed of Two Distinct Proteins. *J Biol Chem* **274**: 11455–11458.

SAXENA M, STEPHENS MA, PATHAK H, RANGARAJAN A (2011). Transcription factors that mediate epithelial–mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dis* **2**(7):e179–e179.

SHARMA LK, FANG H, LIU J, VARTAK R, DENG J, BAI Y (2011). Mitochondrial respiratory complex I dysfunction promotes tumorigenesis through ROS alteration and AKT activation. *Hum Mol Genet* **20**: 4605–4616.

SHIN HJ, KWON HK, LEE JH, ANWAR MA, CHOI S (2016). Etoposide induced cytotoxicity mediated by ROS and ERK in human kidney proximal tubule cells. *Sci Rep* **6**: 34064.

SIKOV WM, BERRY DA, PEROU CM, SINGH B, CIRRINCIONE CT, TOLANEY SM, KUZMA CS, PLUARD TJ, SOMLO G, PORT ER, GOLSHAN M,

- BELLON JR, COLLYAR D, HAHN OM, CAREY LA, HUDIS CA, WINER EP (2015). Impact of the Addition of Carboplatin and/or Bevacizumab to Neoadjuvant Once-per-Week Paclitaxel Followed by Dose-Dense Doxorubicin and Cyclophosphamide on Pathologic Complete Response Rates in Stage II to III Triple-Negative Breast Cancer: CALGB 40603 (A). *J Clin Oncol* **33**: 13–21.
- SKOUTA R, DIXON SJ, WANG J, DUNN DE, ORMAN M, SHIMADA K, ROSENBERG PA, LO DC, WEINBERG JM, LINKERMANN A, STOCKWELL BR (2014). Ferrostatis Inhibit Oxidative Lipid Damage and Cell Death in Diverse Disease Models. *J Am Chem Soc* **136**: 4551–4556.
- SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, BRAY F (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **71**: 209–249.
- TAKASHI Y, TOMITA K, KUWAHARA Y, ROUDKENAR MH, ROUSHANDEH AM, IGARASHI K, NAGASAWA T, NISHITANI Y, SATO T (2020). Mitochondrial dysfunction promotes aquaporin expression that controls hydrogen peroxide permeability and ferroptosis. *Free Radic Biol Med* **161**:60-70.
- TANG H, CHEN D, LI C, ZHENG C, WU X, ZHANG Y, SONG Q, FEI W (2019). Dual GSH-exhausting sorafenib loaded manganese-silica nanodrugs for inducing the ferroptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Pharm* **572**:118782.
- TORTI S V, TORTI FM (2013). Iron and cancer: More ore to be mined. *Nat Rev Cancer* **13**: 342–355.
- VAKHRUSHEVA O, ERB HHH, BRÄUNIG V, MARKOWITSCH SD, SCHUPP P, BAER PC, SLADE KS, THOMAS A, TSAUR I, PUHR M, CULIG Z, CINATL J JR, MICHAELIS M, EFFERTH T, HAFERKAMP A, JUENGEL E (2022). Artesunate Inhibits the Growth Behavior of Docetaxel-Resistant Prostate Cancer Cells. *Front Oncol* **12**:789284.
- VOLAREVIC V, DJOKOVIC B, JANKOVIC MG, HARRELL CR, FELLABAUM C, DJONOV V, ARSENIJEVIC N (2019). Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: a balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity. *J Biomed Sci* **26**: 25.
- WARDLEY A (2007). 3–55 Estrogen–Receptor Status and Outcomes of Modern Chemotherapy for Patients With Node–Positive Breast Cancer. *Breast Dis A Year B Q* **18**: 301.
- XUAN Y, WANG H, YUNG MM, CHEN F, CHAN WS, CHAN YS, TSUI SK, NGAN HY, CHAN KK, CHAN DW (2022). SCD1/FADS2 fatty acid desaturases equipoise lipid metabolic activity and redox-driven ferroptosis in ascites-derived ovarian cancer cells. *Theranostics* **12**(7):3534-3552.
- YAGODA N, VON RECHENBERG M, ZAGANJOR E, BAUER AJ, YANG WS,

- FRIDMAN DJ, WOLPAW AJ, SMUKSTE I, PELTIER JM, BONIFACE JJ, SMITH R, LESSNICK SL, SAHASRABUDHE S, STOCKWELL BR (2007). RAS–RAF–MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* **447**: 865–869.
- YANG WS, STOCKWELL BR (2008). Synthetic Lethal Screening Identifies Compounds Activating Iron-Dependent, Nonapoptotic Cell Death in Oncogenic-RAS-Harboring Cancer Cells. *Chem Biol* **15**: 234–245.
- YANG Y, LIU T, HU C, XIA H, LIU W, CHEN J, WU S, JIANG Y, XU Y, LIU W, ZHAO L (2021). Ferroptosis inducer erastin downregulates androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. *Oncol Rep* **45**(4):25.
- YU H, YANG C, JIAN L, GUO S, CHEN R, LI K, QU F, TAO K, FU Y, LUO F, LIU S (2019). Sulfasalazine-induced ferroptosis in breast cancer cells is reduced by the inhibitory effect of estrogen receptor on the transferrin receptor. *Oncol Rep* **42**: 826–838.
- ZHANG F, TAO Y, ZHANG Z, GUO X, AN P, SHEN Y, WU Q, YU Y, WANG F (2012). Metalloreductase Steap3 coordinates the regulation of iron homeostasis and inflammatory responses. *Haematologica* **97**: 1826–1835.
- ZHANG X, SUI S, WANG L, LI H, ZHANG L, XU S, ZHENG X (2020). Inhibition of tumor propellant glutathione peroxidase 4 induces ferroptosis in cancer cells and enhances anticancer effect of cisplatin. *J Cell Physiol* **235**(4):3425-3437.
- ZHANG X, MA Y, MA J, YANG L, SONG Q, WANG H, LV G (2022). Glutathione Peroxidase 4 as a Therapeutic Target for Anti-Colorectal Cancer Drug-Tolerant Persister Cells. *Front Oncol* **12**: 1–12.
- ZHAO W, CONG Y, LI HM, LI S, SHEN Y, QI Q, ZHANG Y, LI YZ, TANG YJ (2021). Challenges and potential for improving the druggability of podophyllotoxin-derived drugs in cancer chemotherapy. *Nat Prod Rep* **38**: 470–488.
- ZHOU HH, CHEN X, CAI LY, NAN XW, CHEN JH, CHEN XX, YANG Y, XING ZH, WEI MN, LI Y, WANG ST, LIU K, SHI Z, YAN XJ (2019). Erastin Reverses ABCB1-Mediated Docetaxel Resistance in Ovarian Cancer. *Front Oncol* **9**:1398.

