



**T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**MDA-MB-231 ve MCF-7 İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE  
DİZİLERİNDE DOSETAKSOL, KARBOPLATİN, GEMŞİTABİN'İN  
YAPTIĞI SİTOTOKSİSİTE ÜZERİNE, VERAPAMİL'İN  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Dilek (ABİ) YEĞİN**

**UZMANLIK TEZİ**

**BURSA - 2009**



**T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**MDA-MB-231 ve MCF-7 İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE  
DİZİLERİNDE DOSETAKSOL, KARBOPLATİN, GEMSİTABİN'İN  
YAPTIĞI SİTOTOKSİSİTE ÜZERİNE, VERAPAMİL'İN  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Dilek (ABİ) YEĞİN**

**UZMANLIK TEZİ**

**BURSA – 2009**



**T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**MDA-MB-231 VE MCF-7 İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE  
DİZİLERİNDE DOSETAKSOL, KARBOPLATİN, GEMSİTABİN'İN  
YAPTIĞI SİTOTOKSİSİTE ÜZERİNE VERAPAMİL'İN  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Dilek (ABİ) YEĞİN**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışmanı: Doç. Dr. Engin ULUKAYA**

**BURSA - 2009**

## İÇİNDEKİLER

<b>TÜRKÇE ÖZET</b>	.....	<b>ii - iii</b>
<b>İNGİLİZCE ÖZET</b>	.....	<b>iv - v</b>
<b>GİRİŞ</b>	.....	<b>1 - 15</b>
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	.....	<b>16 - 24</b>
<b>BULGULAR</b>	.....	<b>25 - 45</b>
<b>TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	.....	<b>46 - 50</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	.....	<b>51 - 60</b>
<b>EKLER</b>	.....	<b>61 - 62</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	.....	<b>63</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	.....	<b>64</b>

## ÖZET

Kanser tedavisinde çok sayıdaki kemoterapötik ilaçlara direnç en yaygın klinik problemdir. Bu direnç primer tedavi sırasında yada tedavi sonrası kazanılmış olabilmektedir. Çoklu ilaç direnci denilen bu durum, başarılı kanser tedavisinde en büyük engeli teşkil etmektedir. Çoklu ilaç direncinin en sık sebebi p-glikoprotein'in intrinsek yada ekstrinsek olarak gelişen aşırı ekspresyonudur.

Kalsiyum kanal blokörü olup hipertansiyon, supraventriküler taşikardi, hipertrofik kardiyomiyopati tedavisinde kullanılan verapamil, p-glikoprotein ekspresyonunu azaltmaktadır. Ayrıca verapamilin kanser hücrelerindeki ilaç direncini düzelttiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanser hücre dizilerinde verapamili tedavide kullanılan ajanların değişik dozları ile kombine ederek, düşük tedavi dozlarının etkinliğinin artırılıp artırılmadığı araştırıldı. Böylece meme kanserinde yeni tedavi yaklaşımlarının bulunması planlandı.

Bu nedenle dosetaksol, gemsitabin ve karboplatin kanser ilaçları seçildi. Dosetaksol, gemsitabin ve karboplatin hem tek başlarına hem de verapamil ile kombine edilerek kullanıldı. Diğer bir nedende bu ilaçlarla ilgili mevcut literatürlerde çok az sayıda bilginin mevcut olmasıydı.

Çalışmamızda verapamilin, hem MDA-MB-231 hemde MCF-7 hücre dizilerinde dosetaksolün ve karboplatinin sitotoksitelerini arttırdığı bulundu. Aynı zamanda verapamilin, gemsitabinin etkinliğini hücre tipine bağlı olarak modifiye ettiği görüldü. Aynı zamanda verapamil tüm ilaç gruplarında ve her iki hücre dizisinde kaspazla kırılmış sitokeratin 18'i (M30 antijeni) arttırdığı saptandı. Fakat bu etkinin MCF-7 hücre dizilerinde çok daha belirgin ve şiddetli olduğu görüldü.

Sonuç olarak bu bulgulara dayanarak ileri araştırmaların (hayvan ve insan deneyleri) planlanmasının uygun olabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Verapamil, oklu ila direnci, meme kanseri, p-glikoprotein.

## **SUMMARY**

### **Investigation into the effects of verapamil on the cytotoxicity of docetaxol, gemcitabine and carboplatine in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines**

Resistance to chemotherapeutic drugs is the most common and serious clinical problem in cancer treatment. During the primary treatment or after treatment period, the resistance may occur. This situation is called multi-drug resistance which is the most important challenge in successful cancer treatment. The common reason for the multi-drug resistance is the over expression of p-glycoprotein.

Verapamil is a calcium channel blocker that is used for hypertension, supraventricular tachycardia and hypertrophic cardiomyopathy. In addition, it decreases the p-glycoprotein expression. It has therefore been thought that verapamil restores the resistance to the drugs in cancer cells.

In this study, MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines have been used to investigate the effect of verapamil in terms of its ability to increase the cytotoxic potential of chemotherapeutics at various doses. We thus aimed to create new therapeutic approaches to the treatment of breast cancer.

For this reason, docetaxol, gemcitabine, carboplatine were chosen to study in this thesis. Other reason was that little information is present in literature.

In our study, it was found that verapamil increased the cytotoxic effect of docetaxol and carboplatine in both cell lines of MDA-MB-231 and MCF-7.

In addition, verapamil modified the effectiveness of gemcitabine depending on the cell type. Verapamil combined with or without the chemotherapeutics at all the doses used in this study increased the caspase cleaved cytokeratin 18 (M30 Antigen) in both cell lines. However, this (M30 Antigen-inducing) effect was more pronounced in MCF-7 cells than MDA-MB 231 cells.

In conclusion, taking into account the data above, we suggest that further research on laboratory animals or clinical phase trials in vivo are warranted.

**Key Words:** Verapamil, multi-drug resistance, breast cancer, p-glycoprotein.



# GİRİŞ

## I. 1. Meme Kanseri

Meme kanseri tüm dünyada kadınlarda en sık rastlanan malignitedir ve kanserden ölüm sebepleri arasında önemli bir yer tutmaktadır (1).

### I. 1. 1. Meme Kanseri İnsidansı

Meme kanseri tüm dünyada kanser ölümleri içinde akciğer, mide, kolon-rektum, karaciğer kanserleri nedeniyle oluşan ölümlerden sonra 5. sırada yer almaktadır (2). Her on kadından biri meme kanserine yakalanmaktadır. Yirmi yaş altında nadir görülmektedir (3). Avrupa'da yılda 180 bin, Amerika'da 184 bin yeni olgu saptanmaktadır. Kadınlarda ölüm nedeni olarak akciğer kanserinden sonra meme kanseri gelmektedir (4).

Sağlık bakanlığının 1999 yılı istatistiklerine göre kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseridir. Sırasıyla diğer kanser türleri mide, yumurtalık, deri, kolon kanserleridir. En sık görülen on kanser türünün % 24,1'ünü meme kanseri oluşturmaktadır (5).

### I. 1. 2. Meme Kanserinde Risk Faktörleri

#### A- Yüksek risk faktörleri ( 3 kat ya da daha fazla)

a. Yaş (40 yaşın üstünde)

b. Daha önceden diğer memede kanser öyküsü olması. Özellikle menopoz öncesi meydana gelenler önemlidir.

c. Ailede meme kanseri öyküsü olması. Meme kanseri insidansı özellikle anne, kız kardeş ve kız evlatlarda, yine teyze, kuzen, anneannede de artmış olarak görülür. Menopoz öncesi, bilateral ya da unilateral meme kanseri gelişen kadınların annelerinde, kız çocuklarında, kardeşlerinde risk daha yüksektir.

d. Atipi ile birlikte hiperplazi. Bening meme hastalarının birçok formu meme kanseri için predispozan faktör değildir. Bu durum, özellikle fibrokistik

hastalık için geçerlidir. Atipik hiperplazili memenin proliferatif hastalığı olanlarda risk 5 kat daha fazladır. Atipinin oluşturduğu risk, ailesinde meme kanser öyküsü olanlarda 11 kat daha yüksektir.

e. Parite. Nulliparlar ya da ilk doğumunu 31 yaşından sonra yapanlarda, ilk gebeliği 18 yaşından önce olanlara göre risk 3-4 kez daha fazladır.

f. Lobuler karsinoma insitu. İnvaziv kanser için %30 oranında risk taşır.

g. Erkeklerde risk faktörleri. Klinefelter sendromu, jinekomasti ve ailede erkek meme kanseri öyküsünün olması şeklinde sayılabilir.

## **B. Orta derecede risk faktörleri (1,2 -1,5 kez fazla)**

- a. Menstrüasyon öyküsü (erken menarş, geç menopoz)
- b. Oral östrojen alma
- c. Over, uterin fundus ya da kolon kanser öyküsü
- d. Diabetes mellitus
- e. Alkol alımı

## **C. Riski azaltan faktörler**

- a. Asya ırkı
- b. 18 yaş öncesi gebelik
- c. Erken menopoz
- d. 37 yaşından önce cerrahi kastrasyon

## **D. Risk faktörü olmayanlar.**

Daha önceden risk olduğu düşünülen fakat risk faktörü olmayanlar arasında multiparite, laktasyon ve emzirme sayılabilir (6).

## **I.1. 3. Meme Kanserinde Etyoloji**

### **A. Endokrin Etkenler**

#### **a) Üreme ile İlgili Etkenler**

- ▶ Erken menstruasyon yaşı, meme dokusunun östrojene maruz kalma süresini uzatır. Bu nedenden dolayı erken menarşın meme kanseri riskini arttırdığına inanılmaktadır (7).
- ▶ Uzun süren laktasyonların, ovulatuvar dönem sayısını azaltarak koruyucu etki yaptığı varsayılmaktadır (8,9).
- ▶ Doğurmamış ya da evlenmemiş kadınlarda meme kanseri görülme olasılığı daha fazladır (10,11).
- ▶ İlk doğumunu 35 yaşından sonra yapmış olmak ve geç menapoz da meme kanseri görülme olasılığını arttırmaktadır (10,11).

#### **b) Hormonal Etkenler**

- ▶ Gebelik ve laktasyonun meme kanserine karşı koruyucu olduğu ileri sürülmektedir (12).
- ▶ Oral kontraseptif (OKS) kullanım süresinin, meme kanseri riskini artırıp arttırmadığıyla ilişkili çalışma sonucuna göre, OKS kullanım süresi ile risk artışı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (13). Fakat 45 yaş altı kadınlarda uzun süreli OKS kullanımının etkisi araştırılmış ve meme kanseri riskinde anlamlı bir artışa neden olduğu gösterilmiştir (14).

#### **c) Genetik Etkenler**

- ▶ Meme kanseri olan anne, kız ve kızkardeşler arasında meme kanseri görülme olasılığı normal popülasyondan iki kat fazladır.
- ▶ Meme kanseri aile hikayesi olanlarda meme kanseri ortaya çıkma yaşı daha erken ve bilateral olma eğilimindedir (10,12).
- ▶ Son yıllarda ailevi meme kanseri ile ilgili olduğu düşünülen bazı genler izole edilmiştir (15,16). Bu genlerden birisi olan BRCA-1 (Breast Cancer-1) 17. kromozomun uzun bacağına yerleşmiştir. Mutasyon sonucu ailevi meme ve over kanserinde rol oynadığı saptanmıştır. Mutasyona uğramış BRCA-1 genine sahip kadınlarda 70 yıllık yaşam periyodunda meme kanseri olma olasılığı % 85 olarak hesaplanmıştır (17). BRCA-2 (Breast Cancer-2) geni hastalığın erken ortaya çıkmasında ve bilateral olmasında önemlidir.

► Meme kanseri oluşan bir kadında yaşamı boyunca ikinci meme kanseri oluşma riski % 25-30'dur. Meme koruyucu cerrahi sonrası kalan meme dokusu risk altındadır. Fakat bu risk, karşı memede oluşma riski kadar ve her yıl % 0.5-1'dir (18).

## **B- Diyet**

► Genel eğilim yağdan zengin beslenmenin meme kanseri riskini arttırdığı yönündedir (19). Birçok hayvan modellerinde gösterildiği gibi diyetteki hayvansal yağların % 10'dan fazla olması meme kanseri riskini arttırmakta, buna karşın diyetteki yağın % 5'in altında olması özellikle yağ içermeyen diyetle beslenme, tümörün büyümesini dahi inhibe edebilmektedir (10,20).

► Liftten zengin gıdaların barsaktan östrojen absorpsiyonunu engelleyerek meme kanserini önleyebileceği düşünülmektedir (21). Alkol kullanan kadınlarda da meme kanseri daha fazla görülmektedir (10).

## **C- Sosyoekonomik durum**

Sosyoekonomik açıdan düşük düzeyde bulunan kişi ya da toplumlarda meme kanseri görülme oranı daha azdır. Sosyoekonomik yönden gelişmiş toplumlarda meme kanserinin daha fazla görülme nedenleri arasında doğurmama, emzirmeme, aşırı yağ tüketimi, alkol tüketimi sayılabilir (10).

### **I. 1. 4. Meme Kanseri Sınıflandırılması**

#### **Meme Kanserinin Histopatolojik Sınıflaması**

I- Meme başının Paget hastalığı

II- Meme duktusları karsinomu

A-Noninfiltratif

B-İnfiltratif

1-Prodüktif fibrozis ile birlikte olan adenokarsinoma

2-Medüller karsinom

3-Komodo karsinom

4-Kolloid karsinom

5-Papiller karsinom

- 6-Tübüler karsinom
- III- Lobüler karsinom
  - A- Noninfiltratif
  - B- İnfiltratif
- IV- Memenin nadir karsinomları
- V- Meme sarkomu (18)

### **I. 1. 5. Meme Kanserinin Evrelemesi**

#### **TNM Sistemi (American Joint Committee'ye göre evreleme)**

T : Tümör

N : Nodül

M : Uzak metastaz

T0: Tümör çok küçük palpe edilebilir değil

T1: 2 cm'den küçük tümör, hiçbir fiziksel belirti yok

T2: 2 cm'den büyük tümör, deride çekilme ve meme başında retraksiyon

T3: Tümörün boyutları 5 cm veya 5 cm'den büyük, cilt infiltrasyonu, deri ödemi mevcut

T4: Tümörün boyutları belirsiz, cilt, meme başı retraksiyonu, ciltte ülserasyon, pektoral kaslara veya göğüs duvarına infiltrasyon mevcut

N0: Koltuk altı gangliyon palpe edilmiyor

N1: Koltuk altı gangliyon 1 veya 2 palpe ediliyor, mobil

N2: Gangliyon 2'den fazla, kısmen mobil

N3: Koltuk altı gangliyon dolu, fikse

M0: Metastaz yok

M1: Metastaz bir yerde

M2: Metastaz birden fazla yerde

Evre TIS : İn situ karsinom

Evre I : T1 N0 M0

Evre II : T0 N1 M0  
T1 N1 M0  
T2 N0 M0  
T2 N1 M0  
Evre III a : T0 N2 M0  
T1 N2 M0  
T2 N2 M0  
T3 N0 M0  
T3 N1 M0  
T3 N2 M0  
Evre III b : Herhangi T N3 M0  
Evre IV : Herhangi T herhangi N M1 (19)

## I. 1. 6. Meme Kanseri Tedavisi

### A - Erken Meme Kanseri

#### 1) Non-invaziv

- a) Duktal karsinoma insitu : Total mastektomi, alt seviyede aksilla diseksiyonu veya geniş lokal eksizyon, alt seviyede aksilla diseksiyonu + radyoterapi → Takip
- b) Lobüler karsinoma insutu : Lokal eksizyon veya Bilateral mastektomi → Takip

#### 2) İnvaziv

Evre I ve Evre II : Modifiye radikal mastektomi veya Kuadrantektomi + aksilla diseksiyonu + radyoterapi

- a) Lenf Nodu (-) : Premenopozal hasta → Relatif risk yok → Takip  
Relatif risk var → Kemoterapi
- b) Lenf Nodu (+) : Premenopozal hasta → Kemoterapi, (Radyoterapi!)  
Postmenopozal hasta → Kemoterapi ± Tamoksifen

### B - İleri Evre Meme Kanseri

1) Evre 3a ve Evre 3b : Biyopsi → Karsinoma → Neoadjuvan Kemoterapi

→ Yeniden evrenir

a) Evre 2 (cevap var) → Modifiye radikal mastektomi veya radikal mastektomi

b) Evre 3a 3b (cevap yok) → Kemoterapi

2) Evre 4

a) Hormon reseptörleri (+) → Premenopozal hasta → Ooforektomi + Kemoterapi + Radyoterapi

b) Hormon reseptörleri (-) → Kemoterapi + Radyoterapi (22)

### I. 1. 6. Meme Kanseri Tümör Belirteçleri

Meme kanserinde en çok kullanılan tümör belirteçleri: CA 15-3, MCA, CEA, TPA, TPS ve Cyfra 21.1'dir (24,25,26).

#### 1) Karbonhidrat Antijen 15-3 (CA 15-3)

Meme dokusunun epitel hücreleri tarafından üretilen yüksek molekül ağırlıklı glikoprotein yapısında bir antijendir. Günümüzde meme kanserinin yaygınlığını saptamada kullanılmaktadır. Organa veya tümöre özgün değildir. Duyarlılığı % 77'dir. Diğer tümör belirteçleriyle birlikte kullanıldığında duyarlılığı % 12-25 oranında artmaktadır (27).

#### 2) MCA ("Mücin-like Karsinoma Associated Antijen")

MCA bir serum glikoproteinidir. Normal dokuda MCA düzeyleri çok düşük olmasına karşın tümör sitozolünde yüksektir (28). Horgan ve ark.'ın (29) çalışmasında, bening meme hastalığı olan hastalarda, MCA seviyesinde yükselme olmadığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada meme kanserli hastalar arasında evre III ve evre IV olan hastalarda anlamlı bir artış saptanmıştır (29).

#### 3) Karsino Embriyonik Antijen (CEA)

Glikoprotein yapısında onkofetal tümör belirteçidir. Yetişkin insanların serumunda yüksek düzeyde olması malignite bulgusudur. Primer olarak kolorektal kanserlerde kullanılır. Ayrıca meme, akciğer, pankreas, mide, serviks, mesane, böbrek, tiroid, karaciğer ve over kanserlerinde de

yükselmektedir. Erken evre meme kanserinde duyarlılığı düşük olmasına rağmen metastatik meme kanserlerinde % 40-50 olguda yükseldiği gösterilmiştir (30).

#### **4) Doku Polipeptid Antijen (TPA)**

Tümör hücrelerinin membranında ve epitel hücrelerinde bulunan doku polipeptid antijenidir (31). Serum düzeyindeki yükseklik, hücrelerdeki proliferasyonu gösterir (32).

#### **5) Epidermal Büyüme Faktör Reseptör (EGFR)**

6000 kDA ağırlığında bir peptittir. Birçok çalışma EGFR'nin meme kanserinde prognostik ve prediktif değeri olduğunu ortaya koymuştur (33).

#### **6) Katepsin D**

52 kDA ağırlığında, asidik lizozomal bir proteaz olan fosfoglikoproteindir. Katepsin D geni meme kanserli hastalarda aşırı ekspresyon gösterir (34).

#### **7) p53**

p53, tümör baskılayıcı genlerdendir. p53 proteini, transkripsiyon faktörü olarak DNA'nın özgül bölgesine bağlanarak, diğer genleri düzenler. Gen hücreyi DNA hasarına karşı korur ve hasar olduğu zaman hücre çoğalmasını G1/S sınırında durdurarak, DNA onarımını başlatır. Onarımın gerçekleşmediği durumlarda ise apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmesini sağlar. Mutant p53 proteini meme, hemopoetik sistem, baş-boyun, endometrium, akciğer, kolon kanserlerinde belirlenmiştir (35).

#### **8) Karbonhidrat Antijen 549 (CA 549)**

Normal meme ve epitelyal dokularda bulunabilen bir glikoproteindir. Meme, akciğer, prostat, kolon kanseri olan hastaların serum düzeylerinde artış görülmüştür. Tedavi izlemi ve progresyon izlemi için kullanılmaktadır (36).



### **I. 1. 7. 1. Meme Kanserinde Kemoterapi**

Tek başına kullanılan sitotoksik ajanların çoğu ile vakaların % 20-35'inde kısmi yanıt (nadiren tam) alınır. Remisyon sıklıkla 4-6 ay sürer. En etkili tekli ajanlar doksorubisin ve taksanlardır. Dosetaksol (taksotere) meme kanserinin tedavisinde oldukça önemli sitotoksik ajandır (37). Dosetaksol özellikle karaciğer metastazı olan hastalarda etkilidir (6).

Çoklu kemoterapi tekli kemoterapiden üstündür (38). CMF (Siklofosfamid-metotreksat-5-Florourasil) protokolü özellikle klasik versiyonu başlangıç tedavisi için, prednizon ile birleştirildiğinde iyi bir seçimdir. Bu tedavi ile bir yıl veya daha uzun bir süreyle % 60 civarında yanıt beklenebilir.

Doksorubisinin, CA (siklofosfamid-Doksorubisin) ve FAC (5-Florourasil-Doksorubisin-Siklofosfamid) kombinasyonları da etkilidir. CMF (Siklofosfamid-Metotreksat-5-florourasil) veya CA (siklofosfamid-Doksorubisin) başarısız olunca ardışık tek ajanlar kullanılır.

Son evre hastalarda paklitaksol, doksetaksol, 5-florourasil, metotreksat, vinorelbin, mitomisin C ve prednizon kullanılan ajanlardır (6).

#### **Meme kanseri tedavisinde klinikte kullanılıp, tezde de kullanılan ilaçlar;**

**Dosetaksol:** Mikrotübüler depolimerizasyon inhibitörüdür (40,41). Mitoz zehiri olarak bilinirler. Siklusun M dönemine özgü ilaçlardır. B tübülün proteinine bağlanırlar ve tübülün proteininin polimerizasyonunu stimüle ederler. Böylece mikrotübül oluşumunu artırırlar ve fonksiyonel olmayan mikrotübül sentezi oluşur (39). Yan etkileri paklitaksele benzer myelosüpresyon ve ciddi sıvı retansiyonuna neden olur (40,41).

**Gemsitabin:** Bir deoksisitidin analogudur. Hücre fazı spesifiktir. Temel olarak S fazındaki hücreleri öldürür. Hücrelerin G1 fazına ilerlemesine engel olur ve S fazında tutar. Hücre içinde aktif difosfata ve trifosfata metabolize olur. Ribonükleotid redüktazı inhibe eder. DNA yapısına katılmak için deoksitidin trifosfatla yarışır.

Yaklaşık tamamı aktif ilaç ve metabolitleri şeklinde idrarla atılır. Myelosüpresyon doz kısıtlayıcı toksisitedir. Bunun dışında grip benzeri tabloyla beraber ateş, bulantı, kusma, diare, stomatit, döküntü gibi yan etkilere neden olabilir (41).

Ön ilacın hücre içine taşınma sistemlerinde meydana gelen değişiklik ve ilaç metabolizmasında rol oynayan enzimlerin düzeylerinde meydana gelen değişiklikler bu ilaca rezistans gelişmesinde rol oynayabilir (40).

**Karboplatin:** Sitotoksik ilaçların alkilleyici grubundandır. Alkilleyici ilaçlar hücre içindeki nükleofilik maddelerle kovalent bağlar yapma özelliği olan ilaçlardır. Etki DNA molekülünün bir kısmının çift zincir halinde olmadığı ve alkilasyona daha duyarlı olduğu replikasyon sırasında olur. Esas etki S dönemi sırasında ortaya çıkarak G2'nin blokajı ve bunu takiben hücre ölümü ile sonlanır (42) . Sisplatin kadar güçlü bir antineoplastik ajandır ancak renal toksisite, ototoksisite, nörotoksisite ve emetik etkisi daha düşük olan bir ajandır. Myelosüpresif etkisi sisplatine nazaran daha fazladır. Özellikle trombositopeniye yol açar. Sisplatinin etkin olduğu tüm hastalıklarda kullanılabilir (40).

### **I. 1. 7. 2. İlaç Direnci**

Kemoterapi, meme kanserinde yaşam süresini uzatmada başlıca sistemik tedavi modalitesidir. Bununla birlikte hastaların hiç biri çeşitli ilaç direnç mekanizmaları yüzünden kemoterapi ile kür edilemezler (43).

#### **İlaç Direncininin Genel Mekanizmaları:**

##### **A) Hücresel ve Biyokimyasal mekanizmalar**

- a) İlaç birikiminin azalması
  - ▶ İlacın hücreye alımının azalması
  - ▶ İlacın dışarıya atılımının artması
  - ▶ İlacın intrasellüler dağılımındaki değişiklikler
- b) Değişmiş ilaç metabolizması
  - ▶ İlaç aktivasyonunun azalması
  - ▶ İlaç/toksik ara ürünün artmış inaktivasyon
- c) İlaçla indüklenen hasarın artmış tamiri
- d) İlaç hedeflerindeki değişiklikler, kalitatif ve kantitatif
- e) Metabolik seviyenin değişmiş kofaktörleri
- f) Azalmış apoptozis

## **B) İn vivo ile ilgili mekanizmalar**

### **a) Konak-ilaç etkileşimleri**

- ▶ Normal dokular ile artmış ilaç etkileşimleri
- ▶ Normal dokularla azalmış ilaç aktivasyonları
- ▶ Normal doku ilaç sensitiviti/toksisitesinde göreceli artış

### **b) Konak-tümör etkileşimleri (43).**

## **I. 1. 7. 3. Çoklu İlaç Direnci**

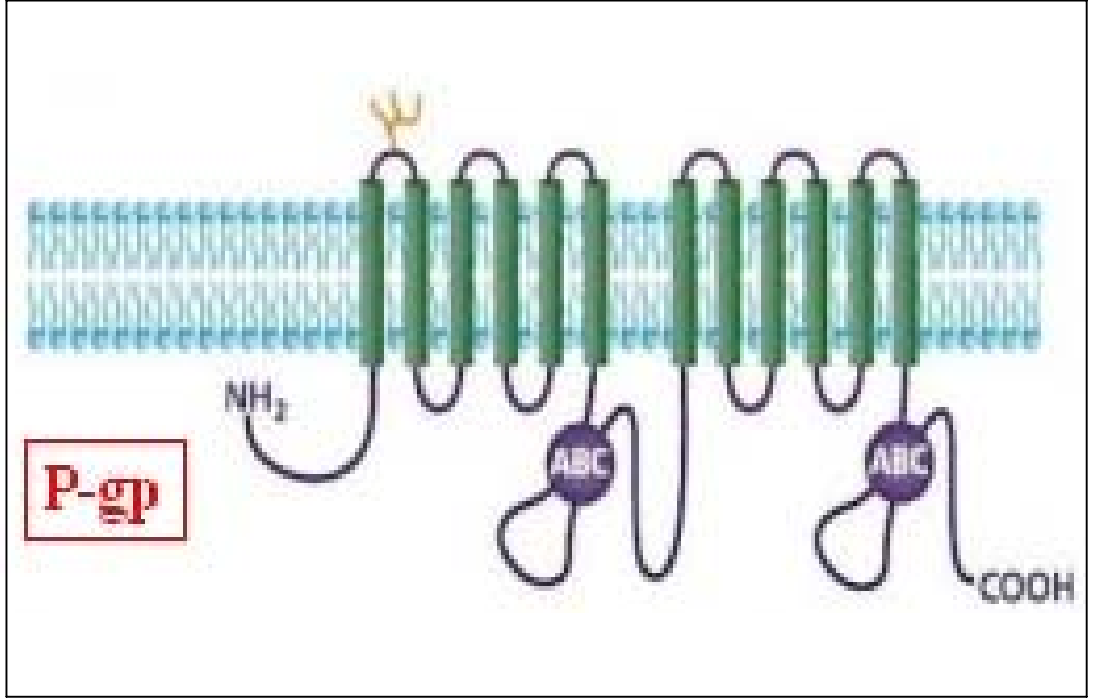
Kanser tedavisinde çok sayıdaki kemoterapötik ilaçlara direnç en yaygın klinik problemdir. Bu tip rezistansa çoklu ilaç direnci denir ki; bu primer tedavi sırasında (intrinsik) yada tedavi sonrası kazanılmış olabilir (44-46).

## **I. 1. 7. 4. P-glikoprotein**

P-gp (p-glikoprotein), birçok ilacın transportunu gerçekleştiren ATP bağımlı bir transmembran proteindir. Tümör hücrelerinde eksprese olmasının ve çoklu ilaç rezistansında rol oynamasının yanı sıra karaciğer, böbrek, ince bağırsak, kolon, beyin, kalp, periferel sinirler, plasenta, adrenal bezler ve testis gibi normal dokularda da bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca kan-beyin ve kan-testis bariyeri gibi kan-doku bariyerlerinde de bulunmaktadır.

Özellikle ince bağırsak, santral sinir sistemi, karaciğer ve böbrek gibi ilaç emilimi, dağılımı ve atılımında rol oynayan dokularda yüksek oranda eksprese edilmesi p-gp'in substratı olan ilaçların farmakokinetiğinde-toksikokinetiğinde kritik bir rol oynayabilme özelliği kazandırmaktadır.

Aralarında çeşitli antineoplastikler (vinka alkaloidleri, antrasiklinler, taksenler, epipodofilotoksinler), HIV proteaz inhibitörleri, immüsupresanlar, kardiyovasküler sistem ilaçları ve antimikrobiyal ilaçlar gibi klinik pratikte sıkça kullanılan ilaçların da bulunduğu birçok ilaç molekülü p-gp substratı olma özelliği göstermektedir (47, 49).



**Şekil 1:** P-glikoprotein yapısı

P-gp hücre içi ilaçları hücre dışına tek taraflı olarak nakleder. Böylece kanser hücreleri, antikanser ilaç saldırısından kaçabilirler.

Çoklu ilaç direnci, başarılı kanser kemoterapisine en büyük engeldir. Çoklu ilaç direncinin en sık sebebi p-gp'nin aşırı ekspresyonudur. Pek çok insan kanserinde doğal ve kazanılmış ilaç direncinden sorumludur (47).

#### **I. 1. 7. 5. Meme Kanserinde Çoklu ilaç Direnç Mekanizmaları**

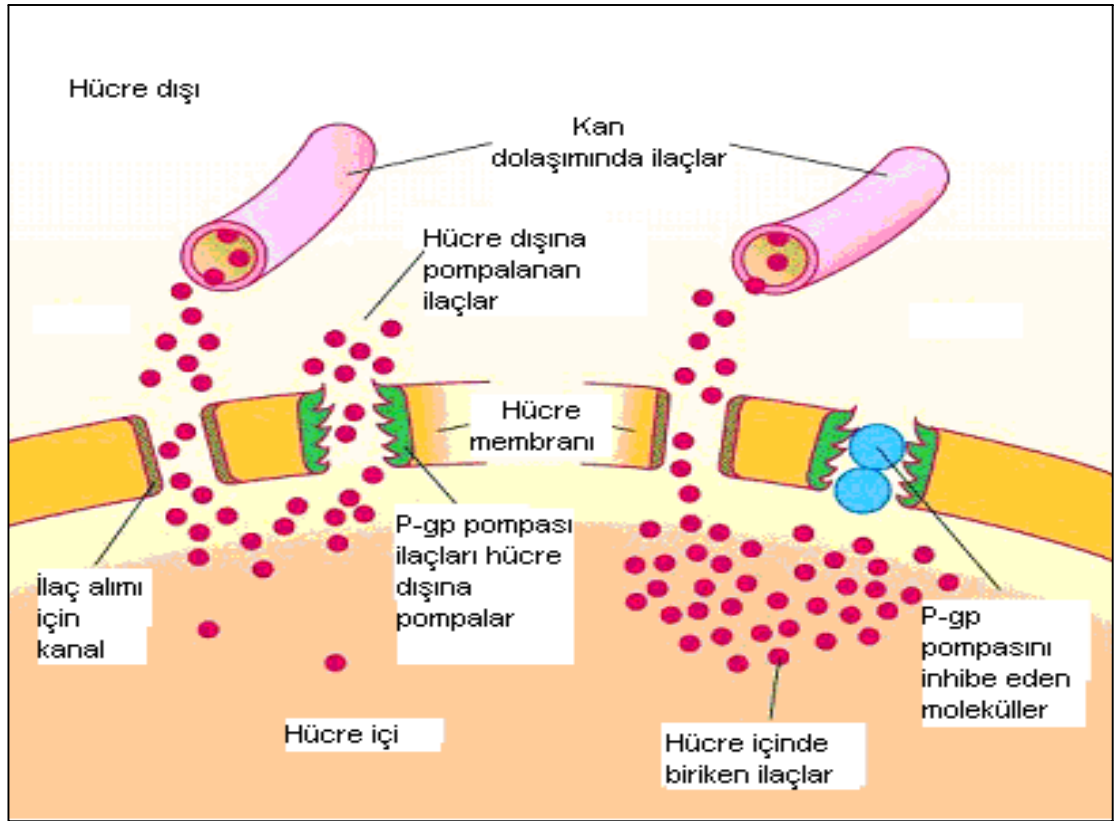
##### **1) P-glikoprotein**

Meme kanserli hastalarda MDR1 (multidrug resistance 1) gen ekspresyonunun pozitifliği % 0-100 arasındaki değişen oranlarla ilişkilendirilmiştir (48-57). Merkel meme kanserli hastalarda MDR1 gen ekspresyonu tespit etmezken, diğer araştırmacılar primer meme kanserli hastalarda MDR1 gen ekspresyonunu % 16-56 değişen oranlarda tespit etmişlerdir (48,50-52). Sonuçlardaki bu çelişki RT-PCR (eş zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu) gibi gen ekspresyonunu tespit etmek için farklı

metodların kullanımına bağlı olabilmektedir. RT-PCR bazlı çalışmalarda MDR1 gen ekspresyonu % 60-100 olarak tespit edilmiştir (53,54,55-57).

## 2) MRP1 (“Multidrug resistance-associated protein 1”)

Daha önceki çalışmalarda RT-PCR metodu kullanılarak yapılan MRP1 pozitifliği % 70-100 oranında tespit edilmiştir (55,56). Meme kanserli hastalarda gen çalışmalarının sonuçlarına benzer olarak, immünohistokimyasal teknik ile protein ürünleri p-gp ve MRP1 % 0-100 oranında tespit edilmiştir (58,59-62). Çalışmalar arasında tespit edilen protein ürünleri arasındaki farklılıklar ya çalışılan hastaların heterojen grup olmasından yada boyanma için kullanılan monoklonal antikörlerin farklı olmasından kaynaklanabilir.



Şekil 2: P-glikoprotein pompasının işlevi.

### **3) LRP (“Lung cancer resistance-related protein”)**

P-gp ve MRP1’in yanı sıra meme kanserli hastaların ilaç direncinde başka proteinlerin de rolü vardır. LRP, çoklu ilaç direncine dahil olan başka bir membran pompasıdır. LRP, 110 kDa ağırlığında bir protein olup ve MRP1 geninin yakınındaki kromozom 16 üzerinde lokalizedir (63). LRP hücre nükleus ve sitoplazma arasında pompa gibi hücre fonksiyonunda major proteindir. Doku dağılımı MRP1’e benzer olarak tespit edilmiştir (64). LRP’nin fonksiyonuyla ilgili çalışmalar nadirdir, fakat MCF-7 meme kanseri hücre dizilerinde LRP ekspresyonu gözlenmiştir (65).

### **4) BCRP (“Breast cancer resistance protein”)**

Son zamanlarda keşfedilmiş başka bir ilaç direncine dahil olan proteindir (66). Her ne kadar hücre kültürlerinde çeşitli ilaçlara karşı dirence neden olduğu gösterilmişse de, bunun kanserli hastalardaki rolü henüz tanımlanmamıştır (67).

## **I. 1. 7. 6. Çoklu İlaç Direnç Sorununun Aşılması**

Çoklu ilaç direnç fenotipinin tanımlanmasından ve bununla ilişkili membran proteinlerinin keşfinden itibaren bunlarla ilgili bir çok çalışmalar yapılmıştır (68,69). Çoklu ilaç direncini modüle edebilen farmakolojik ajanlar için yapılan çalışmaları haklı gösteren pek çok neden vardır.

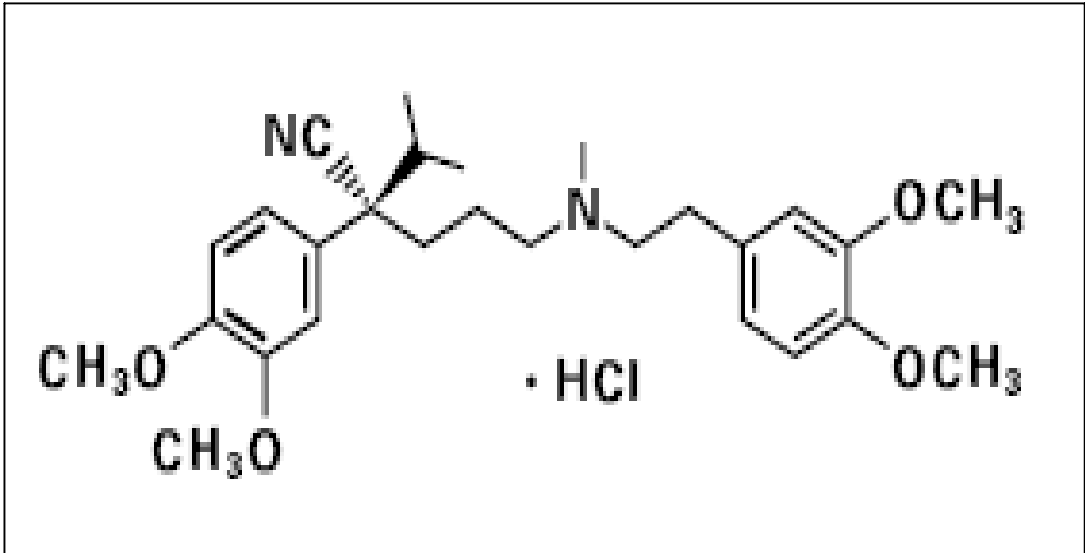
Genel olarak çoklu ilaç direnciyle ilişkili genler, klinik olarak dirençli tümörlerde ve bazı vakalarda yüksek oranda ekspresse edilir ve bazı vakalarda bu genlerin kemoterapiden sonra aktive olabildiği görülmektedir, bu da tümör hücreleri için bunun yaşamsal bir mekanizma olduğunu akla getirmektedir.

Bugüne kadar, çeşitli farmakolojik ajanların çoklu ilaç direnciyle ilişkili proteinlerin transport substratları olabilecekleri rapor edilmiştir (68,69). Bu ilaçlar kemoterapi ilaçlarına hücrelerin duyarlılaştırılması ve çoklu ilaç direnç pompasının inhibe edilmesiyle ilgililerdir. İlaç pompa inhibitörlerinden bazıları şunlardır; verapamil, siklosporin, nifedipin, kinidin ve reserpin (70,71).

### I.1. 7. 7. Verapamil

Yapısı papaverine benzemektedir. Fenilalkilamin türevidir. Kalsiyum kanal blokörü olup, kalp, damar ve gastrointestinal düz kaslarda hücre içine kalsiyum girişini inhibe etmektedir. Negatif inotrop etkilidir. Hipertansiyon, anjina pectoris tedavisinde, hipertrofik karyomiyopatide, antiaritmik olarak paroksizmal supraventriküler taşikardi, atriyal fibrilasyon ve flater tedavisinde kullanılmaktadır (42).

P-gp inhibitörleri ile ilgili çalışmalar yirmi yıla yakın bir süredir devam etmektedir. Verapamil kalmodulin antagonistleri, protein kinaz C inhibitörleri, immünosupresif ilaçlar, eritromisin, kinin, fluphenazine ve rezerpin ile birlikte birinci kuşak çoklu ilaç direnci modülatörleri arasında yer almaktadır (72).



**Şekil 3:** Verapamilin molekül yapısı.

Verapamil P-gp ekspresyonunu azaltmaktadır (47). Bu nedenle verapamil P-gp aracılıklı ilaç direncinin önlenmesinde denenmektedir (6).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### II. 1. Hücre Kültürü;

#### II. 1. 2 Kullanılan Hücre Dizileri

- MDA-MB-231 Hücre dizisi:**
- ▶ İnsan meme kanseri hücre dizisi
  - ▶ Östrojen reseptörü (-)
  - ▶ E-kaderin (-)
  - ▶ Kaspaz 2: (+), Kaspaz 3: (+)
  - ▶ Plevral efüzyondan elde edilmiştir.
  - ▶ Yüksek oranda invaziv

- MCF-7 Hücre dizisi:**
- ▶ İnsan meme kanseri hücre dizisi
  - ▶ Östrojen reseptörü (+)
  - ▶ Kaspaz 2: (+/-), Kaspaz 3: (-)
  - ▶ Human breast adenokarsinoma
  - ▶ Plevral efüzyondan elde edilmiştir.
  - ▶ Daha az oranda invaziv

#### II. 1. 3. Kullanılan Besiyerleri, Sıvılar ve Hücrelerin Üretilmesi

MDA-MB-231 hücre dizisi için RPMI 1640 besiyeri (Hyclone, USA) kullanıldı. İçerisine % 5 Newborn calf serum (Hyclone USA), % 1 L-glutamine (EuroClone Europe), % 1 Penisilin-Streptomisin (Hyclone, USA ) ilave edildi.

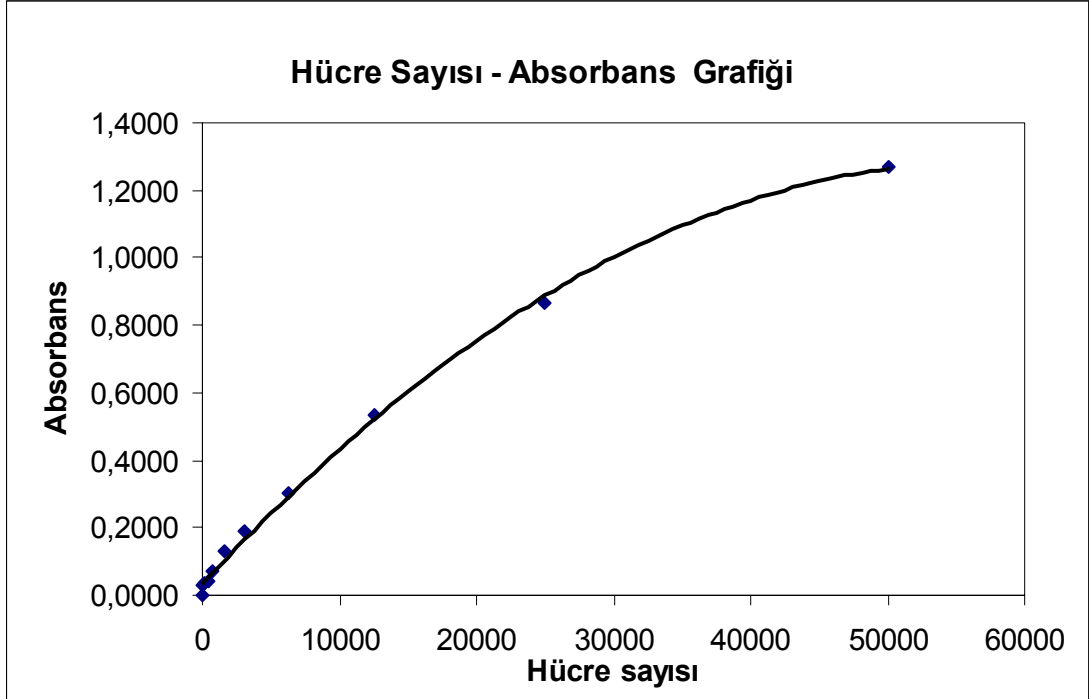
MCF-7 hücre dizisi için RPMI 1640 besiyeri (Hyclone USA) kullanıldı. İçerisine % 10 Fetal bovin serum (Biochrom AG Berlin), % 1 Penisilin-Streptomisin (Hyclone, USA ) ilave edildi.

Hücre kültür kablarına ekilen hücreler besiyeri içerisinde % 5'lik CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 37°C'de büyütüldü.



## II. 2. Metiltiazoltetrazolium (MTT) metodu:

MTT metodu, hücrelerdeki dehidrogenaz aktivitesini ölçen kolorimetrik bir yöntemdir. Total dehidrogenaz aktivitesi ile hücre sayısı arasında doğru ilişki olduğu Mosmann ve ark. tarafından gösterilmiştir (73).



**Şekil 4:** MTT metodu ile MDA-MB-231 hücrelerinin 570 nm'de verdikleri absorbans değerleri.

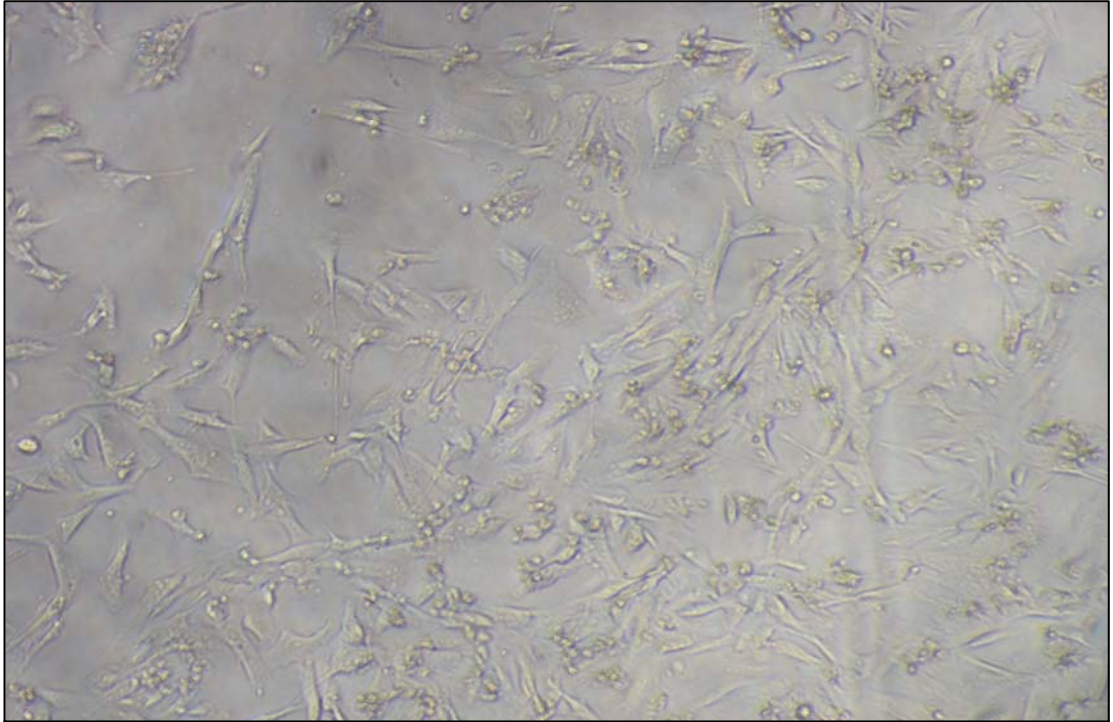
Bu yöntemde MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri sayılarak 5.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kablarna ekildi. 24 saat 37°C, % 5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyonu takiben yapışmış olan hücreler zedelemenden üzerlerinden 100 µl (mikrolitre) besiyeri aspire edildi. Çeşitli dozlarda kemoterapötikler ve verapamil 100 µl olacak şekilde üzerlerine uygulandı. İlaç tedavisini takiben hücreler 72 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 5 ve 7).

► 72. saatin sonunda tüm kuyucuklara MTT solüsyonu (3-2,5-diphenyltetrazolium bromide, PBS (fosfatlı tuzlu tampon) içerisinde (5mg/ml, pH:7.2 ) 25 µl olacak şekilde ilave edilerek karanlıkta 37°C, % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 4 saat inkübe edildi.

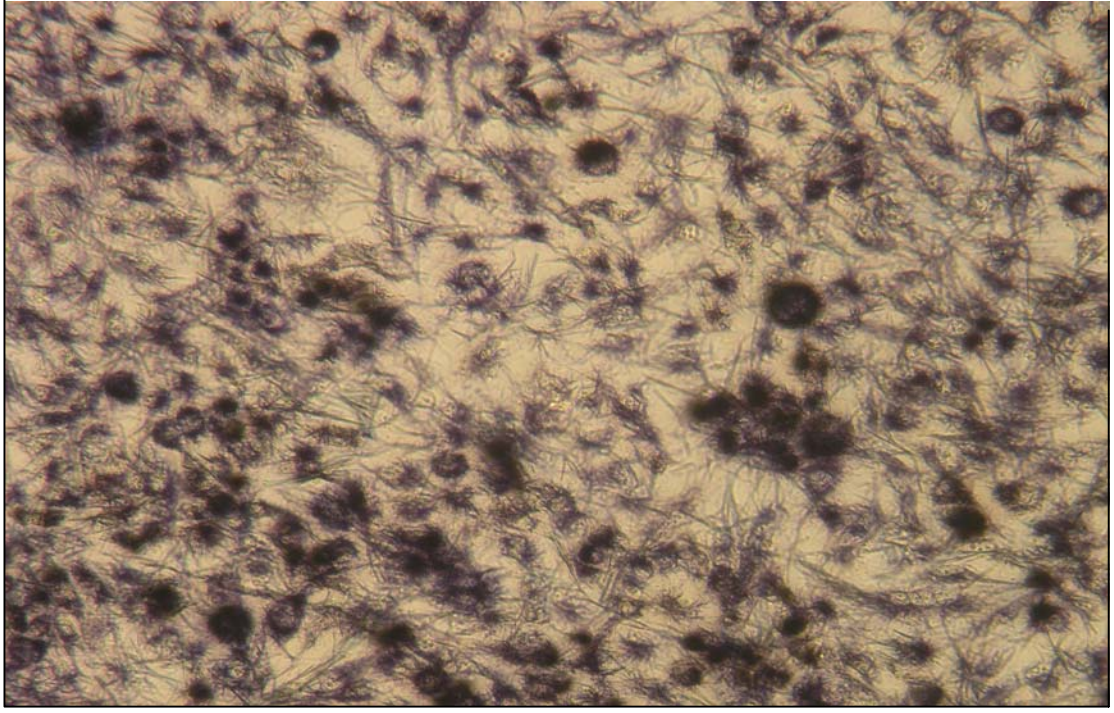
► İnkübasyonun sonunda MO'da (ilaç uygulanmamış kontrol hücre grubu, maksimum yaşam) çok fazla sayıda, MI'da (minimum yaşam) ise birkaç tane olmak üzere koyu mavi renkli formazon bileşikleri (Şekil 6 ve 8) meydana geldi. Oluşan formazan bileşiklerini çözünebilir hale getirebilmek için bütün kuyucukların üzerine Sodyum Dodecyl Sülfat (SDS) solüsyonundan (0,01 N HCl'li % 10'luk SDS tamponu) 100 µl olacak şekilde eklendi. 18 saat, 37°C, % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi.

► Oluşturdukları renk şiddeti spektrofotometre (FLASHScan S12) ile 570 nm dalga boyunda ölçüldü.

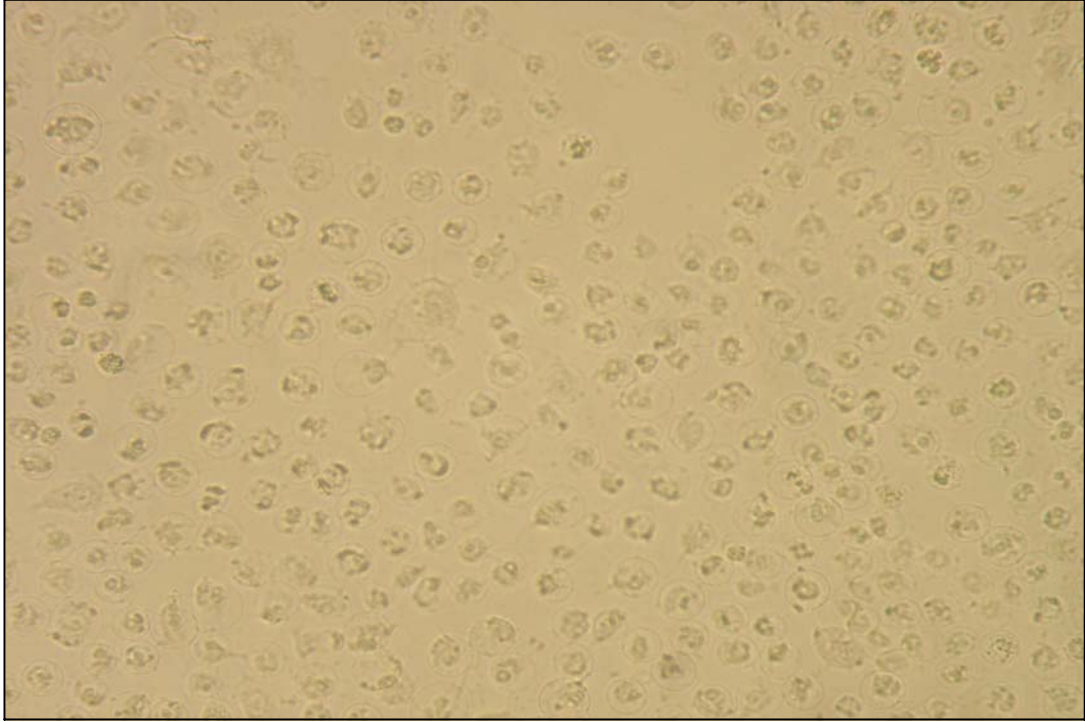
Aynı sayıda ekilmiş ve hiç ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerindeki (MO) renk şiddeti ile tedavi uygulanmış hücrelerdeki şiddeti oranlanarak tedaviye maruz bırakılmış hücrelerdeki ölüm oranı (yüzdesi) hesaplandı.



**Şekil 5:** MTT testi uygulamasından önce MDA-MB-231 hücreleri. MO grubu (maksimum yaşam, pozitif kontrol, ilaç uygulanmamış kontrol hücre grubu).

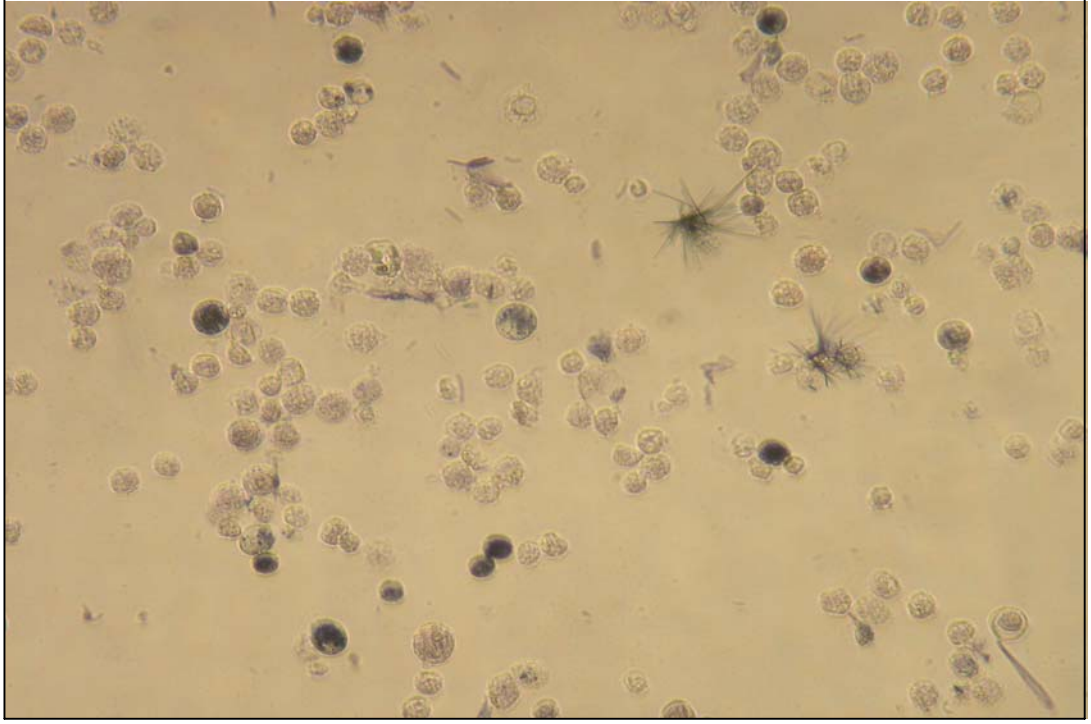


**Şekil 6:** MTT testi uygulamasından sonra oluşan formazon kristalleri. MDA-MB-231 hücreleri. MO grubu (maksimum yaşam, pozitif kontrol, ilaç uygulanmamış kontrol hücre grubu).



**Şekil 7:** MTT testi uygulamasından önce MDA-MB-231 hücreleri. MI grubu (minimum yaşam, negatif kontrol).



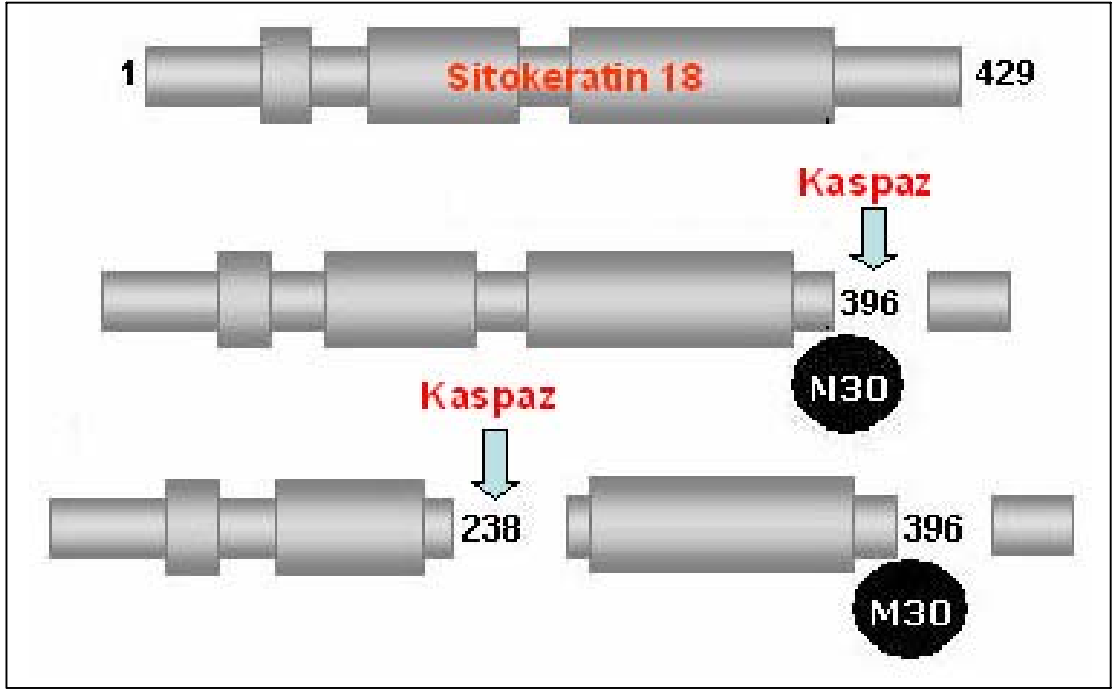


**Şekil 8:** MTT testi uygulamasından sonra oluşan formazon kristalleri. MDA-MB-231 hücreleri. MI grubu (minimum yaşam, negatif kontrol).

### **II. 3. M30 Antijen Metodu**

M30 antijen metodu, hücrelerin apoptozisle ölüp ölmediklerinin anlaşılmasını sağlayan bir yöntemdir. Apoptozise giden hücrelerde ortaya çıkan kaspazla kırılmış sitokeratin 18'in (M30 Antijen), ELISA yöntemiyle saptanması için 96 kuyucuklu hücre kültür kablarına 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapıldı. Ertesi gün hücrelere kemoterapötikler ve verapamil tedavisi uygulandı.

- ▶ Tedaviden 48 saat sonra tüm kuyucuklara Triton X 100 (%10 distile suda) 10 µl ilave edildi.
- ▶ 15 dakika oda sıcaklığında 600 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
- ▶ Kuyucuklardaki besiyeri ependorflara toplandı.
- ▶ 2000 rpm'de 30 sn santrifuj edilip M30 Apoptosense ELISA (PEVİVA, İsveç) kit prospektüsüne uygun olarak çalışıldı.
- ▶ Süpernatantlar kitin içinden çıkan striplere 25 µl pipetlendi.



**Şekil 9:** Sitokeratin 18'in kaspazlar ile kırılması ve M30 antikorumun bu bölgeleri tanınması.

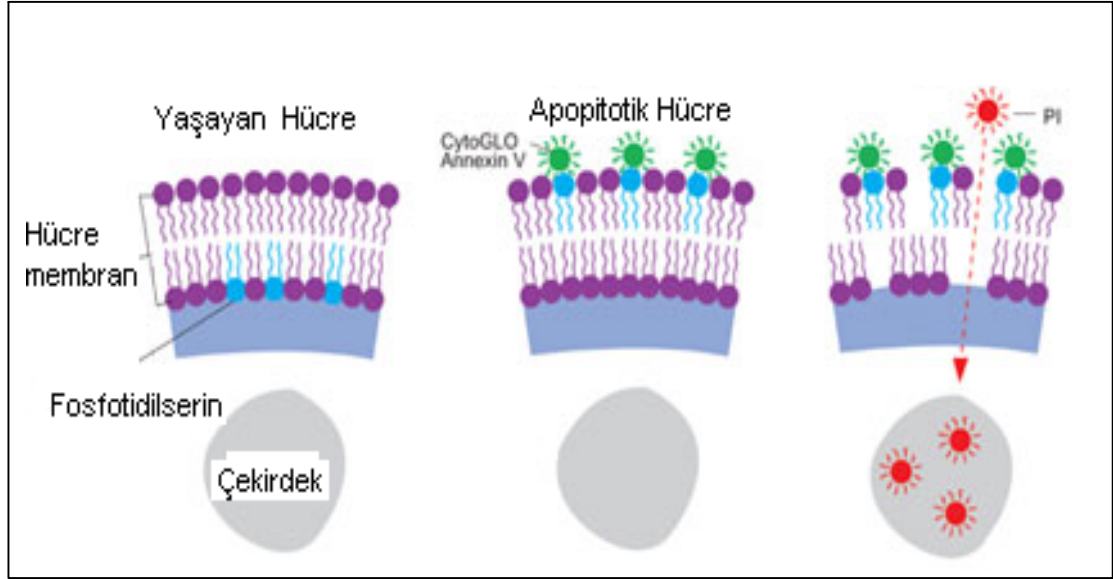
- ▶ Üzerlerine 75 µl konjugat eklendi .
- ▶ 4 saat 600 rpm'de oda sıcaklığında inkübe edildi.
- ▶ 250 µl yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
- ▶ 200 µl TMB substratı ilave edildi. 20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi.
- ▶ Reaksiyonu durdurmak için 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 100 µl stop çözeltisi ilave edildi
- ▶ Oluşan renk şiddeti spektrofotometrik olarak 450 nm'de (FLASHScan S12) okundu.
- ▶ Hesaplama standart eğri grafiği kullanılarak yapıldı.

#### **II. 4. Anneksin V ve Propidyum İyodür Boyama**

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde bulunan fosfotidilserin, hücre apoptozise giderse hücre zarının dış yüzüne transloke olur. Dış yüze transloke olan fosfotidilserinler, floresan bir madde ile

işaretlenmiş anneksin V kullanılarak görünür hale getirilir. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur.

Propidyum İyodür ise sadece ölü hücreleri yani membran bütünlüğü bozulmuş olan hücreleri boyayabilen bir boyadır. Membranı canlı (intakt) olan hücreler propidyum iyodür ile boyanmazlar. Propidyum iyodür pozitifliği nekrozisi gösterir.



**Şekil 10:** Anneksin V ve Propidyum iyodür boyama. (PI: Propidyum iyodür)

Hücreler altılı hücre kültür kablarna 500.000 hücre / 2 ml olacak şekilde ekildi. Ertesi gün hücrelere ilaç tedavisi uygulandı. 48 saat sonra Anneksin V boyama prosedürü uygulandı. Bunun için Anneksin-V-FLUOS Roche Mannheim Almanya kiti kullanıldı.

- ▶ Altılı hücre kültür kablarnadaki ekili hücrelerin üzerlerindeki süpernatantlar 14 ml'lik polipropilen santrifüj tüplerine toplandı.
- ▶ Hücrelerin üzerine 1 ml PBS (fosfatlı tuzlu tampon) ilave edilip kalan hücrelerde toplanarak aynı polipropilen santrifüj tüplerine konuldu.
- ▶ Hücre kültür kablarnadaki hücrelerin üzerine 200 µl tripsin ilave edildi. 4 dakika 37°C derecede bekletildi.
- ▶ 2 ml besiyeri ilave edilip aynı polipropilen santrifüj tüplerine toplandı.
- ▶ 4 dakika santrifüj edilip süpernatantı atıldı.

► Üzerlerine 80 µl hazırlanan boyama çözeltisinden koyulup iyice karıştırıldı. Karanlıkta 15-20 dakika 37°C'de inkübe edildi.

(Boyama çözeltisi: Az ışıklı ortamda 1.1 ml İnkübasyon buffer, 22 µl Anneksin 5-Fluorescein, 22 µl Propidium iyodur alınıp karıştırılarak hazırlandı).

► Temiz bir lam üzerine 17 µl hücre+boya solüsyonundan konularak lamelle kapatıldı. Lamelin çevresine kapatıcı sürülerek incelenecek solüsyonun hava alması engellendi.

## **II. 5. İmmünohistokimya**

Hücreler kuyucuk başına 500.000 hücre/2 ml besiyeri içinde olacak şekilde ekildi. Bir gece 37 °C'lik inkübatörde inkübe edildi. Ertesi gün uygun dozlarda kemoterapötikler ve verapamil ile tedavi uygulandı. 24 saat sonra tedavi olan hücrelerin süpernatantları polipropilen santrifüj tüplerine toplandı. Yapışmış durumdaki hücreler ise kürete edilerek yine aynı tüp içine toplandı. 800 rpm'da 5 dakika santrifüj edildi. Üst kısımları aspire edildi. 1 ml PBS (fosfatlı tuzlu tampon) ile karıştırıldı ("single cell suspension"). 2200 rpm'da 4 dakika sitosantrifüj edildi. Lamellerdeki hücreler 1 gece kurumaya bırakıldı.

► Lameller buzdolabında 4 °C derece soğukta 10 dakika tamponlanmış formalin (% 10, Ph:7,4) ile fikse edildi. Oda ısısında 15 dakika bekletildi. 2 ml PBS ile 2x10 dakika yıkandı.

► TritonX100 % 2'lik (100 ml PBS içerisine 2 ml % 10'luk TritonX100 konulur) ile 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. 2 ml PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

► Hücreleri kapatacak şekilde (yaklaşık 200 µl) PBS 'de çözülmüş % 8'lik BSA ile 1 saat muamele edildi. (Bu aşamada MDR antikoru hazırlandı ve buz üstüne bekletildi)

► BSA hafifçe lamellerin kenarından aspire edildi. Üzerine yıkama yapılmadan MDR(G-1):sc-13131 Roch Mannheim Almanya kiti kullanılarak MDR antikoru 100 µl steril pipet ucuyla pipetlendi. Buz üstünde 1 saat bekletildi. MDR antikoru: Mouse. 200 µg/ml. Sulandırma: 1:250 Ana stoktan 4 µl alıp 1000 µl PBS'e tamamlandı. 2 ml PBS ile 1x5 dakika yıkandı.

- ▶ Sekonder antikor uygulandı. Biotinlenmiş anti-fare, tavşan, keçi serumu kullanıldı. Her bir lamel üzerine 100 µl uygulandı ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi.
- ▶ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı: Lamel başına ikişer ml hazırlanan % 0,06'lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den uygulandı ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. (10 ml PBS içerisine % 30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 200 µl pipetlendi)
- ▶ 2 ml PBS ile 2x3 dakika yıkandı ve PBS aspire edildi.
- ▶ Her lamel üzerine Streptavidin HRP'den 100 µl uygulandı ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi.
- ▶ Lamellerin kenarından Streptavidin-HRP dikkatlice aspire edildi.
- ▶ 2 ml PBS ile 2x3 dakika yıkandı ve PBS aspire edildi.
- ▶ 100 µl DAB ile lameller karanlıkta 4-5 dakika muamele edildi.
- ▶ Distile su ile 2x3 dakika yıkandı.
- ▶ Lameller üzerine 100 µl 30 saniye hematoksilen uygulandı.
- ▶ Çeşme suyunda yıkandı. 2x3 dakika distile su ile yıkandı.
- ▶ Gliserol damlatıp mikroskop altında incelendi.

## İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmanın analizleri SPSS 13.0 paket programında yapıldı. Sürekli değişkenler ortalama ve standart sapma ile verildi. Yüzde canlılık değerlerinin ilaç ve doz gruplarına göre karşılaştırmaları ve ilaç-doz etkileşiminin önemliliği iki yönlü varyant analizi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırma testi olarak Tukey testi kullanıldı. Çalışmada  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



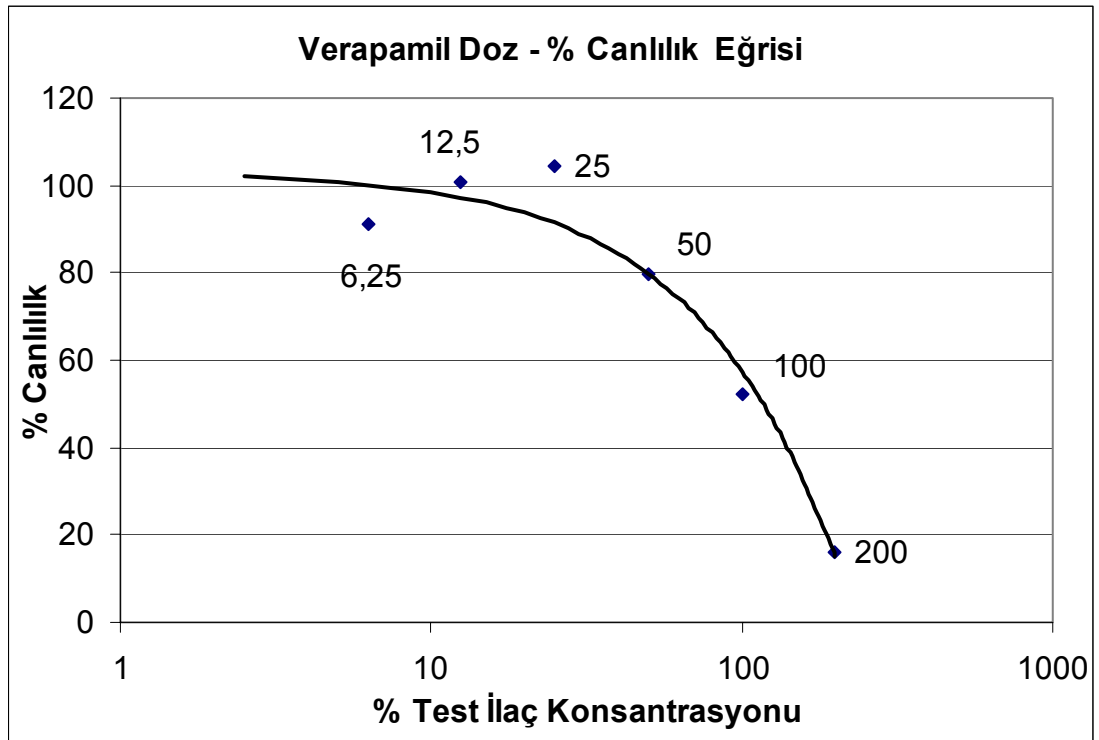
## BULGULAR

### IV. 1. Sitotoksitenin Değerlendirilmesi (MTT Testi Sonuçları)

#### IV. 1. 1. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Dizisinde

##### IV. 1. 1. 1. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinin Verapamile

##### Verdiği Yanıt



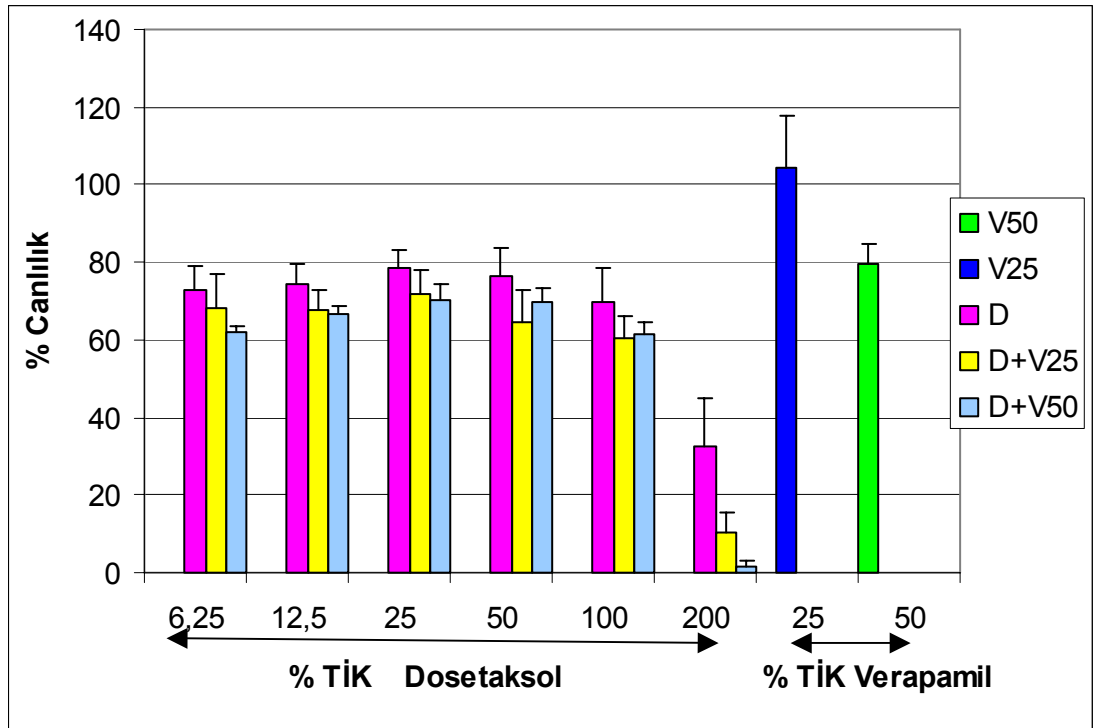
**Şekil 11:** MDA-MB-231 İnsan meme kanseri hücrelerinde 72 saatlik verapamil uygulaması sonrası MTT metoduna göre verapamil doz yanıt eğrisi. Test ilaç Konsantrasyon (TİK) değerleri: 200 TİK: 200µM, 100 TİK: 100µM, 50 TİK: 50µM, 25 TİK: 25µM, 12.5 TİK: 12.5µM, 6.25 TİK: 6.25 µM

MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerine, çeşitli konsantrasyonlarda verapamil (200,100, 50, 25, 12.5, 6.25 µM) tek başına uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık MTT metodu ile

değerlendirildi.  $IC_{50}$  (Hücrelerin yüzde 50'sini inhibe eden konsantrasyon), subletal doz ve subletal doza en yakın nontoksik dozlar belirlendi.

Çalışmanın bundan sonraki deneylerinde subletal doz olan 50  $\mu$ M verapamil ve nontoksik doz olan 25  $\mu$ M verapamil, meme kanseri tedavisinde kullanılan dosetaksol, gemsitabin ve karboplatin ile kombine edilerek kullanıldı.

#### IV. 1. 1. 2. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinin Dosetaksol ve Verapamile Verdikleri Yanıt



**Şekil 12:** MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde 72 saatlik dosetaksol ve dosetaksol +verapamil uygulaması sonrası MTT metoduna göre % canlılık düzeyleri. D:Dosetaksol, V25: 25  $\mu$ M Verapamil, V50: 50 $\mu$ M Verapamil. Test İlaç Konsantrasyon (TİK) değerleri (Dosetaksol) : 200 TİK: 22.6 $\mu$ g/ml, 100 TİK: 11.3 $\mu$ g/ml, 50 TİK: 5.65 $\mu$ g/ml, 25 TİK: 2.82 $\mu$ g/ml, 12.5 TİK: 1.41 $\mu$ g/ml, 6.25 TİK: 0.70 $\mu$ g/ml. Test İlaç Konsantrasyon (TİK) değerleri (Verapamil): 25 TİK: 25  $\mu$ M, 50 TİK: 50 $\mu$ M.

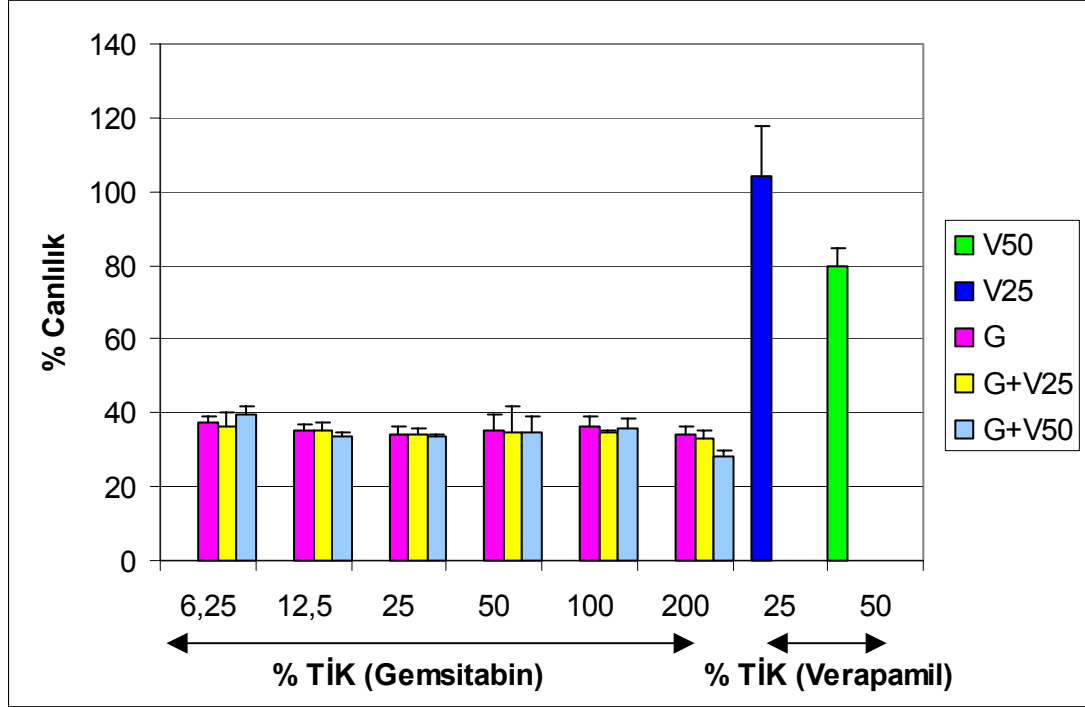
MDA-MB-231 İnsan meme kanseri hücrelerine çeşitli yüzde test ilaç konsantrasyonlarında (TİK), dosetaksol (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 TİK) tek başına ve verapamil (25, 50 µM) ile kombinasyonları uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık MTT metodu ile değerlendirildi.

Dosetaksol tek başına uygulanması ile dosetaksol + verapamil 25 µM kombinasyonları, karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0,05$ ).

Dosetaksol tek başına uygulanması ile dosetaksol + verapamil 50 µM kombinasyonları, karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0,05$ ).

Dosetaksol + verapamil 25 µM ve docetaksol + verapamil 50 µM kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( Şekil 12 ).

#### IV. 1. 1. 3. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinin Gemsitabin ve Verapamile Verdikleri Yanıt



**Şekil 13:** MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde 72 saatlik gemsitabin ve gemsitabin+ verapamil uygulaması sonrası MTT metoduna göre % canlılık düzeyleri. G: Gemsitabin, V25: 25  $\mu$ M Verapamil, V50: 50  $\mu$ M Verapamil. Test ilaç Konsantrasyon (TİK) değerleri ( Gemsitabin): 200 TİK: 50 $\mu$ g/mL, 100 TİK: 25 $\mu$ g/mL, 50 TİK: 12.5 $\mu$ g/mL, 25 TİK: 6.25 $\mu$ g/mL, 12.5 TİK:3.125 $\mu$ g/mL, 6.25 TİK: 1.56 $\mu$ g/mL. Test ilaç Konsantrasyon (TİK) değerleri ( Verapamil): 25 TİK: 25  $\mu$ M, 50 TİK: 50 $\mu$ M

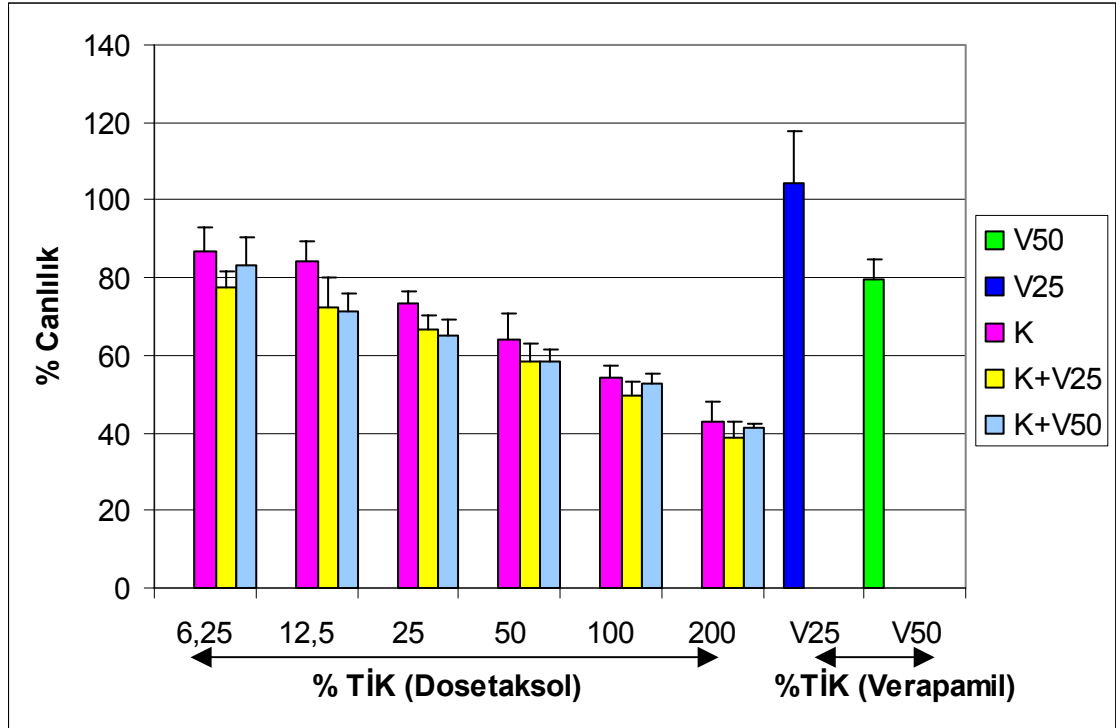
MDA-MB-231 İnsan meme kanseri hücrelerine çeşitli yüzde ilaç konsantrasyonlarında (TİK), gemsitabin (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 TİK) tek başına ve verapamil (25, 50  $\mu$ M) ile kombinasyonları uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık MTT metodu ile değerlendirildi.

Gemsitabin tek başına uygulanması ile gemsitabin ve verapamil 25  $\mu$ M kombinasyonu karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Gemsitabin tek başına uygulanması ile gemsitabin ve verapamil 50  $\mu\text{M}$  kombinasyonu karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Gemsitabin + verapamil 25  $\mu\text{M}$  ve gemsitabin + verapamil 50  $\mu\text{M}$  kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( Şekil 13 ).

#### IV. 1. 1. 4. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinin Karboplatin ve Verapamile Verdikleri Yanıt



**Şekil 14:** MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerinde 72 saatlik karboplatin ve karboplatin+verapamil uygulaması sonrası MTT metoduna göre % canlılık düzeyleri. K: Karboplatin, V25: 25  $\mu\text{M}$  Verapamil, V50: 50  $\mu\text{M}$  Verapamil. Test ilaç Konsantrasyon (TİK) değerleri (Karboplatin): 200 TİK: 31.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100 TİK: 15.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50 TİK: 7.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25 TİK: 3.95  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 12.5 TİK: 1.97  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 6.25 TİK: 0.98  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Test ilaç Konsantrasyon (TİK) değerleri (Verapamil): 25 TİK: 25  $\mu\text{M}$ , 50 TİK: 50  $\mu\text{M}$ .

MDA-MB-231 İnsan meme kanseri hücrelerine çeşitli yüzde ilaç konsantrasyonlarında (TİK), karboplatin (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 TİK) tek başına ve verapamil (25, 50 µM) ile kombinasyonları uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık MTT metodu ile değerlendirildi.

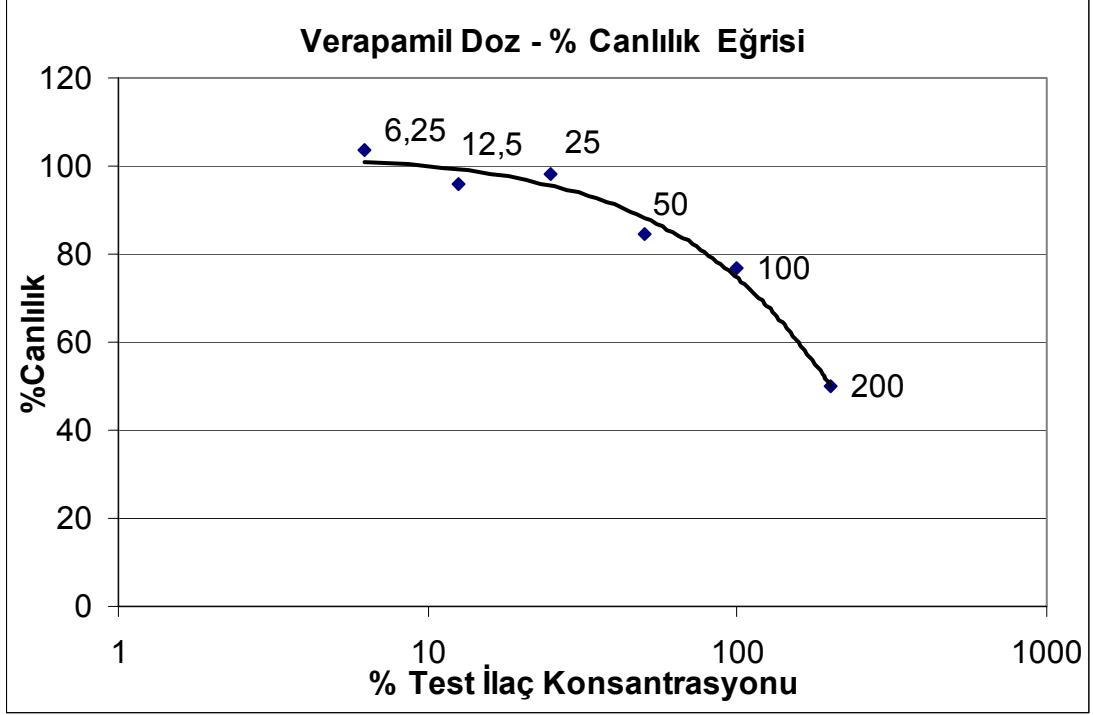
Karboplatin tek başına uygulanması ile karboplatin + verapamil 25 µM kombinasyonu karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $P<0,05$ ).

Karboplatin tek başına uygulanması ile karboplatin + verapamil 50 µM kombinasyonu karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $P<0,05$ ).

Karboplatin+ verapamil 25 µM ve karboplatin + verapamil 50 µM kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( Şekil 14 ).

#### IV. 1. 2. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Dizilerinde

##### IV. 1. 2. 1. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinin Verapamile Verdiği

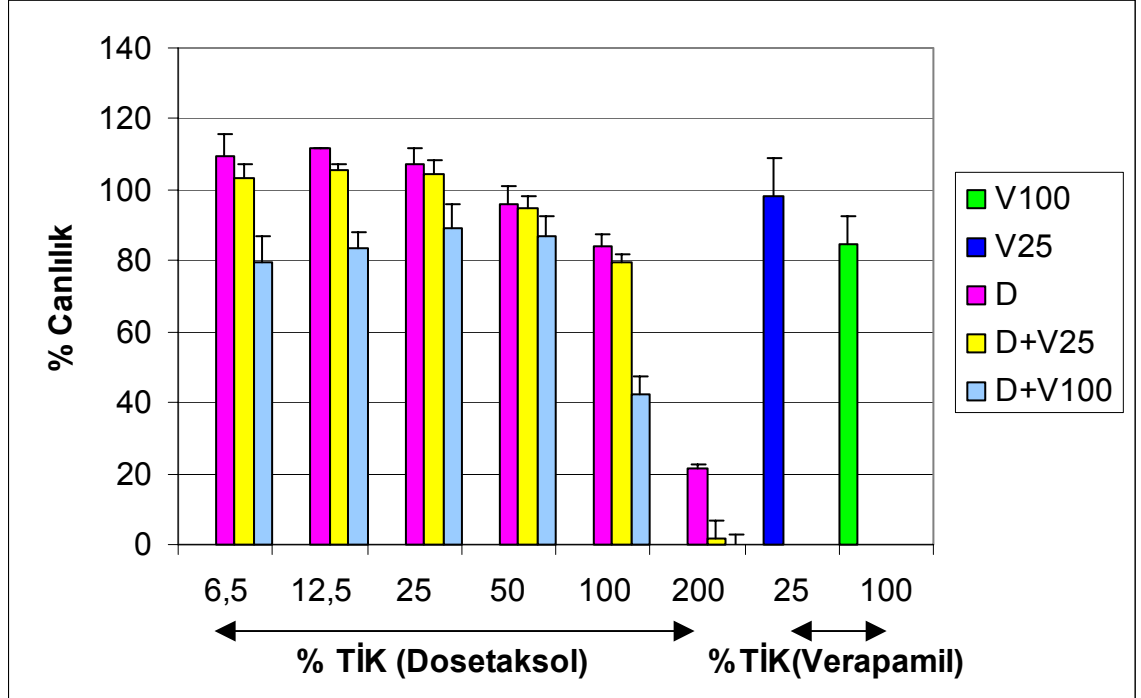


**Şekil 15:** MCF-7 İnsan Meme Kanseri hücrelerinde 72 saatlik verapamil uygulaması sonrası MTT metoduna göre verapamil doz yanıt eğrisi. Test İlaç Konsantrasyon (TİK) değerleri: 200 TİK: 200  $\mu$ M, 100 TİK: 100  $\mu$ M, 50 TİK: 50  $\mu$ M, 25 TİK: 25  $\mu$ M, 12,5 TİK: 12,5  $\mu$ M, 6,25 TİK: 6,25  $\mu$ M

MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine, çeşitli konsantrasyonlarda verapamil (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25  $\mu$ M) tek başına uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık MTT metodu ile değerlendirildi. Subletal doz ve subletal doza en yakın nontoksik dozlar belirlendi.

Çalışmanın bundan sonraki deneylerinde subletal doz olan 100  $\mu$ M Verapamil ve nontoksik doz olan 25  $\mu$ M verapamil dosetaksol, gempitabin ve karboplatin ile kombine edilerek kullanıldı.

#### IV. 1. 2. 2. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinin Doksetakol ve Verapamile Verdikleri Yanıt



**Şekil 16:** MCF-7 insan meme kanser hücrelerinde 72 saatlik dosetakol ve dosetakol + verapamil uygulaması sonrası MTT metoduna göre % canlılık düzeyleri. D: Doksetakol, V25: 25 µM Verapamil, V100: 100 µM Verapamil Test İlaç Konsantrasyon (TİK) değerleri (Doksetakol): 200 TİK: 22.6 µg/ml, 100 TİK: 11.3 µg/ml, 50 TİK: 5.65 µg/ml, 25 TİK: 2.82 µg/ml, 12.5 TİK: 1.41 µg/ml, 6.25 TİK: 0.70 µg/ml. Test İlaç Konsantrasyon (TİK) değerleri (Verapamil): 25 TİK: 25 µM, 50 TİK: 50 µM

MCF-7 İnsan meme kanseri hücrelerine çeşitli yüzde ilaç konsantrasyonlarında (TİK), dosetakol (200,100, 50, 25, 12.5, 6.25 TİK) tek başına ve verapamil (25, 100 µM) ile kombinasyonları uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık MTT metodu ile değerlendirildi.

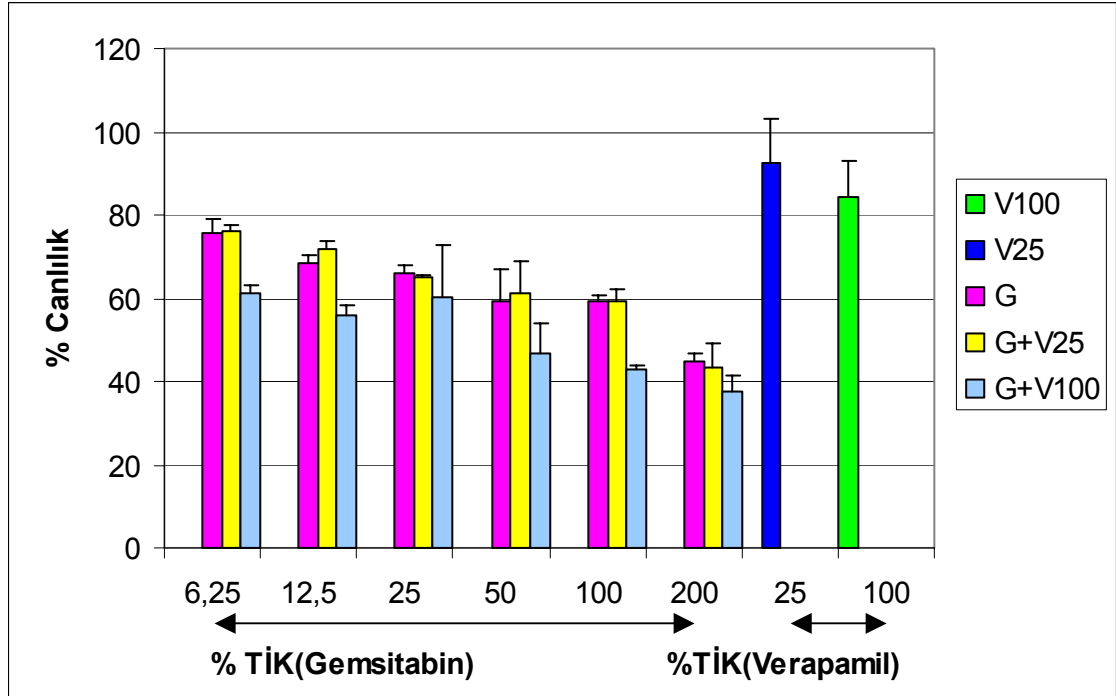
Doksetakol tek başına uygulanması ile dosetakol + verapamil 25 µM kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



Dosetaksol tek başına uygulanması ile dosetaksol ve verapamil 100  $\mu\text{M}$  kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $P<0,05$ ).

Dosetaksol + verapamil 25  $\mu\text{M}$  ve dosetaksol + verapamil 50  $\mu\text{M}$  kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $P<0,05$ ).

#### IV. 1. 2. 2 MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinin Gemsitabin ve Verapamile Verdikleri Yanıt



**Şekil 17:** MCF-7 insan meme kanser hücrelerinde 72 saatlik gemsitabin ve gemsitabin+verapamil uygulaması sonrası MTT metoduna göre % canlılık düzeyleri. G: Gemsitabin, V25: 25  $\mu\text{M}$  Verapamil, V100: 100  $\mu\text{M}$  Verapamil Test İlaç Konsantrasyon (TİK) değerleri ( Gemsitabin): 200 TİK: 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100 TİK: 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50 TİK: 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25 TİK: 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 12.5 TİK: 3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 6.25 TİK: 1.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Test İlaç Konsantrasyon (TİK) değerleri ( Verapamil): 25 TİK: 25  $\mu\text{M}$ , 50 TİK: 50  $\mu\text{M}$ .

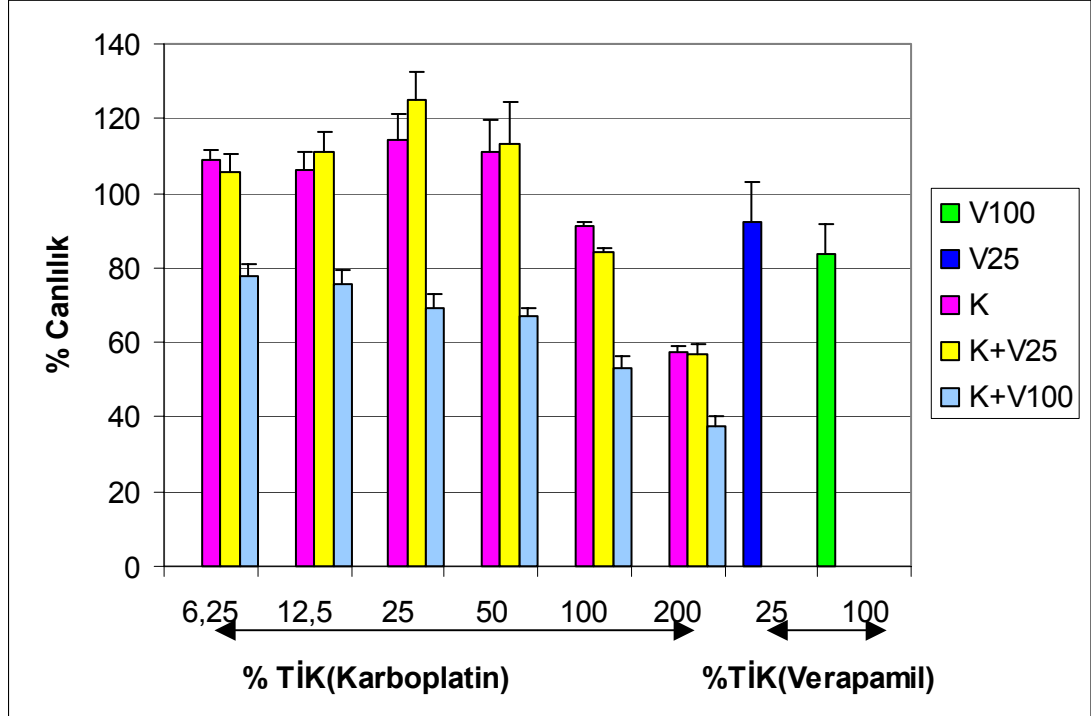
MCF-7 İnsan meme kanseri hücrelerine çeşitli yüzde ilaç konsantrasyonlarında (TİK), gemitabin (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 TİK) tek başına ve verapamil (25, 100 µM) ile kombinasyonları uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık MTT metodu ile değerlendirildi.

Gemitabin tek başına uygulanması ile gemitabin + verapamil 25 µM kombinasyonu karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı.

Gemitabin tek başına uygulanması ile gemitabin + verapamil 100 µM kombinasyonu karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ( $P<0,05$ ).

Gemitabin + verapamil 25 µM ve gemitabin + verapamil 50 µM kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ( $P<0,05$ ).

#### IV. 1. 2. 3. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinin Karboplatin ve Verapamil Tedavisine Verdikleri Yanıt



**Şekil 18:** MCF-7 insan meme kanser hücrelerinde 72 saatlik karboplatin ve karboplatin+ verapamil uygulaması sonrası MTT metoduna göre % canlılık düzeyleri. (K: Karboplatin, V25: 25 µM Verapamil, V100: 100 µM Verapamil) Test ilaç Konsantrasyon (TİK) değerleri (Karboplatin): 200 TİK: 31.6 µg/mL, 100 TİK: 15.8 µg/mL, 50 TİK: 7.9 µg/mL, 25 TİK: 3.95 µg/mL, 12.5 TİK: 1.97 µg/mL, 6.25 TİK: 0.98 µg/mL Test ilaç Konsantrasyon (TİK) değerleri (Verapamil): 25 TİK: 25 µM, 50 TİK: 50 µM.

MCF-7 İnsan meme kanseri hücrelerine çeşitli yüzde ilaç konsantrasyonlarında (TİK), gemsitabin (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 TİK) tek başına ve verapamil (25, 100 µM) ile kombinasyonları uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık MTT metodu ile değerlendirildi.

Karboplatin tek başına uygulanması ile karboplatin ve verapamil 25 µM kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Karboplatin tek başına uygulanması ile karboplatin ve verapamil 100 µM kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarında farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $P<0,05$ ).

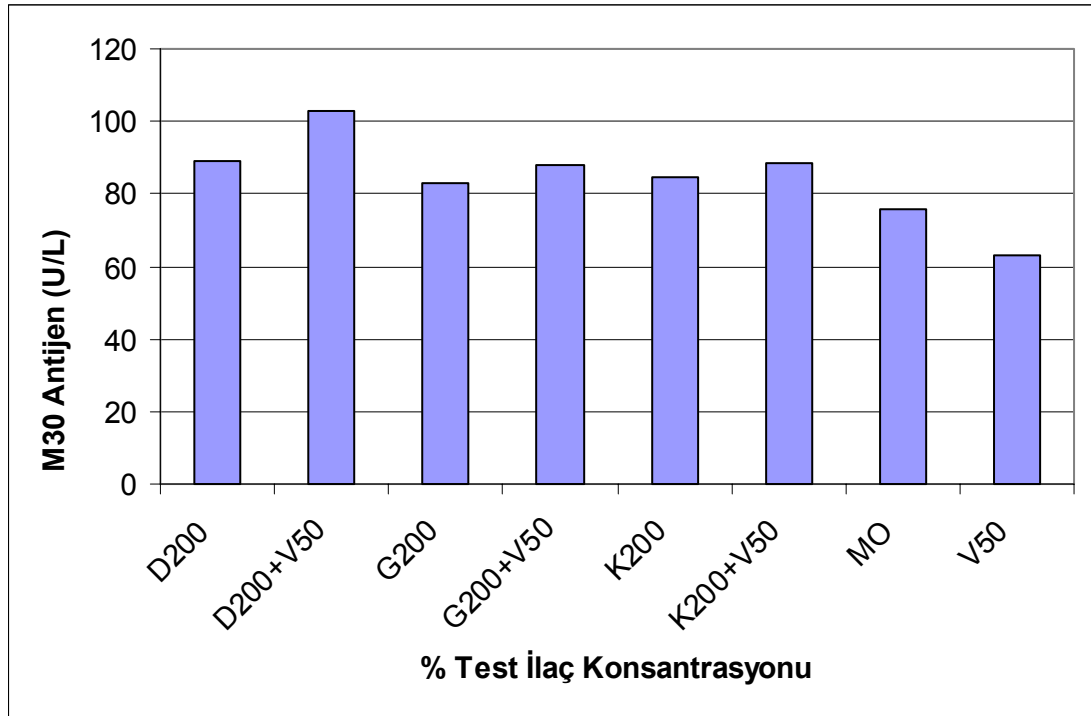
Karboplatin + verapamil 25 µM ve karboplatin + verapamil 50 µM kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarında farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $P<0,05$ ).

## IV. 2. Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi

### IV. 2. 1. Apoptozisin Hücre iskeletinde Gösterilmesi (M30 Antijen Testi )

#### IV. 2. 1. 1. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Dizisinde Doseksol,

#### Gemsitabin, Karboplatin ve Verapamil uygulaması



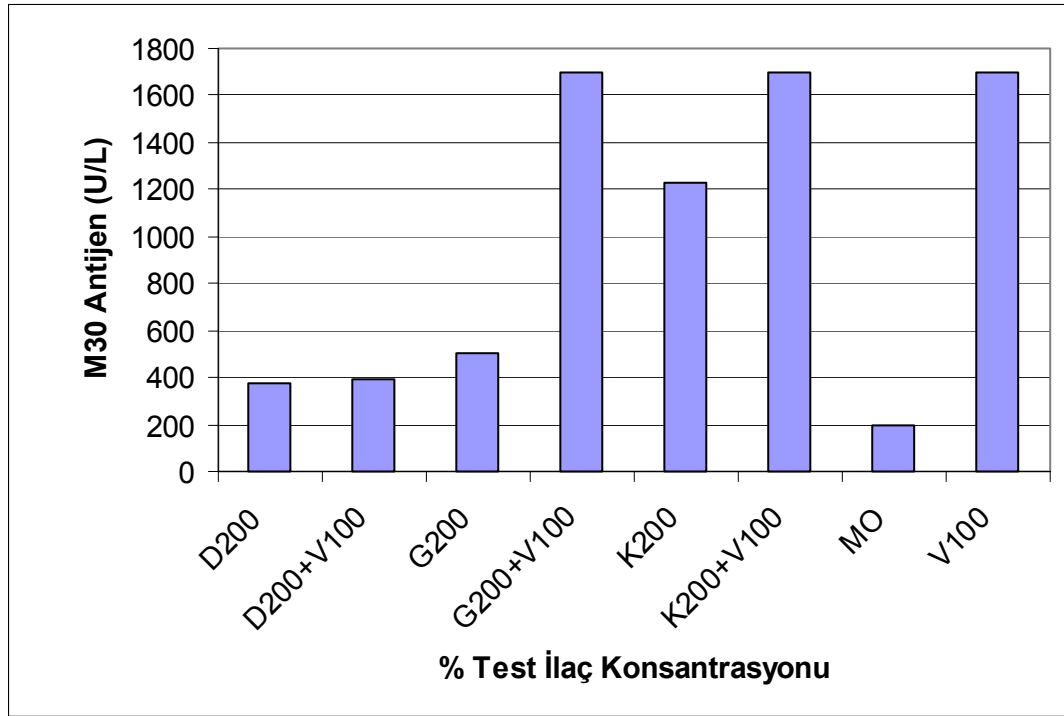
**Şekil 19:** MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerinde 48 saatlik doseksol, gemsitabin, karboplatin ve verapamil uygulaması sonrası kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30 Antijen) düzeyleri. D200: Doseksol 200 TİK: 22,6 µg/mL, G200: Gemsitabin 200 TİK: 50 µg/mL, Karboplatin 200 TİK: 31,6 µg/mL, V50: Verapamil 50 µM, MO: Maksimum yaşam.

Şekil 19'te görüldüğü gibi dosetaksol 200 TİK ile verapamil 50 µM'in birlikte kullanımı tek başına dosetaksol 200 TİK kullanımına göre % 14 daha fazla kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30 antijen) artışı ile sonuçlanmıştır.

Gemsitabin 200 TİK ile verapamil 50 µM'in birlikte kullanımı tek başına gemsitabin 200 TİK kullanımına göre % 6 daha fazla kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30 antijen) artışı ile sonuçlanmıştır.

Verapamil 50 µM'in karboplatin 200 TİK ile birlikte kullanımı tek başına Karboplatin 200'e göre % 4 daha fazla kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30 antijen) artışı ile sonuçlanmıştır.

#### IV. 2. 1. 2. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Dizilerinde İlaç Tedavi Sonrası M30 Antijeni



**Şekil 20:** MCF-7 insan meme kanser hücrelerinde 48 saatlik dosetaksol, gemsitabin, karboplatin ve verapamil uygulaması sonrası kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30 Antijen) düzeyleri. D200: Dosetaksol 200 TİK: 22,6 µg/mL, G200: Gemsitabin 200 TİK: 50 µg/mL, Karboplatin 200 TİK: 31,6 µg/mL, V100: Verapamil 100 µM, MO: Maksimum yaşam.

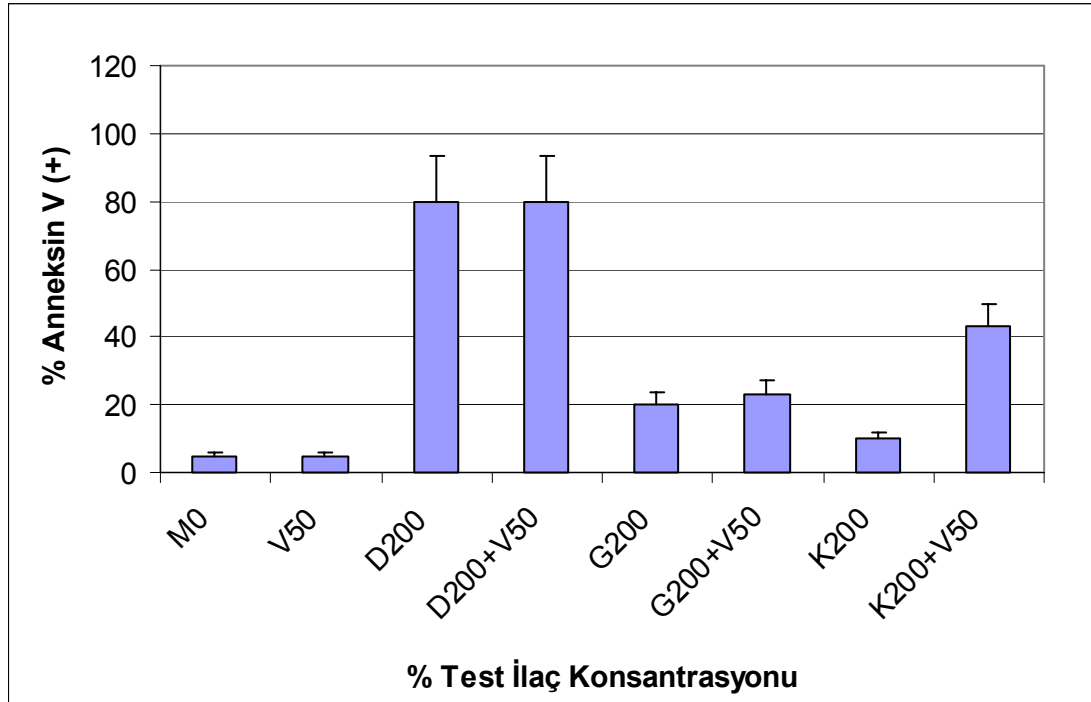
Şekil 20'da görüldüğü gibi dosetaksol 200 TİK ile verapamil 100 µM'in birlikte kullanılması tek başına dosetaksol 200 TİK'e göre % 5 daha fazla kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30 antijeni) artışı ile sonuçlanmıştır.

Gemsitabin 200 TİK ile verapamil 100 µM'in birlikte kullanılması tek başına gemsitabin 200 TİK'e göre % 236 daha fazla kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30 antijeni) artışı ile sonuçlanmıştır.

karboplatin 200 Tik ile verapamil 100µM'in birlikte kullanılması tek başına karboplatin 200 TİK'e göre % 38 daha fazla kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30 antijeni) artışı ile sonuçlanmıştır.

#### IV. 2. 2. Apoptozisin hücre membranında gösterilmesi (Anneksin V Testi)

##### IV. 2. 2. 1. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Dizilerinde İlaç Uygulaması Sonrası Anneksin V Pozitifliği



**Şekil 21:** MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde 48 saat dosetaksol, gemsitabin, karboplatin ve verapamil uygulaması sonrası Anneksin V pozitif boyanma gösteren hücrelerin yüzdesi. MO: Tedavi uygulanmamış kontrol hücre grubu, D200: Dosetaksol 200 TİK: 22,6 µg/mL, G200: Gemsitabin 200 TİK: 50 µg/mL, Karboplatin 200 TİK: 31,6 µg/mL, V50: Verapamil 50 µM, % Anneksin V (+): Anneksin V pozitif boyanma yüzdesi.

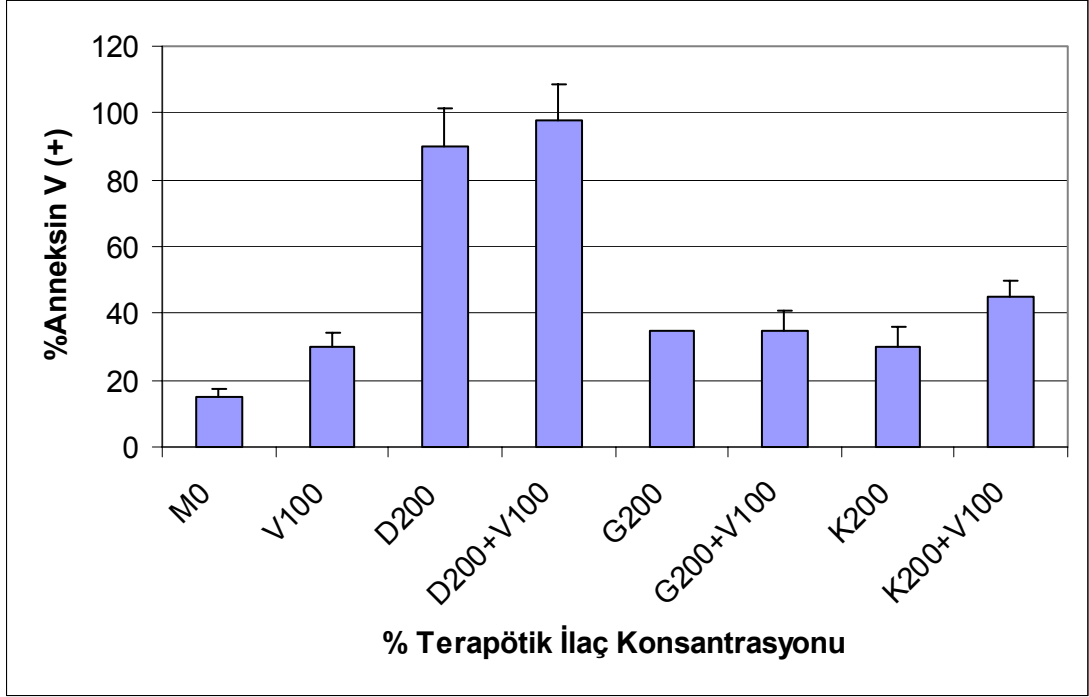
Şekil 21'de görüldüğü gibi kontrol hücrelerinde % 5 oranında anneksin V pozitifliği saptandı. Verapamil 50 µM uygulanan hücrelerde de % 5 oranında anneksin V pozitifliği saptandı.

Dosetaksol 200 TİK'in verapamil 50 µM ile kombinasyonu (% 80 anneksin V pozitif) tek başına dosetaksol 200 TİK'e (% 80 anneksin V pozitif) göre anneksin V oranını arttırmadı.

Gemsitabin 200 TİK'in verapamil 50 µM ile kombinasyonu (%23 anneksin V pozitif) tek başına gemsitabin 200 TİK'e (%20 anneksin V pozitif) göre anneksin V oranını % 3 arttırdı.

Karboplatin 200 TİK ile verapamil 50 µM kombinasyonu (% 43 anneksin V pozitif) tek başına karboplatin 200 TİK'e (% 10 anneksin V pozitif) göre anneksin V oranını % 33 arttırdı.

#### IV. 2. 2. 2. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Dizilerinde İlaç Tedavi Sonrası Anneksin V Pozitifliği



**Şekil 22:** MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde 48 saat dosetaksol, gemsitabin, karboplatin ve verapamil uygulaması sonrası Anneksin V pozitif boyanma gösteren hücrelerin yüzdesi. MO: Tedavi uygulanmamış kontrol hücre grubu, D200: Dosetaksol 200 TİK: 22,6 µg/mL, G200: Gemsitabin 200 TİK: 50 µg/mL, Karboplatin 200 TİK: 31,6 µg/mL, V100: Verapamil 100 µM, % Anneksin V (+): Anneksin V pozitif boyanma yüzdesi.

Şekil 22’de görüldüğü gibi MCF-7 insan meme kanseri hücre dizilerinde kontrol hücrelerinde (MO) % 15 oranında anneksin V pozitifliği saptandı. Verapamil 100 µM uygulanan hücrelerde % 30 oranında anneksin V pozitifliği saptandı.

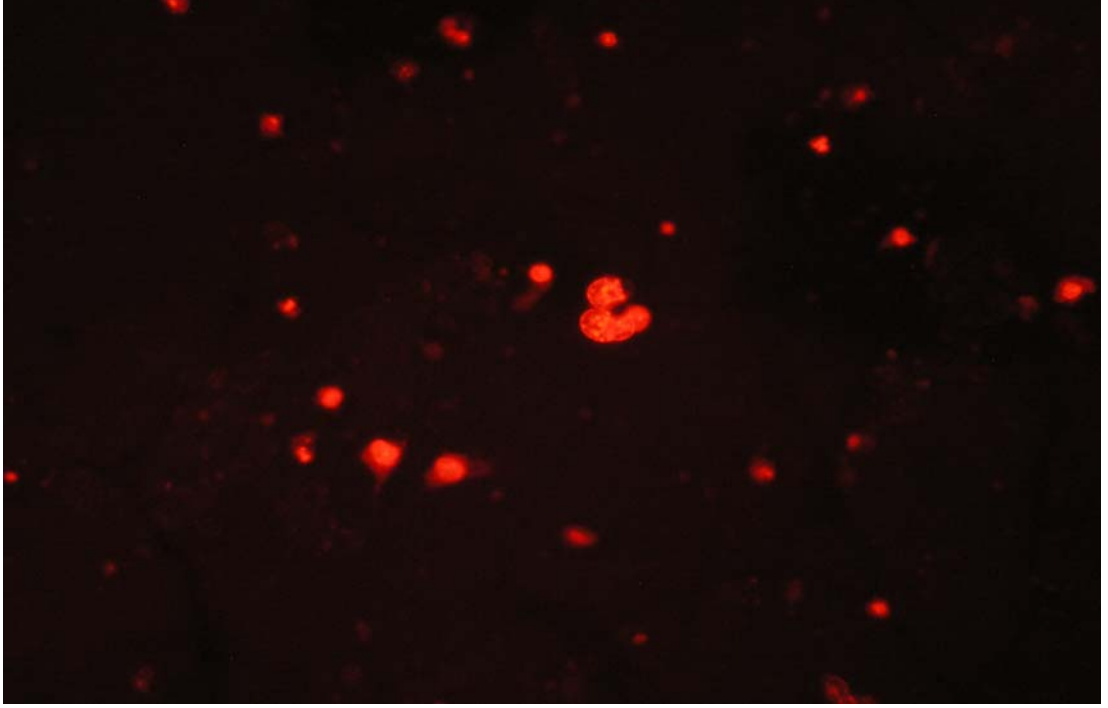
Dosetaksol 200 TİK’in verapamil 100 µM ile kombinasyonu (% 98 anneksin V pozitifliği) tek başına dosetaksol 200 TİK’e ( % 90 anneksin V pozitifliği) göre anneksin V oranını % 8 arttırdı.

Gemsitabin 200 TİK’in verapamil 100µM ile kombinasyonu % 35 anneksin V pozitifliği) tek başına gemsitabin 200 TİK’e (% 35 anneksin V pozitifliği) göre anneksin V oranını değiştirmede.



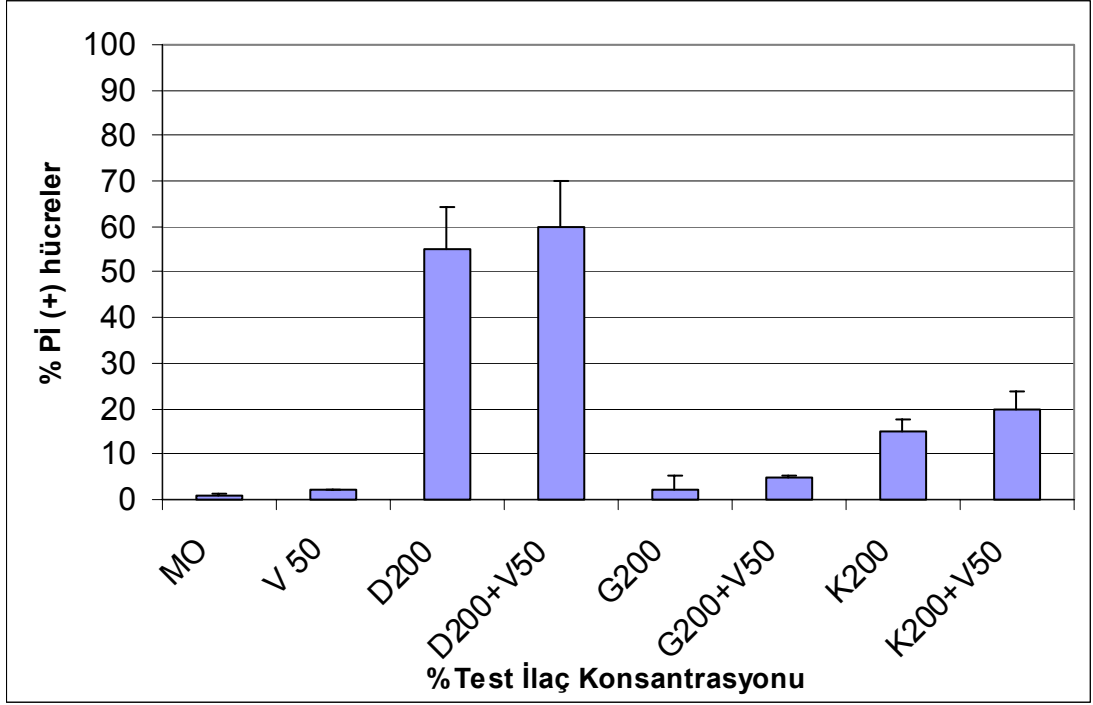
Karboplatin 200 TİK'in verapamil 100  $\mu$ M ile kombinasyonu (% 45 anneksin V pozitifliği) tek başına karboplatin 200 TİK'e ( % 30 anneksin V pozitifliği) göre anneksin V oranını % 15 arttırdı.

#### IV. 2. 3. Nekrozun Gösterilmesi (Propidyum iyodür Testi)



**Şekil 23:** Propidyum iyodürle boyanan hücrelerin (nekroza giden hücreler ) flöresan mikroskobundaki görüntüleri.

**IV. 2. 3. 1. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Dizilerinde  
Dosetaksol, Gemsitabin, Karboplatin ve Verapamil Uygulaması Sonrası  
Propidyum İyodür (Pİ) Pozitifliği**



**Şekil 24:** MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre dizisinde 48 saat Dosetaksol, gemsitabin, karboplatin ve verapamil uygulaması sonrası propidyum iyodür pozitif boyanma gösteren hücrelerin yüzdesi. MO: İlaç uygulanmamış kontrol hücre grubu, D200: Dosetaksol 200 TİK: 22,6 µg/mL, G200: Gemsitabin 200 TİK: 50 µg/mL, Karboplatin 200 TİK: 31,6 µg/mL, V50: Verapamil 50 µM, % Pİ (+): propidyum iyodür pozitif boyanma yüzdesi.

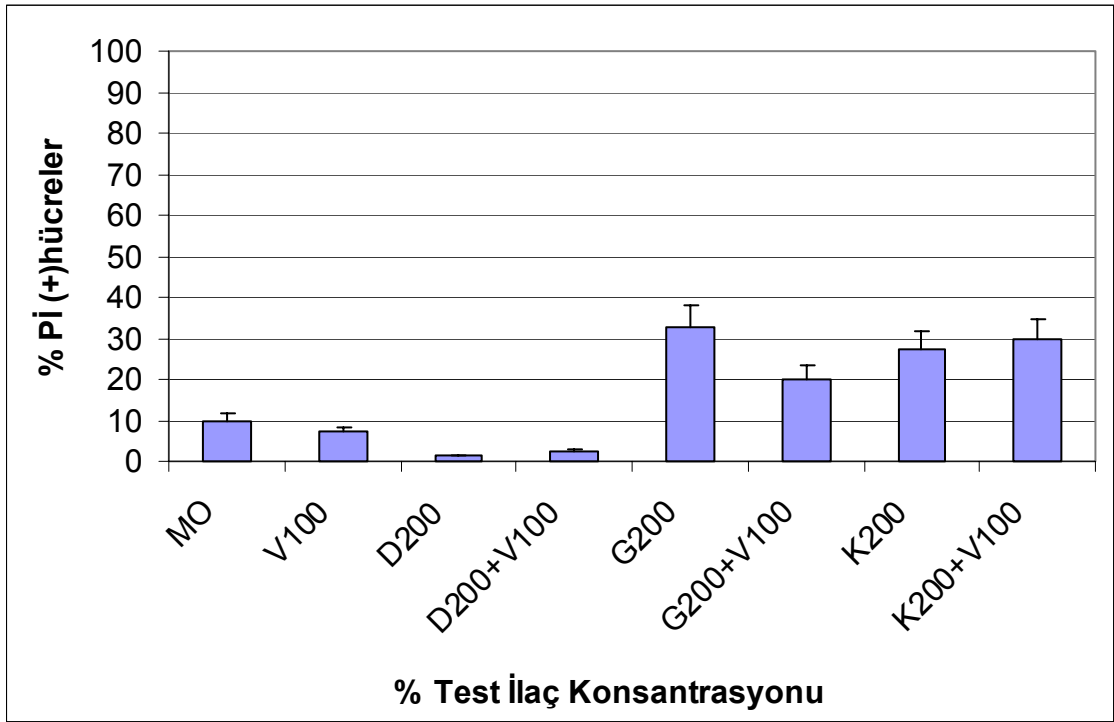
Şekil 24'de görüldüğü gibi kontrol hücrelerinde (MO) % 1 oranında propidyum iyodür pozitifliği saptandı. Verapamil 50 µM uygulanan hücrelerde % 2 oranında propidyum iyodür pozitifliği saptandı.

Dosetaksol 200 TİK'in verapamil 50 µM ile kombinasyonu (% 60 propidyum iyodür pozitif) tek başına dosetaksol 200 TİK'e (% 55 propidyum iyodür pozitif) göre propidyum iyodür pozitifliğini % 5 oranında arttırdı.

Gemsitabin 200 TİK'in verapamil 50 µM ile kombinasyonu (% 5 propidyum iyodür pozitif) tek başına gemsitabin 200 TİK'e (% 2 propidyum iyodür pozitif) göre propidyum iyodür pozitifliğini oranını % 3 arttırdı.

Karboplatin 200 TİK ile verapamil 50 µM kombinasyonu (% 20 propidyum iyodür pozitif) tek başına karboplatin 200 TİK'e göre (% 15 propidyum iyodür pozitif) propidyum iyodür oranını % 5 arttırdı.

#### IV. 2. 3. 2. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Dosetaksol, Gemsitabin, Karboplatin ve Verapamil Uygulaması Sonrası Propidyum İyodür (Pi) Pozitifliği



**Şekil 25:** MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde 48 saat dosetaksol, gemsitabin, karboplatin ve verapamil uygulaması sonrası propidyum iyodür pozitif boyanma gösteren hücrelerin yüzdesi. MO: Tedavi uygulanmamış kontrol hücre grubu, D200: Dosetaksol 200 TİK: 22,6 µg/mL, G200: Gemsitabin 200 TİK: 50 µg/mL, Karboplatin 200 TİK: 31,6 µg/mL, V100: Verapamil 100 µM, % Pİ (+): propidyum iyodür pozitif boyanma yüzdesi.

Şekil 25'de görüldüğü gibi MCF-7 insan meme kanseri hücre dizilerinde kontrol hücrelerinde (MO) % 10 oranında propidyum iyodür pozitifliği saptandı. Verapamil 100 µM uygulanan hücrelerde % 8 oranında propidyum iyodür pozitifliği saptandı.

Dosetaksol 200 TİK'in verapamil 100 µM ile kombinasyonu ( % 3 propidyum iyodür pozitif) tek başına dosetaksol 200 TİK'e (% 2 propidyum iyodür pozitif) göre çok az (% 1) arttırdı.

Gemcitabin 200 TİK'in verapamil 100 µM ile kombinasyonu (% 20 propidyum iyodür pozitif) tek başına gemcitabin 200 TİK'e (% 32 propidyum iyodür pozitif) göre propidyum iyodür oranını % 13 azalttı.

Karboplatin 200 TİK'in verapamil 100 µM ile kombinasyonu (% 30 propidyum iyodür pozitif) tek başına karboplatin 200 TİK'e ( % 27 propidyum iyodür pozitif) göre propidyum iyodür oranını % 3 arttırdı.

### IV. 3. P-gp ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

**Tablo 1:** MDA-MB-231 ve MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Dizilerinde P-gp Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi.

Hücre Dizisi Türü	Örnekler	Uygulama Süresi	
		24 saat	48 saat
MDA-MB-231	MO	(-)	(-)
	MI	4-5	(-)*
	(-) Kontrol	(-)	(-)
	V50 TİK	(-)	(-)*
	D200 TİK	(-)*	(-)*
	D200+V50 TİK	(-)*	(-)*
	D100+V50 TİK	(-)*	(-)*
	G200 TİK	(-)*	(-)*
	G200+V50 TİK	(-)*	(-)*
	G100+V50 TİK	(-)*	(-)*
	K200 TİK	(-)	(-)*
	K200+V50 TİK	(-)	(-)*
	K100+V50 TİK	(-)	(-)*
	MCF-7	MO	0-1
MI		0-1	1
V100 TİK		1	1
D200 TİK		(-)*	1
D200+V100 TİK		1-2	1
D100+V100 TİK		1	(-)*
G200 TİK		1	1
G200+V100 TİK		1	1
G100+V100 TİK		1	1
K200 TİK		1	1
K200+V100 TİK		1	1-2
K100+V100 TİK		1	1

MO: İlaç uygulanmamış kontrol hücre grubu, MI: Minimum yaşam.

(-): Boyanma yok. (-)\*: Hücre gözlenmedi. D200: Doksosol 200 TİK: 22,6 µg/mL, D 100 TİK: Doksosol 11,3 µg/mL, G200: Gemisitabin 200 TİK: 50 µg/mL, Gemisitabin 100 TİK: Gemisitabin 25 µg/mL, Karboplatin 200 TİK: 31,6 µg/mL, Karboplatin 100 TİK: Karboplatin 15,8 µg/mL, V50: Verapamil 50 µM, V100: Verapamil 100 µM

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanser hücre dizilerinde seçili kemoterapötik ilaçların sitotoksik etkileri değerlendirildi. Ayrıca çoklu ilaç direnç proteini olan P-gp'i (P-glikoprotein) inhibe eden verapamilin bu ilaçlarla kombinasyonları araştırıldı. Bununla ilgili olarak literatür taraması sonuçlarına göre meme kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlardan daha önce verapamil ile birlikte kombine edilerek kullanılmamış veya çok az araştırma konusu yapılmış kanser ilaçlarını (dosetaksol, gemitabin, karboplatin) tercih ettik.

Seçtiğimiz ilaçların kanser hücreleri üzerine olan sitotoksitelerini değerlendirmek için çok sık kullanılan ve aynı zamanda ucuz olan MTT metodunu kullandık, büyümeye etkilerini inceleyip, yüzde canlılıklarını hesapladık. Meydana gelen hücre ölümlerinin nekrozdan mı yoksa apoptozisten mi kaynaklandığına baktık.

Daha önceki çalışmalarda verapamil çeşitli tümör tiplerinde denenmiştir ve bunlardan bazıları şöyledir; Tsuruo ve ark.'ları (36) verapamilin kanser ilaçları üzerindeki etkilerini saptamak için C26 kolon adenokarsinoma hücrelerinde çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında verapamil, vinkristinin hücre içi birikimini 3-4 kat arttırmıştır. B16 melanoma ve LL Lewis akciğer karsinoma hücrelerinde ise vinkristinin hücre içi birikimini 2 kat arttırmıştır. verapamil, vinkristinin hücrelerden dışarıya nakledilmesini inhibe etmektedir.

Chitnis ve ark. (74) Verapamil ilacını in vitro ve in vivo olarak bouvardine dirençli sarkoma 180 hücrelerinde denemişlerdir. Verapamil bouvardin'e (NSC 259968) olan doğal direnci bu hücrelerde önlediği bulunmuştur. Robinson ve ark. (75) yaptıkları çalışmada bu bulguyu desteklemektedir. Verapamil fibrosarkomlarda melfalan'ın alımını ve sitotoksitesini arttırmakta olduğunu bulmuşlardır. Böylece bu iki sonuç bize verapamilin sadece epitelial tümörlerde değil aynı zamanda stromal tümörlerde de etkili olduğunu göstermektedir.

Merry ve ark.'nın (76) çalışmasında verapamil, adriamisine dirençli G-UVW ve G-CCM anaplastik astrositoma hücre dizilerinde adriamisin duyarlığını arttırmaktadır.

Ballou ve ark. (77) çalışmalarında murine bladder karsinoma hücrelerinde verapamil kullanımının thiotepa ve adrimasin tedavisinin etkisini arttırdığını bulmuşlardır.

Futscher ve ark. (78) verapamili hematolojik tümörlerden biri olan insan multiple miyelom hücre dizisi RPMI 8226'te (8226/S) denemişlerdir ve çalışmalarında doksorubisinde karşılaştıkları çoklu ilaç direncini verapamil kullanarak önlemişlerdir. Timcheva ve ark. (79) ise hematolojik tümörlerden CEM/O (P-gp negatif) ve CEM/VCR 1000 (MDR fenotipli) insan lösemi hücre dizilerinde epirubisin ile birlikte verapamil kullandıklarında, CEM/O (P-gp negatif) hücrelerde önemli bir etki ile karşılaşmazlar iken, CEM/VCR 1000 (MDR fenotipli) hücrelerde verapamili etkili bulmuşlardır. Yalowich ve ark. (80) çalışmalarında etoposidin verapamil ile birlikte kullanımının K562 hücrelerine karşı, insan normal kemik iliği granülosit-makrofaj progenitörlerine göre 10 kat daha güçlü etki gösterdiğini saptamışlardır. Benzer şekilde verapamilin K562 hücrelerinde vinkristin sitotoksitesini 10 kat daha fazla arttırdığını bulmuşlardır. Yine Beck ve ark. (81) yaptıkları çalışmada ise verapamilin İnsan lösemik hücrelerinde vinka alkaloidlerinin sitotoksitesi arttırdığını bildirmişlerdir. Yalowich ve ark. (82) L1210 fare lenfositik lösemi hücrelerinde çalışmışlar ve bu çalışmada verapamil ile etoposidin birlikte kullanımının etoposidin hücre içi birikimini indüklediğini göstermişlerdir. Hematolojik tümörlerde yapılan araştırmalar bu tümör grubunda da verapamilin kanser ilaçlarının etkisini arttırdığını göstermektedir. Bu nedenle, verapamil hücre türüne bağlı olmaksızın tümör hücrelerinde ortak bir mekanizmayı kullanıyor olabilir.

Diğer yapılan çalışmalar ise şöyledir; Okana ve ark. (83) verapamili insan renal adenokarsinomasında denemişler ve çalışmalarını, bu hücre grubunda verapamil, adriamisin ve vinblastinin antikanser aktivitelerini arttırmaktadır şeklinde yorumlamışlardır. Warmann ve ark. (84) yaptıkları çalışmada insan hepatoblastoma hücre dizilerinde, MDR1 modülatörleri olan

siklosporin analogları ve verapamilin önemli derecede hepatoblastomaya doksorubisin cevabını iyileştirdiğini saptamışlardır. Ehrlichova ve ark. (85) verapamilin, NCI/ADR-RES hücrelerine paklitakselin alımını yedi kat arttırdığını, dışarıya atılımını ise 2.5 kat azalttığını saptamışlardır. Pesic ve ark. (86) NCI-H460 ve NCI-H460/R hücre dizilerinde verapamil in etkisini test etmişlerdir ve bu çalışmada verapamil, doksorubisinin dışarı atılımını önemli derecede azaltmaktadır sonucuna varmışlardır. Sulova ve ark (87) P-glikoprotein pozitif L1210/VCR kanser hücrelerinde verapamil ve all-trans retinoik asidi birlikte kullanmışlardır ve sonuçta verapamil bu hücrelerde P-gp 'nin transport aktivitesi ile ekspresyonunu azaltmakta olduğunu bulmuşlardır. Simpson ve ark. (88) çalışmalarında verapamilin, thiotepa ve doxorubisin hidroklorid ile kombinasyonunun önemli derecede T24 hücrelerinin büyümesini ve yaşamasını azalttığını göstermişlerdir. Guo ve ark. (89) SW1990 ve HL60 pankreas kanseri hücre dizilerinde, adriamisin ve verapamilin birlikte kullanılmasının P-glikoprotein aracılıklı çoklu ilaç direncinin önlenmesinde etkili olduğunu göstermişlerdir.

Shen ve ark. (90) verapamil MDA-MB-435mdr kanser hücrelerinde doksorubisinin hücre içi birikimini % 79 kadar arttırmakta olduğunu bulmuşlardır. Hayvanlarda verapamilin doksorubisin tedavisinden önce verilmesi MDA-MB-435mdr hücrelerinde doksorubisin hücre içi birikimini % 94 oranında arttırmaktadır. Bizim çalışmamızda ise MDA-MB-231 hücrelerinde verapamil, dosetaksolün ve karboplatinin sitotoksitesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmaktadır. Yine bizim çalışmamızda MDA-MB-231 hücre dizisinde dosetaksol + verapamil 25 µM konsantrasyonu ile dosetaksol + verapamil 50 µM konsantrasyonu uygulanması arasında sitotoksite açısından anlamlı bir fark görülmemiştir. Yani, aynı sitotoksik etki potansiyelini daha düşük dozlarda görebilmekteyiz. Bu nedenle de MDA-MB-231 hücre dizisinde daha düşük verapamil dozu kullanılarak yüksek sitotoksik etki elde edilebilmektedir. Bu durum kemoterapötik ilaçların istenmeyen yan etkilerinden korunmada önemli olabilir. Özellikle MDA-MB-231 hücre dizisinin invaziv karakterli olduğu göz önüne alındığında bu önem daha da artmaktadır.



Chung ve ark. (91) MCF-7/ADR ve MCF-7 sensitif hücrelerle çalışma yapmışlardır ve daunorubisinin dışarı atılımının MCF-7/ADR hücrelerinde, MCF-7 sensitif hücrelere göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda daunorubisinin verapamil ile birlikte kullanımının hücre içi daunorubisin birikimini % 17.6 arttırdığını saptamışlardır. Bizim çalışmamızda ise MCF-7 hücre dizilerinde verapamil, dosetaksolün ve karboplatinin sitotoksitesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmaktadır.

Smith ve ark.'nın (92) yaptığı çalışmada MCF-7 hücrelerinde vinblastin ve paklitakselin İntracellüler akümülyasyonu verapamil ile belirgin derecede artmıştır. Kars ve ark.'da (93) dirençli MCF-7 hücre dizilerinde paklitaksel, dosetaksol, vinkristin ve doksorubisinin, verapamil ile birlikte kullanımının çoklu ilaç direncini önlemede etkili olduklarını bulmuşlardır.

Dong ve ark. (94) bizim çalışmamızda kullandığımız hücre grubu olan MCF-7 hücrelerinde çalışmışlar ve bu çalışmalarını verapamil, MCF-7 hücrelerinde doksorubisin ve vinkristinin intrasellüler konsantrasyonunu arttırmaktadır şeklinde yorumlamışlardır. Bu bulgu bizim elde ettiğimiz sitotoksitenin ilaç birikimi sonucu olabileceğini göstermektedir. Ehrlichova ve ark.'nın (95) yaptığı çalışmada ise verapamil, dirençli meme kanseri hücrelerinde paklitakselin alımını 7 kat artırır ve onun dışarı atılımını 2,5 kat azaltmaktadır.

Yan ve ark. (96) termokimyasal ısının verapamil ile birlikte kullanımının, hücre içi adriamisin oranını ve MCF-7/ADM hücre dizilerinin apoptozis hızını arttırdığını bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da verapamil tüm ilaç gruplarında ve her iki hücre dizisinde apoptozis belirteci olan M30 antijenini arttırmaktadır. Dolayısıyla apoptozisi arttırmıştır. Bu etki MCF-7 hücre dizilerinde çok daha belirgin ve şiddetlidir. MDA-MB-231 hücrelerinde M30 antijeni yaklaşık 100 U/L düzeylerinde seyrederken, MCF-7 hücrelerinde 1700 U/L düzeylerine çıkabilmiştir. Bu bulgular, MCF-7 hücrelerinin esas olarak apoptozisle öldüğünün göstergesidir. Nitekim laboratuvarımızda yapılan bir başka çalışmada MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerine klasik meme kanseri tedavisi olan FEC (5-Florourasil-Epirubisin-Siklofosamid)

tedavisi uygulanmıştır ve MDA-MB-231 hücreleri tipik olarak nekrozisle ölürken, MCF-7 hücrelerinin tipik olarak apoptozisle öldüğü bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda hem MDA-MB-231 hücre dizilerinde hemde MCF-7 hücre dizilerinde verapamil, dosetaksolün ve karboplatinin sitotoksitesini (MTT metodu ile) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmaktadır. Fakat verapamil MCF-7 hücrelerinde gempitabinin sitotoksik etkisini anlamlı olarak arttırmıyor iken, MDA-MB-231 hücrelerinde anlamlı olarak arttırmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada ilginç olarak, verapamilin gempitabinin etkinliğini hücre tipine bağlı olarak modifiye ettiği bulundu.

Dosetaksol+Verapamil 100 µM, tek başına dosetaksol uygulamasına göre daha güçlü sitotoksik etkiye neden oluyor iken, M30 sonuçlarında bu etkiyi göremedik. Çünkü muhtemelen sitotoksik etki apoptozisle değil nekrozisle olmaktadır.

Ayrıca MDA-MB-231 insan meme kanser hücre dizilerinde ilaç gruplarına, doz gruplarına ve ilaç-doz etkileşimlerine göre yüzde canlılık ortalamaları farklılık gösterdiği bulundu.

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre dizilerinde ilaç tedavileri sonrasında az miktarda (% 0-2) immünohistokimyasal boyanma tespit edildi. Bu durumun MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre dizilerinde çoklu ilaç direnç proteini olan p-glikoprotein çok az miktarda (97) ekspresyonu olmasıyla bağlantılı olduğu düşünüldü. Fakat bu durumda verapamilin sağladığı toksisitenin P-glikoprotein dışında başka bir mekanizmadan da kaynaklanabileceğini düşünebiliriz.

MCF-7 hücre dizilerinde verapamil ve karboplatinle 48 saatlik tedavi sonrası P-gp ekspresyonunda yaklaşık 2 katlık artış saptanmıştır. Bu durum kemoterapötiklerle tedavi sırasında karşılaşılan dirençten sorumlu olabilir. Nitekim, kemoterapinin sıklıkla kanser hücrelerinde çoklu ilaç direncinin gelişmesine neden olduğu rapor edilmiştir (98).

Sonuç olarak, biz bu çalışmamızda, özellikle dosetaksolün verapamil ile kombinasyonunun sitotoksik etkiyi artırmak açısından etkili bir strateji olabileceğini göstermiş bulunmaktayız. Daha ileri çalışmaların (deney hayvanları, klinik çalışmalar) yapılmasının uygun olacağını düşünmekteyiz

## KAYNAKLAR

1. Tavassoli FA: Pathology of the breast. 2 nd ed. Stamford: Appleton & Lange, 1-74:301-436,1999.
2. WHO: Fifty facts from the World Health Report 1998
3. Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer statistic 1993, C.A. Cancer J Clin 1993;43:4-26.
4. Silverberg E, Lubera J. Cancer statistics 1987. C.A. Cancer J Clin 1998;37:2-19
5. T. C. Sağlık Bakanlığı. Kanser istatistikleri. Erişim:www.saglik.gov.tr. Erişim tarihi:14.08.2008. Adres: <http://www.saglik.gov.tr/KSDB/BelgeGoster.aspx>
6. Osman Manavoğlu. Klinik Onkoloji El Kitabı. Ankara:Palme Yayıncılık. 2004. s.218,229,52.
7. Mac Mahon B, Trichopoulos D, Brown J et al. Age at menarche, probability of ovulation and breast cancer. Int j Cancer 1982;29: 13-20
8. Hoover R, Gray IA, Cole P et al. Menapousal estrogens and breast cancer. N Engl J Med 1976;295:401-406.
9. Mac Mahon B, Cole P, Lin T. Age of first birth and breast cancer risk. Bull WHO 1970;43:209-21.
10. Değerli Ü. Meme Kanseri. İn: Değerli ü. (eds). Genel Cerrahi. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 1998.288-96.
11. Özışık Y., Baltalı E. Meme kanseri. İn: Yasavul Ü (eds). Hacettepe İç Hastalıkları Kitabı. Ankara: Semih Ofset; 2004.1426-435.
12. Sayek İ. Meme Hastalıkları. İn: Sayek İ (eds). Temel Cerrahi. 1. Cilt. Ankara: Güneş kitabevi; 1996. 864-72.
13. Collaborative Group on hormonal faktors in breast cancer. Breast cancer and hormonal contraseptives, collaborative reanalysis of individual data on 53.297 woman with breast cancer and 100.239 women without breast cancer-from 54 epidemiological studies. Lanuet 1996; 47;1713-27.

14. Pike M, Bernstein L, Spicer D. Exogenous hormones and breast cancer risk. In: Neiderhuber J. (eds). Current Therapy in Oncology. St. Louis: Decker; 1993.
15. Albain KS, Alfred KC, Clarc DM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials. J. Natl Cancer inst Monogr 1994;16:35.
16. Anderson DE. Some characteristics of familial breast cancer. Cancer 1971; 28: 1500-504.
17. Tannock IF, Hill RP, (eds). The Basic Science of Oncology. 2nd edition. New York: McGraw-Hill; 1992.
18. Haagensen CD. Diseases of Breast. 3rd edition. Philadelphia: WB Saunders; 1986.
19. Rohan TH; Howe GR, Frienderich CM et. al: Dietary fiber vitamins A, C, and E risk of breast cancer. A cohort study. Cancer Causes Control. 1993; 4: 29-35.
20. Kayhan Ö, Özkan N, Malazgirt Z: Genel Cerrahi. Ankara, Hacettepe-Taş Kitapçılık, 1996.
21. Scmizu Y, Kato H, Schull WJ: Study on mortality of A bomb survivors. Radit Res. 1990:121-141.
22. Atilla Engin. Meme hastalıkları. In: Prof Dr Atilla Engin(ed). Genel Cerrahi Tanı ve tedavi ilkeleri. 1. Cilt .Ankara: Atlas kitapçılık Ltd. Şti. 2000. s.389
23. Ali Haydar Taşpınar, Doç. Dr. Osman Baran Tortum, Op. Dr. Metin Ertem. Meme kanseri. Cerrahi Onkoloji. İstanbul: Ufuk Reklamcılık ve Matbaacılık.1995. s.71
24. Baines C;. The Canadian National Breast Screening Study: A perspective on criciticism. Ann Intern Med 1994; 120(4):326-34.
25. Sicles EA. Findings at mammographic screening on only one Standard projection outcomes analysis. Radiology, 1998; 208(2):471-75.
26. Lawrence WF, Liang W, Mandelblatt JS, et al. Serendipity in diagnostic imaging: magnetic resonance imaging of the breast. J Natl Cancer Inst 1998;90(23):1792-800.

27. Safi F, Kohler<sup>1</sup>, Rottinger E, et al. The value of the tumor marker CA 15-3 in diagnosing and monitoring breast cancer. *Cancer* 1991;68:574-82.
28. Bornbardieri E, Gion M, Mione R, et al. A Mucin-like carcinoma-associated antigen (MCA) in the tissue and blood of patients with primary breast cancer. *Cancer* 1989;63:490-95.
29. Horgan PGR, Byrne J, O'Donoghue J, Money E, Grimes H, Given HF. Mucin-like carcinoma associated antigen (MCA) et presentation with breast cancer. *Ir j Med Sct* 1997;166(4):215-6.
30. Yasasever V. Tümör belirleyiciler. In: Topuz E (eds). *Meme kanseri: Biyoloji, tanı, evreleme, tedavi*. İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Yayınları, 1997;156-70.
31. Gion M, Mione R, Barioli P, Sartorello P, Capitanio G. Tissue polypeptide antigen and tissue polypeptide specific antigen in primary breast cancer. Evaluation in serum and tumor tissue. *Eur J Clin Chem Biochem* 1994;32(10):779-87.
32. Gion M, Mione R, Becciolini A, Balzi M, Correale M, Piffanelli A, Giovannini G, Sacconi Jotti G, Fontanesi M. Relationship between cytosol TPS, TPA and cell proliferation. *Int j Biol Markers* 1994; 9(2):109-14.
33. Formento JL, Francoual M, Formento P, Etienne MC, Fischel JL, Namer M, Frenay M, Francois E, Milano G. Epidermal growth factor receptor assay validation of a single point method and application to breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1991; 17(3):211-9.
34. Ardavanis A, Scorilas A, Loukeri A, Gerakini F, Pissakas G, Missitzis I, Apotolikas N, Yiotis I. Cathepsin D may help in discriminating node-negative breast cancer patients at risk for local regional recurrence. *Anticancer Res* 1998;18(4B):2885-90.
35. Pietenpol JA, Vogelstein B. Tumour suppressor genes. No room at the p53 inn. *Nature* 1993;365:17-18.
36. Tsuruo T, Iida H, Naganuma K, Tsukagoshi S, Sakurai Y.

- Promotion by verapamil of vincristine responsiveness in tumor cell lines inherently resistant to the drug. *Cancer Res.* 1983 Feb;43(2):808-13.
37. Vaclavikova R, Horsky S, Simek P, Gut I (2003) The paclitaxel metabolism in rat and human liver microsomes is inhibited by phenolic antioksidants. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 368:200-209
  38. İskender Sayek. *Temel Cerrahi 3. Baskı* Ankara: Güneş Kitapevi Ltd.Şti. 2004 s.989
  39. Atila Uçar. *Farmakoloji. Ankara Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti.* 2003 s.390-391
  40. Oğuz Kayaalp. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 1. Cilt.* Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd Şti. 2005 s.330-334
  41. Osman Manavoğlu. *Klinik Onkoloji El Kitabı.* Ankara: Palme Yayıncılık. 2004 s.68.
  42. T. Arda Bökesoy, İclal Çakıcı, Mehmet Melli. *Farmakoloji Ders Kitabı.* Ankara: Gazi Kitabevi Tic. Ltd. Şti. 2000 s.627-628
  43. Paul D, Cowan KH. Drug resistance in breast cancer, In: *Breast Cancer Molecular Genetics, Pathogenesis, and Therapeutics*, ed. Bowcock AM, 481-517, Totowa NJ, Humana Pres 1999.
  44. Kartner N, Riordan JR, and Ling V: Cell surface P glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 221:1285-1288,1983
  45. Dalton WS, Durie BGM, Alverto DS, et al: Characterization of a new drug resistance human myeloma cell line that expresses p-glycoprotein. *Cancer Res* 46:5125-5130,1986
  46. Hamada H, and Tsuruo T: Characterization of the ATPase activity of Mr 170,000 to 180,000 membrane glycoprotein associated with multidrug resistance in K562/ADM cells *Cancer Res* 48:4932,1988
  47. Dong Xu, Qinghua Lu, Xun Hu: Down-regulation of P-glycoprotein expression in MDR breast cancer cell MCF-7/ADR by honokiol. *Science Direct* 2005

48. Y. Cem Kaplan, Dr. Ayşe Gelal. Farmakokinetikte p-glikoprotein rolü. Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci 2006, 2 (46): 33-38.
49. Wallner J, Depisch D, Hopfner M, Haider K, Spona J, Ludwig H,. MDR 1 gene expression and prognostic factors in primary breast carcinomas. Eur J Cancer 1991; 27:1352-55
50. Goldstein LJ, Galski H, Fojo A. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. JNCI 1989;81:116-24
51. Keith WN, Brown SSR. Expression of mdr1 and gst- in human breast tumors: comparison to in vitro chemosensitivity. Br J Cancer 1990; 61:712-6
52. Kacinski BM, Yee LD, Carter D. Quantitation of tumor cell expression of the p-glycoprotein (mdr1) gene in human breast carcinoma clinical specimens. Cancer Bull 1989; 41:44-8
53. Charpin C, Vielh P, Duffaud F. Quantitative immunocytochemical assays of P-glycoprotein in breast carcinomas: correlation to Messenger RNA expression and to immunohistochemical prognostic indicators. JNCI 1994;86:1539-45
54. Wang CS, LaRue H, Fortin A. Mdr-1 mRNA expression by RT-PCR in patients with primary breast cancer submitted to neoadjuvant therapy. Breast Cancer Res Treat 1997;45: 63-74
55. Dexter DW Reddy RK, Geles GK. Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction measured expression of MDR 1 and MRP in primary breast carcinoma. Clin Cancer Res 1998; 4:1522-42.
56. Filipits M, Suchomel RW. MRP and MDR1 gene expression in primary breast carcinomas. Clin Cancer Res 1996;2:1231-7.
57. Arnal M, Franco N, Fargeot P, Riedinger JM. Enhancement of mdr1 gene expression in normal tissue adjacent to advanced breast cancer. Breast Cancer Res Treat 200;61:13-20
58. Faneyte IF, Kristel PMP, van de Vijver MJ. Determining MDR1/P-glycoprotein expression in breast cancer. Int J Cancer 2001; 93:114-22.

59. Ro J, Sahin a, Ro JY. Immunohistochemical analysis of p-glycoprotein expression correlated with chemotherapy resistance in locally advanced breast cancer. *Hum Pathol* 1990;21:787-91.
60. Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O. C-erb2 (HER-2/neu) protein and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer* 1999;84:129-34.
61. Rudas M, Filipits M, Taucher S, Stranzl T, Steger GG, Jakesz R. Expression of MRP1, LRP and pgp in breast carcinoma patients treated with preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2003;81:149-57.
62. Noter K, de la Riviere GB, Look MP. The prognostic significance of expression of the multidrug-resistance associated protein (MRP) in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1997;76:486-93.
63. Scheffer GL, Wijngaard PLJ, Flens MJ. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nature Med* 1995; 1:578-82.
64. Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Schroijers AB, van der Valk P, Scheper RJ. Major vault protein LRP-related multidrug resistance. *Eur J Cancer* 1996;32A:979-84.
65. Beck WT, grogan TM, Willman CL, Cordon-Cardo C, Parham DM. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients tumors: consensus recommendations. *Cancer Res* 1996;56:3010-20.
66. Doyle LA, Yang W, Abruzza LV. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:15665-70.
67. Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by th breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 2003;22:7340-58
68. Aszalos A , Thompson K, Yin JJ Ross DD. Combinations of P-glycoprotein blockers, verapamil, PSC833, and cremophor act differently on the multidrug resistance associated protein (MRP) and P-glycoprotein (Pgp), *Anticancer Res* 1999; 19: 1053-64.



69. Evers R, Kool M, Smith AJ, van Deemter L, de Haas M, Borst P. Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and Pluronic L61 on MDR1 Pgp, MRP1 and MRP2-mediated transport. *Br J Cancer* 2000a;83:366-74
70. Böhme M, Büchler M, Müller M, Kepler D. Differential inhibition of cyclosporins of primary-active ATP-dependent transporters in the hepatocyte canalicular membrane. *FEBS Lett* 1993; 333: 193-6
71. Lum BL , Fisher GA, Brophy NA. Clinical trials of modulation of multidrug resistance. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations, *Cancer* 1993;72: 3502-14.
72. Tomris Ozben. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Letters* 580 (2006) 2903-2909.
73. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983 65(1-2).55-63
74. Chitnis MP, Menon RS, Basrur VS, Adwankar MK, Satyamoorthy K. Reversal of natural resistance to bouvardin (NSC 259968) in sarcoma 180 cells in vitro and in vivo by verapamil. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1985;110(3):221-4.
75. Robinson BA, Clutterbuck RD, Millar JL, McElwain TJ. Effects of verapamil and alcohol on blood flow, melphalan uptake and cytotoxicity, in murine fibrosarcomas and human melanoma xenografts. *Br J Cancer.* 1996 May;53(5):607-14.
76. Merry S, Fetherston CA, Kaye SB, Freshney RI, Plumb JA. Resistance of human glioma to adriamycin in vitro: the role of membrane transport and its circumvention with verapamil. *Br J Cancer*, 1986 Jan;53(1):129-35.
77. Ballou RJ, Simpson WG, Harty JI, Tseng MT. Verapamil enhanced in vitro chemosensitivity of a murine bladder carcinoma, FCB. *Urol Res.* 1986;14(4):195-200.
78. Futscher BW, Foley NE, Gleason-Guzman MC, Meltzer PS, Sullivan DM, Dalton WS. Verapamil suppresses the emergence of P-

- glycoprotein-mediated multi-drug resistance. *Int J Cancer*.1996 May 16;66(4):520-5.
79. Timcheva CV, Todorov DK. Does verapamil help overcome multidrug resistance in tumor cell lines and cancer patients? *J Chemother*. 1996 Aug;8(4):295-9.
  80. Yalowich JC, Zucali JR, Gross M, Ross WE. Effects of verapamil on etoposide, vincristine, and adriamycin activity in normal human bone marrow granulocyte-macrophage progenitors and in human K562 leukemia cells in vitro. *Cancer Res*,1985, October; 45,4921-4924.
  81. Beck WT, Cirtain MC, Look AT, Ashmun RA. Reversal of Vinca alkaloid resistance but not multiple drug resistance in human leukemic cells by verapamil. *Cancer Res*, 1986 Feb;46(2):778-84.
  82. Yalowich JC, Ross WE. Verapamil-induced augmentation of etoposide accumulation in L1210 cells in vitro. *Cancer Res*. 1985 Apr;45(4):1651-6.
  83. Okano M, Kawamoto S, Nezasa S, Tamaki M, Ehara H, Yamada S, Deguchi T, Kawada Y. Enhancement of cytotoxic effect of anticancer agents of renal cell carcinoma. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*. 1996 Aug;87(8):1041-7.
  84. Warmann S, Göhring G, Teichmann B, Geerlings H, Fuchs J. MDR1 modulators improve the chemotherapy response of human hepatoblastoma to doxorubicin in vitro. *J Pediatr Surg*. 2002 Nov;37(11):1579-84.
  85. Ehrlichova M, Vaclavikova R, Ojima I, Pepe A, Kuznetsova LV, Chen J, Truksa J, Kovar J, Gut I. Transport and cytotoxicity of paclitaxel, docetaxel, and novel taxanes in human breast cancer cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2005 Jul;372(1):95-105.
  86. Pesic M, Markovic JZ, Jankovic D, Kanazir S, Markovic ID, Rakic L, Ruzdijic S. Induced resistance in the human non small cell lung carcinoma (NCI-H460) cell line in vitro by anticancer drugs. *J Chemother*. 2006 Feb;18(1):66-73.

87. Sulova Z, Macejova D, Seres M, Sedlak J, Brtko J, Breier A. Combined treatment of P-gp-positive L1210/VCR cells by verapamil and all-trans retinoic acid induces down-regulation of P-glycoprotein expression and transport activity. *Toxicol In Vitro*. 2008 Feb;22(1):96-105.
88. Simpson WG, Tseng MT, Anderson KC, Harty JI. Verapamil enhancement of chemotherapeutic efficacy in human bladder cancer cells. *J Urol*. 1984 Sep;132(3):574-6.
89. Guo JC, Zhao YP, Liao Q, Zhu Y. Significance and reversal of MDR1/P-gp in pancreatic cancer chemotherapy. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2007 Nov 1;45(21):1488-90.
90. Shen f, Chu S, Bence AK, Bailey B, Xue X, Erickson PA, Montrose MH, Beck WT; Erickson LC. Quantitation of doxorubicin uptake, efflux, and modulation of multidrug resistance (MDR) in MDR human cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Jan;324(1):95-102.
91. Chung SY, Sung MK; Kim NH, Jang JO, Go EJ, Lee HJ. Inhibition of P-glycoprotein by natural products in human breast cancer cells. *Arch Pharm Res*. 2005 Jul;28(7):823-8.
92. Charles D. Smith and Jack T. Zilfou: Circumvention of P-glycoprotein-mediated multiple Drug Resistance by phosphorylation Modulators Is independent of Protein Kinases. *The Journal of biological chemistry*. 1995
93. Kars MD, Işeri OD, Gunduz U, Molnar J. Reversal of multidrug resistance by synthetic and natural compounds in drug-resistant MCF-7 cell lines. *Chemotherapy*. 2008;54(3):194-200.
94. Dong Li, Seong H. Jang, Jonghan Kim, m. Guillaume Wientjes, and Jessie I.-S. Au. Enhanced Drug-Induced Apoptosis Associated with P-Glycoprotein Overexpression Is Specific to Antimicrotubule Agents *Pharmaceutical Research*, 2003
95. Marie Ehrlichova-Radka Vaclavikova-Iwao Ojima-Antonella Pepe,

Larisa V. Kuznetsova et al: Transport and cytotoxicity of paclitaxel, docetaxel and novel taxanes in human breast cancer cells. Naunyn-Schmiedeberg's arch Pharmacol. 2005

96. Yan X, Hou M, Li SF, Liu YY. Experimental study on thermochemotherapy combined with verapamil for reversing the multidrug resistance responsible to breast cancer cell. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.2008 May;39(3):391-3.
97. Zhirong Zhan, Stefania Scala, Anne Monks, Curtis Hose, Susan Bates, Tito Fojo: Resistance to paclitaxel mediated by P-glycoprotein can be modulated by changes in the Schedule of administration. Cancer chemother Pharmacol,1997 40:234-250
98. Ding S, Chamberlain M, McLaren A, Goh L, Duncan I, Wolf CR (2001) Cross-talk between signalling pathways and the multidrug resistant protein MDR-1 Br J Cancer 85:1175-1184

## **EKLER**

Ek: 1- Etik Kurul Yazısı

Ek: 2- Kısaltmalar

## KISALTMALAR

Ek: 2

<b>BRCA-1</b>	: Breast Cancer Resistance Protein 1
<b>BRCA-2</b>	: Breast Cancer Resistance Protein 2
<b>BRCP</b>	: Breast Cancer Resistance Protein
<b>CA 15-3</b>	: Karbonhidrat Antigen 15-3
<b>CA-549</b>	: Karbonhidrat Ag 549
<b>CEA</b>	: Karsino Embriyonik Antigen
<b>EGFR</b>	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptör
<b>FEC</b>	: 5-Floroussali-Epirubisin-Siklofosfamid
<b>LRP</b>	: Lung Cancer Resistance Related Protein
<b>MCA</b>	: Mücin-like Karsinoma Associated Antigen
<b>MDR 1</b>	: Multi Drug Resistance 1
<b>MI</b>	: Minimum yaşam
<b>MO</b>	: İlaç uygulanmamış kontrol
<b>MRP 1</b>	: Multidrug Resistan Associated Protein 1
<b>MTT</b>	: Metiltiazoltetrazolium
<b>OKS</b>	: Oral Kontraseptif
<b>P-gp</b>	: P-glikoprotein
<b>RT-PCR</b>	: Eş zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu
<b>TİK</b>	: Test İlaç Konsantrasyon
<b>TPA</b>	: Doku Polipeptid Antigen

## TEŐEKKÖRLER

Her zaman bilgilerini bizimle paylaŐan, eğitimim ve tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı değerli hocam ve uzmanlık tezi danıŐmanım Doç. Dr. Engin ULUKAYA'ya, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen ve bizi her konuda destekleyen değerli hocam Biyokimya Anabilim Dalı BaŐkanı Prof. Dr. Melahat DİRİCAN'a Őükranlarımı ve saygılarımı sunarım. Bilgi ve deneyimlerini paylaşarak zamanlarını ve emeklerini harcayan kürsümüzün tüm öğretim üyelerine teŐekkürlerimi sunarım.

Beraber görev yaptığım, dostluğunu ve arkadaŐlığını hiçbir Őeye deđiŐmeyeceđim sevgili arkadaŐım Uzm. Dr. Arzu YILMAZTEPE ORAL'a yardımını ve desteği için, aynı zamanda sevgili iŐ arkadaŐlarıma, özellikle Dr. Őeniz KALE KORKMAZ'a teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca laboratuvarımızdaki çalıŐmalarımıza dolaylı olarak katkıları bulunan Hasibe Hanım ve Cemil Bey'e de teşekkür ederim.

Hiçbir zaman sevgi ve desteğini esirgemeyen değerli eŐim, annem, babam ve kardeŐlerime, ayrıca yaşam kaynağım olan çocuklarım Orkun ve Onay'a teşekkür eder sevgilerimi sunarım.

## ÖZGEÇMİŞ

Bursa'da doğdum. İlkokulu Bursa Barbaros İlköğretim okulunda, ortaokulu Bursa Çınar Lisesinde, liseyi Bursa Ticaret Lisesinde okudum. Tıp eğitimime Eskişehir Anadolu üniversitesi Tıp Fakültesinde başladım. 1994 yılında Osmangazi Tıp Fakültesinden tıp doktoru olarak mezun oldum. 1994-1995 yılları arasında Çankırı'nın ilçesi Korgun'da Korgun Sağlık Ocağında mecburi hizmetimi yaptım. 1995-1997 tarihleri arasında Bursa Harmancık Sağlık Ocağında, 1997-2004 yıllarında Bursa Yavuz Selim Sağlık Ocağında çalıştım. 2004 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında uzmanlık eğitimime başladım.