

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEME KANSERİNDE SİSPLATİN HÜCRESEL YANITININ DDB2 VE
DNA POLİMERAZ ETA ÜZERİNDEN İNCELENMESİ**

ONUR AKTAN

**Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2022

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEME KANSERİNDE SİSPLATİN HÜCRESEL YANITININ DDB2 VE DNA
POLİMERAZ ETA ÜZERİNDEN İNCELENMESİ**

ONUR AKTAN

**Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Gülnihal KULAKSIZ ERKMEN**

**ANKARA
2022**

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MEME KANSERİNDE SİSPLATİN HÜCRESEL YANITININ DDB2 VE DNA POLİMERAZ ETA
ÜZERİNDEN İNCELENMESİ

Öğrenci: Onur Aktan

Danışman: Doç. Dr. Gülnihal Kulaksız Erkmen

Bu tez çalışması 27.12.2021 tarihinde jürimiz tarafından “Biyokimya Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Yasemin Beyazıt*
Hacettepe Üniversitesi

Tez Danışmanı: *Doç. Dr. Gülnihal Kulaksız Erkmen*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Aylin Sepici Dinçel*
Gazi Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Z. Günnur Dikmen*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Ebru Bodur*
Hacettepe Üniversitesi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

11 Ocak 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim. Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. (1)
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 6 ay ertelenmiştir. (2)
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. (3)

...../...../.....

Onur AKTAN

1

¹"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü veya fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü veya fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum tarafından** verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu tarafından** verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Doç. Dr. Gülnihal KULAKSIZ ERKMEN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Onur AKTAN

* Tez **danışmanının** nerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

TEŞEKKÜR

“If we knew what it was we were doing, it would not be called research, would it? “

- Albert Einstein

Başta beni dünyaya getiren ve bu günlere gelmemde çok büyük emeği olan annem Fatma AKTAN’a, destekleriyle beni hiçbir konuda, hiçbir zaman yalnız bırakmayan eşim Özlem MUT AKTAN’a, şu an burada olmama neden olan kardeşim Gözde AKTAN’a,

Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda danışmanlığımı yapmaya başladığı ilk andan itibaren bana olan güveni, sabrı ve ilgisi ile destek olan, bilgisini ve deneyimlerini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gülnihal KULAKSIZ ERKMEN’e,

Tez çalışmamda kullandığım hücrelerin teminini sağlayan Prof. Dr. Yasemin AKSOY ve Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü öğretim üyesi Prof. Dr. Lale DOĞAN’a,

Deneysel çalışmalarım sırasında laboratuvar imkanlarından ve çok değerli bilgilerinden faydalandığım Prof. Dr. Ebru BODUR’a, Dr. Esra BÜBER’e, Dr. Başak ÇELTİKÇİ’ye, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Özden TACAL’a ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’ndaki değerli hocalarıma,

İstatistiksel analizlerde yardımını esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Dr. Sevilay KARAHAN’a,

Ayrıca, destek ve yardımları için Dr. Mustafa Emre GEDİK’e, Dr. Seyhan TÜRK’e, Berk SAĞLAM’a, Nazlı COŞKUN’a ve Esin ÖZ’e,

en içten duygularıyla teşekkür ederim.

ÖZET

Aktan, O. Meme Kanserinde Sisplatin Hücresel Yanıtının DDB2 ve DNA Polimeraz Eta Üzerinden İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Bu çalışmada, MCF-7 meme kanser hücrelerine sisplatin ile birlikte PNR-7-02 verilmesinin hücre canlılıkları ve DNA hasar yanıtlarında görev alan DDB2 ve DNA polimeraz η proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonları üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Sisplatin, platin grubu içeren antineoplastik bir ilaçtır. Etkisini DNA'ya bağlanıp replikasyonu engelleyerek ve hücreyi apoptoza götürerek gerçekleştirir. PNR-7-02 ise DNA hasar toleransında görevli insan DNA polimerazı η 'nın inhibitörü olarak geliştirilmiş, indol tiyobarbitürik asitten türevlendirilmiş bir kimyasal moleküldür. MCF-7 hücrelerine sisplatin, PNR-7-02 ve kombinasyonları 24 ve 48 saat süre ile uygulanmış, hücre canlılıklarına etkisi MTT deneyi ile belirlenmiştir. Kombine uygulamanın hücre canlılıkları üzerine etkileri Chou-Talalay yöntemiyle değerlendirilmiştir. DDB2 ve DNA polimeraz η gen ekspresyon analizleri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. IC50 değerlerinde verilen ilaç kombinasyonlarının hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığı (24 saat için $p \leq 0,01$, 48 saat için $p \leq 0,005$) gözlenmiştir. Chou-Talalay yöntemi ile düşük sisplatin dozlarında (24 saat için $< 36 \mu\text{M}$, 48 saat için $< 16 \mu\text{M}$) kombine ilaç uygulamasının sinerjistik bir etkisinin ($CI < 1$) olduğu hesaplanmıştır. 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi için IC50'ye uygun dozlarda ilaç uygulandığında, DDB2 ve Pol η gen ekspresyonlarının kontrol gruplarına göre sisplatin, PNR-7-02 ve kombine ilaç verilmiş hücrelerde arttığı bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Meme Kanseri, Sisplatin, DDB2, PNR-7-02, DNA Polimeraz η , İlaç Direnci

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje No: TYL-2020-18767

ABSTRACT

Aktan, O. Investigation of Cisplatin Cellular Response in Breast Cancer by DDB2 and DNA Polymerase Eta. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Biochemistry Program, Master Thesis, Ankara, 2022. In this study, it was aimed to investigate the effect of administration of PNR-7-02 together with cisplatin to MCF-7 breast cancer cells on the expression of genes encoding DDB2 and DNA polymerase η proteins, which are involved in DNA damage responses and cell viability, respectively. Cisplatin is an antineoplastic drug containing a platinum group. It exerts its effect by binding to DNA, inhibiting replication and leading the cell to apoptosis. PNR-7-02 is a chemical molecule derived from indole thiobarbituric acid and developed as an inhibitor of human DNA polymerase η , which is involved in DNA damage tolerance. In this study, cisplatin, PNR-7-02 and their combinations were applied to MCF-7 cells for 24 and 48 hours and their effect on cell viability was determined by MTT assay. The effects of the combined application on cell viability were evaluated by the Chou-Talalay method. DDB2 and DNA polymerase η gene expression analyzes were performed by quantitative real-time polymerase chain reaction. It was observed that given drug combinations at IC50 values were significantly reduced cell viability ($p < 0.01$ for 24 hours, $p \leq 0.005$ for 48 hours). Through calculation by the Chou-Talalay method a synergistic effect ($CI < 1$) at low doses of cisplatin when combined with PNR-7-02 was found. When the drugs are administered in doses appropriate to the IC50 for the 24 and 48 hour incubation period, it was found that DDB2 and Pol η gene expressions were increased in single/combined drug-treated cells as compared to the control groups.

Keywords: Breast Cancer, Cisplatin, DDB2, PNR-7-02, DNA Polymerase Eta, Drug Resistance

This thesis was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects

Coordination Unit. Project No: TYL-2020-18767

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser	4
2.2. Meme kanseri	5
2.2.1. Epidemiyoloji	5
2.2.2. Risk faktörleri	5
2.2.3. Histopatoloji, Sınıflandırma	6
2.2.4. Prognostik ve Prediktif Belirteçler	8
2.2.5. Tedavi	10
2.3. Sisplatin	13
2.3.1. Sisplatine Karşı Direnç Gelişimi	16
2.4.2. Sisplatinin İndüklediği DNA Hasarlarına Hücresele Yanıtlar	17
2.4.3. Baz Eksizyon Onarımı ve Sisplatin	19
2.4.4. Homolog Rekombinasyonel Onarım ve Sisplatin	20
2.4.5. Non-Homolog Uçların Birleşmesi ve Sisplatin	20

2.4.6. Yanlış Eşlenmiş Bazların Onarımı ve Sisplatin	21
2.4.7. Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Sisplatin	22
2.4.8. DNA Hasarına Tolerans-Translezyon DNA Sentezi	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Gereçler	32
3.1.1. Kimyasallar	32
3.1.3. Hücre Hatları	32
3.1.4. Primerler	33
3.1.5. Cihazlar	33
3.2. Yöntemler	34
3.2.1. Hücrelerin Büyütülmesi	34
3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması ve Sayılması	34
3.2.3. Hücre Büyümesinin Doğrusal Olduğu Aralığın Belirlenmesi	36
3.2.4. MTT Deneyi	36
3.2.5. Sisplatin ve PNR-7-02'nin MCF-7 Hücre Hattındaki IC50 Değerlerinin Belirlenmesi	37
3.2.6. İlaç Kombinasyon Testleri	38
3.2.7. Gen İfadelenme Çalışmaları	38
3.2.8. Hücrelerin Toplanması ve RNA izolasyonları	38
3.2.9. Agaroz Jel Elektroforezi	39
3.2.10. cDNA Sentezi	40
3.2.11. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	41
3.2.12. İstatistiksel Analizler	41
4. BULGULAR	42
4.1. Hücre Canlılık Deneylerinde Kullanılacak Hücre Sayısının Belirlenmesi	42
4.2. Sisplatinin MCF-7 Hücre Hattında Hücre Canlılığına Etkisinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi	44

4.3. PNR-7-02'nin MCF-7 Hücre Hattında Hücre Canlılığına Etkisinin Belirlenmesi	47
4.4. Sisplatin ve PNR-7-02 için IC50 değerlerinin hesaplanması	50
4.5. Kombinasyon İndeksi ve İlaç Azaltım İndeksi Verileri	50
4.6. Sisplatin ve PNR-7-02'nin Kombine Uygulanmasının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi	55
4.7. Sisplatin ve PNR-7-02'nin Kombine Uygulanmasının DDB2 ve Pol η Gen İfadelenmesi Üzerindeki Etkisi	57
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
7. KAYNAKLAR	72
8. EKLER	81
EK-1: Dijital Makbuz	81
EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Ekran Çıktısı	82
9. ÖZGEÇMİŞ	83

SİMGELER ve KISALTMALAR

μl/μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
ADP	Adenozin difosfat
anti-HER2	Anti-insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2
APE1	Apuritik/apirimidinik endonükleaz 1
ATM	Ataksi-Telenjiyektazi- <i>Mutated</i>
ATP7A	ATPaz bakır taşıyıcı alfa
ATP7B	ATPaz bakır taşıyıcı beta
ATR	ATM- ve Rad3- ilişkili kinaz
BER	Baz Eksizyon Onarımı
BRCA1	Meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini
BRCA2	Meme kanseri tip 2 duyarlılık proteini
CDDP	cis-diamin dikloroplatin (II) - Sisplatin
CDK	Siklin bağımlı kinaz
cDNA	Komplementer DNA
Chk1	<i>Checkpoint</i> kinaz 1
Chk2	<i>Checkpoint</i> kinaz 2
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i> - Çin hamsteri yumurtalığı
CI	Kombinasyon İndeksi
CMF	Siklofosamid, Metotreksat, Fluorourasilin
CO2	Karbon dioksit
COP9	<i>Constitutive photomorphogenesis protein 9</i> (Yapısal fotomorfogenez proteini 9)
COX-2	Siklooksijenaz-2
CSA	<i>Cockayne syndrome grup A</i>

CSB	<i>Cockayne syndrome grup B</i>
Ct	Cycle treshold
CTR1	<i>Copper transport protein</i> – Bakır taşıyıcı protein
DDB1	Hasara bağlanan protein 1
DDB2	Hasara bağlanan protein 2
DLD-1	Kolorektal adenokarsinom hücre hattı
DMEM-LG	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium – Low Glucose</i>
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DNA-PK	DNA bağımlı protein kinaz
dNTP	Nükleosit trifosfat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffer</i> – Dulbecco'nun Fosfat tamponu
DRI	Doz azaltıcı indeks
E1	Östron
EGFR	Epitelyal büyüme faktör reseptörü
ER	Östrojen reseptörü
ERBB2	Eritroblastik onkogen B
Fa	Etkilenen fraksiyon
GG-NER	Genel genom – nükleotid eksizyon onarımı
GLOBOCAN	Global kanser istatistikleri
GSH	Glutatyon
HER2/neu	İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2
HR	Homolog rekombinasyon
HRR	Homolog rekombinasyon onarımı
IC50	inhibitör konsantrasyon 50
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
kDa	Kilodalton
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>

ml/mL	Mililitre
MLH1	MutL homolog 1
mM	Milimolar
MMR	Yanlış eşlenmiş bazların onarımı
MRN	Mre11-Rad50-NBS1
MSH2	MutS homolog 2
MSH3	MutS homolog 3
MSH6	MutS homolog 6
mTOR	rapamisin'in memeli hedefi
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NER	Nükleotid eksizyon onarımı
NHEJ	Homolog olmayan uç birleştirme
PALB2	BRCA2 ortağı ve yerini belirleyicisi
PARP	Poli (ADP-riboz) polimeraz
PARP1	Poli (ADP-riboz) polimeraz 1
PCNA	Prolifere hücre nükleer antijeni
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF	Plateletlerden derive büyüme faktörü
PMS2	Postmeiotic Segregation Increased 2
PNR-7-02	5-((5-kloro-1-(naftalen-2-ilmetil)-1H-indol-3-il)metilen)-2-tioksodihidro pirimidin-4,6(1H,5H)-dion
POLB	DNA polimeraz beta geni
POLH	DNA polimeraz eta geni
PR	Progesteron Reseptörü
Pt	Platin
PTEN	Fosfataz ve tensin homoloğu

qPCR	Kantitatif PCR
qRT-PCR	Kantitatif gerçek zamanlı PCR
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPA	Replikasyon proteini A
RT/RTaz	Ters transkriptaz
SERD	Seçici Östrojen Reseptörü İndirgeyici
SERM	Seçici Östrojen Reseptör Modülatörü
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
STK11/LKB1	Serin/treonin kinaz 11 / Karaciğer kinaz B1
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TC-NER	Transkripsiyona kenetlenmiş NER
TCR	Transkripsiyona kenetlenmiş onarım
TFIIH	Transkripsiyon faktörü II H
TGF	Transforme edici büyüme faktörü
TLS	Translezyon sentezi
TNM	Tümör,Nod,Metastaz
UV-DDB	UV hasarlı DNA bağlayıcı protein
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
XPA	Kseroderma pigmentozum A
XPC	Kseroderma pigmentozum C
XPE	Kseroderma pigmentozum E
XPG	Kseroderma pigmentozum G
XPV	Kseroderma pigmentozum V
XRCC1	X-ışını onarım çapraz tamamlayıcı protein 1

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Meme kanserlerinin histopatolojik ve moleküler sınıflandırılması.	8
2.2. Sisplatinin kimyasal yapısı.	14
2.3. Sisplatinin kandan hücre içine geçişi sonrası aktif forma dönüşmesi ve nükleusta DNA hasarı oluşturması.	14
2.4. Memeli hücrelerinde sisplatinin hücre içine alımı, birikimi ve atılımı.	15
2.5. Sisplatin-DNA eklentileri ve görülme sıklıkları.	16
2.6. İnsanda nükleotid eksizyon tamiri.	23
2.7. Translezyon sentezinin basit mekanizması.	27
2.8. DNA Pol η görüntüsü.	29
2.9. PNR-7-02'nin yapısı.	29
2.10. İnsan DNA polimeraz η proteinin <i>domain</i> leri.	30
3.1. Neubauer lamının görünümü A. Üstten görünüş, B. Yandan görünüş.	35
3.2. Neubauer lamında örnek bir hücre sayım görüntüsü.	36
3.3. Total RNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.	40
4.1. MCF-7 meme kanseri hücre hatlarının (ekimden 48 saat sonra) artan hücre sayılarına (Hücre sayısı: $2-8 \times 10^3$) karşı absorbands grafiği.	42
4.2. MCF-7 meme kanseri hücre hatlarının (ekimden 72 saat sonra) artan hücre sayılarına (Hücre sayısı: $2-12 \times 10^3$) karşı absorbands grafiği.	43
4.3. MCF-7 meme kanseri hücre hatlarının (ekimden 96 saat sonra) artan hücre sayılarına (Hücre sayısı: $2-12 \times 10^3$) karşı absorbands grafiği.	43
4.4. MCF-7 hücrelerinin farklı sisplatin dozları ile 24 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % hücre canlılık grafikleri.	44
4.5. MCF-7 hücrelerinin farklı sisplatin dozları ile 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % hücre canlılık grafikleri.	45

- 4.6.** MCF-7 hücrelerinin farklı sisplatin dozları ile 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % hücre canlılık grafikleri. 45
- 4.7.** MCF-7 hücrelerinin farklı sisplatin dozları ile 24-48-72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % hücre canlılık değerleri (n=4). 46
- 4.8.** MCF-7 hücrelerinin farklı PNR-7-02 dozları ile 24 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % hücre canlılığı grafikleri. 47
- 4.9.** MCF-7 hücrelerinin farklı PNR-7-02 dozları ile 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % hücre canlılığı grafikleri. 48
- 4.10.** MCF-7 hücrelerinin farklı PNR-7-02 dozları ile 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % hücre canlılığı grafikleri. 48
- 4.11.** MCF-7 hücrelerinin farklı PNR-7-02 dozları ile 24-48-72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % hücre canlılık değerleri. 49
- 4.12.** MCF-7 hücrelerinin 24 saat süre ile IC50 değerlerine uygun derişimlerde sisplatin ve/veya PNR-7-02'ye maruz bırakılması ile elde edilen % hücre canlılık grafiği. 56
- 4.13.** MCF-7 hücrelerinin 24 saat süre ile IC50 değerlerine uygun derişimlerde sisplatin ve/veya PNR-7-02'ye maruz bırakılması ile elde edilen % hücre canlılık grafiği. 57

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. İnvaziv meme kanserinde prognostik ve prediktif belirteçler.	9
2.2. Meme kanserinde kullanılan/aday prognostik/prediktif belirteçler.	9
2.3. İnsanda DNA hasarları ve onarımında rol alan ana mekanizmalar.	19
2.4. Nükleotid eksizyon onarım faktörleri ve işlevleri.	22
3.1. Deneyde kullanılan kimyasal malzemelerin listesi.	32
3.2. Deneyde kullanılan primerler.	33
3.3. Deneylede kullanılan cihazların listesi.	33
3.4. cDNA sentezi reaksiyon ortamı.	41
3.5. qRT-PCR reaksiyon ortamı.	41
3.6. qRT-PCR reaksiyon koşulları.	41
4.1. Sisplatin ve PNR-7-02 için hesaplanan IC50 değerleri.	50
4.2. MCF-7 hücrelerinde 24 saat boyunca kombine ilaç uygulaması ile elde edilmiş verilerle CompuSyn yazılımında hesaplanan CI değerleri.	51
4.3. MCF-7 hücrelerinde 48 saat boyunca kombine ilaç uygulaması ile elde edilmiş verilerle CompuSyn yazılımında hesaplanan CI değerleri.	52
4.4. MCF-7 hücrelerinde 24 saat boyunca kombine ilaç uygulaması ile elde edilmiş verilerle CompuSyn yazılımında hesaplanan DRI değerleri.	53
4.5. MCF-7 hücrelerinde 48 saat boyunca kombine ilaç uygulaması ile elde edilmiş verilerle CompuSyn yazılımında hesaplanan DRI değerleri.	54
4.6. 24 saat süreyle IC50 dozlarında ilaç uygulaması sonrası DDB2 gen ekspresyonlarındaki değişim ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).	58
4.7. 24 saat süreyle IC50 dozlarında ilaç uygulaması sonrası POLH gen ekspresyonlarındaki değişim ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).	58

- 4.8.** 48 saat süreyle IC50 dozlarında ilaç uygulaması sonrası DDB2 gen ekspresyonlarındaki değişim ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). 58
- 4.9.** 48 saat süreyle IC50 dozlarında ilaç uygulaması sonrası DDB2 gen ekspresyonlarındaki değişim ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). 59

1. GİRİŞ

Kanser, anormal hücre büyümesinin neden olduğu bir grup hastalıktır ve dünyada en çok ölüme neden olan ikinci sağlık sorunudur. Meme kanseri 2020 yılında cinsiyete bakılmaksızın tüm kanserler içinde en çok teşhis konulan kanser türüdür (1). Yeni teşhis konulmuş kanserlerin %11,7'sini ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %6,9'unu oluşturur (2).

Meme kanseri tedavisinde cerrahi yöntemler, radyoterapi, kemoterapi ile reseptör hedefli tedavi yöntemleri kullanılır (3, 4). Kemoterapi, özellikle kanser gibi hızlı çoğalan hücreleri öldürmek için kullanılan ilaç tedavisinin genel adıdır. Farklı etki mekanizmalarına sahip bir çok kemoterapi ilacı mevcuttur (5). Bu ilaçlardan alkilleyici ajanlar, DNA zincirleri arasında çapraz bağlar oluşturarak DNA hasarı yaratırlar. Böylece replikasyonu engeller ve apoptotik yolları indükleyerek kanserli hücreleri öldürürler (6).

Alkilleyici ajanlardan biri olan sisplatin (cis-diamin dikloro platin II, cis-DDP) anti tümör etkili platin bazlı bir moleküldür (7). Sisplatin intravenöz olarak uygulanır. Göreceli yüksüz, reaktif olmayan şekilde hücreye ulaşır (8). Hücre içine girdikten sonra aktif platin (II) formuna dönüşür. Aktif form güçlü elektrofilik özelliktedir ve nükleofilik bölgesi olan herhangi bir makromolekül (DNA, RNA, proteinler, membran fosfolipitleri, hücre iskeleti elemanları ve tiyol grubu içeren moleküller) ile etkileşebilir. Sisplatinin aktif formu hücre içinde pek çok makromoleküle etkileşmekle birlikte asıl sitotoksik etkisinin hücre DNA'sında hasarlar oluşturmasından kaynaklandığı kabul edilmektedir. Bu hasarların büyük kısmı (~%90) 1,2-GpG, 1,2-ApG zincir içi çapraz bağlar şeklindedir. Yaklaşık %2 oranında 1,3-zincir içi guaninler arasında çapraz bağlanma, %1'den daha az oranda zincirler arası çapraz bağlanma, çok az miktarda da monofonksiyonel G-eklentisi

oluşturur (7, 9). Sisplatinin indüklediği DNA hasarları DNA replikasyonunun ilerlemesini engeller. Durmuş replikasyon hücrede apoptozu tetikler ve hücreyi ölüme götürür (6).

Sisplatin tedavisindeki en büyük sorunlardan biri ilaç direncidir. İlaç direnci, uygulanan ilacın kanserli hücrelerde yeterince etkisini gösterememesidir ve daha yüksek ilaç kullanımını gerektirir. Bu durum ilaç kullanımını sınırlayıcı olan istenmeyen yan etkilerin artışına neden olur. Sisplatin direncinden sorumlu olduğu düşünülen mekanizmalar arasında sisplatinin hücre içinde birikiminin azalması (10-12), sisplatinin glutasyon, metallothiyenin ya da diğer kükürt içeren moleküllerle inaktivasyonu (13), sisplatin-DNA çapraz bağları eklentilerini onaran tamir mekanizmalarının artışı (14, 15) ve sisplatinle indüklenen eklentilere karşı DNA hasar toleransının artışı (16, 17) sayılabilir. Sisplatinin kemoterapötik etkisi DNA hasarları sonucu gerçekleştiğinden (18) DNA onarım mekanizmaları ve DNA hasar toleransının artışı direnç mekanizmaları arasında özel bir öneme sahiptir.

DNA'da oluşan hasarların onarılması, oluşan hasarın türüne bağlı olarak farklı mekanizmalarla gerçekleşir. Direkt onarım mekanizması, nükleotid eksizyon onarımı (NER), baz eksizyon onarımı (BER), yanlış eşlenmiş bazların onarımı (MMR), homolog rekombinasyonel onarım (HRR), non-homolog uçların birleşimi (NHEJ), zincirler-arası çapraz bağların onarımı bilinen onarım mekanizmalarındandır (19).

Sisplatin-DNA eklentilerinin onarımında ana mekanizma nükleotid eksizyon onarımıdır (NER). Nükleotid eksizyon onarımı, DNA'da distorsiyona neden olan büyük DNA eklentilerinin onarımından sorumlu olan, bilinen en genel onarım mekanizmasıdır. Bu mekanizmada hasar birden fazla protein tarafından tanınır. Hasarı içeren zincirden bir oligonükleotid parça kesilir ve uzaklaştırılır. Kesim sonucu oluşan boşluk bölgesinde komplementer zincir kalıp olarak kullanılarak DNA polimerazlarla tamir sentezi gerçekleştirilir ve DNA ligazlarla zincir bütünlüğü sağlanır. Mekanizma genel genom NER'i (GG-NER) ve transkripsiyonun aktif olduğu genlerde gerçekleşen transkripsiyona kenetlenmiş NER (TC-NER, TCR) olmak üzere 2 yol içerir. Bu mekanizmada yer aldığı

belirtilen ultraviyole (UV) ışığı tarafından indüklenerek hasara bağlanan protein 2 (DDB2, UV-DDB2, XPE, p48) hasar bölgesine ilk ulaşan proteinlerdendir ve hasar tanıma proteini olabileceği düşünülmüştür (20). Bu protein, DDB1 adı verilen 127 kDa'luk bir proteinle UV-DDB heterodimerini oluşturur. DDB2'nin *in vitro* olarak NER aktivitesini arttırmadığı (21), *in vivo* NER'de ise etkili olduğu gösterilmiştir (22). DDB2'nin transkripsiyonda, kromozom segregasyonunda, hücre döngüsünde, apoptozda, protein degradasyonunda da işlev gören bir multifonksiyonel protein olduğunu ortaya koyan birçok çalışma yapılmıştır (21, 23-26).

DNA hasar yükünün çok fazla olduğu durumlarda onarım mekanizmaları yeterli olmazsa lezyon gerektiği gibi hızlı bir şekilde ortadan kaldırılamaz ve replikasyonun ilerlemesi engellenir. Bu durumda hücrede lezyona rağmen polimeraz aktivitesi gösterebilen, *proofreading* aktivitesi bulunmayan özelleşmiş DNA polimerazlar ile replikasyona devam edilebilir. Bu süreç, translezyon DNA sentezi (TLS) olarak adlandırılır. DNA tamir kapasitesinin yetersiz olması durumunda replikasyondan sorumlu DNA polimerazlar ile TLS için özelleşmiş DNA polimerazlar replikasyon çatalında yer değiştirir, lezyon TLS polimerazlar ile atlanır ve tekrar replikatif DNA polimerazlar DNA sentezine devam ederek replikasyonun devamlılığını sağlar. DNA polimeraz η (Poleta) bu polimerazların en etkililerindendir ve POLH geni tarafından kodlanır (27).

Bu çalışmada, sisplatin verilmiş MCF-7 insan meme adenokanseri hücre hatlarında DNA polimeraz η inhibisyonunun hücre proliferasyonu/canlılığı üzerine etkisinin olup olmadığının, bu inhibisyonun sisplatin ile birlikte hücre canlılığına etkisinin incelenmesi, sisplatinin tek ya da Pol η inhibitörü ile birlikte uygulanması durumunda DDB2, Pol η gen (POLH) ekspresyonlarının değişiminin incelenmesi planlanmıştır. Tez çalışmasından elde edilecek sonuçların sisplatine ilaç direnç gelişimine karşı aranan çözüme katkı sağlaması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, vücudun diğer bölgelerine yayılma potansiyeli olan, anormal hücre büyümesinin neden olduğu bir grup hastalığı ifade eder (1). Dünyada kalp hastalıklarından sonra ikinci ölüm nedeni olan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2021 yılında 1.898.160 kişinin yeni tanı alacağı, kansere bağlı ölümlerin de 608.570 olacağı tahmin edilmektedir (28). En sık görülen kanserler sırasıyla meme, akciğer, kolon, rektum, prostat, cilt ve mide olarak sıralanabilir (1).

Sağlıklı hücrelerin çok aşamalı bir süreçte malin tümör hücrelerine-kanserli hücrelere- dönüşümü genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu gerçekleşir. Kansere neden olan (karsinojen) etkenler fiziksel (UV ışınları, iyonize radyasyon vb.), kimyasal (asbest, tütün dumanının bileşenleri, aflatoksin, arsenik vb.) veya biyolojik (virüs ya da bakteriler vb.) olabilirler (1).

Kanserler, bazı istisnalar olmakla birlikte genellikle köken aldıkları dokulara ve farklılaşma özelliklerine göre adlandırılırlar. Epitel doku ve türevlerinden köken alan malin neoplazmlar karsinom, mezenkimal doku kökenli olanlar ise sarkom olarak adlandırılırlar. Tümörün köken aldığı hücre tipi de genellikle ön ad olarak eklenir. Örneğin bez ya da duktus kökenli epitelial kanser adenokarsinom, kondrosit kökenli mezenkimal bir kanser de kondrosarkom olarak isimlendirilir. Kaynak doku ve organ tanımlı (örneğin kolanjiyokarsinom), ya da diferansiyasyon durumuna göre (örneğin kötü diferansiye karsinom) isimlendirmeler de yapılmaktadır (29, 30).

2.2. Meme kanseri

2.2.1. Epidemiyoloji

Meme kanseri, global kanser istatistiklerine (GLOBOCAN) göre 2020 yılında cinsiyet gözetilmeksizin en sık yeni teşhis konulan kanser türüdür. Yeni teşhis konulan kanser vakalarının %11,7'sini (2.261.419 vaka) ve kansere bağlı ölümlerin %6,9'unu oluşturur. Kadınlarda ise meme kanseri en sık yeni teşhis alan (%24,5) ve en sık ölüme neden (%15,5) olan kanser türü olarak dikkat çeker. Gelişmiş/çok gelişmiş ülkelerde insidansının düşük/orta gelişmiş ülkelere göre daha yüksek olduğu, mortalitenin ise aksine gelişmiş/çok gelişmiş ülkelerde diğer ülkelere kıyasla daha az olduğu rapor edilmiştir (31). Meme kanseri yükünün yaşanılan coğrafya, yaşam tarzı, etnik köken, ırk gibi faktörlere göre değişkenlik gösterdiği belirtilmektedir (32).

2.2.2. Risk faktörleri

Meme kanseri gelişiminde yaş, menopoz durumu, önceden geçirilmiş meme kanseri öyküsü, aile öyküsü, immünsüpresyon durumu, beslenme durumu, hormonal olan/olmayan faktörler, genetik faktörler gibi çeşitli faktörlerin rol oynadığı gösterilmiştir (32, 33). İnsidansın 50 yaşa kadar arttığı, daha sonra azaldığı belirtilmektedir (33). Östrojen, progesteron gibi seks steroidlerinin hücre bölünme hızını etkilediği, proliferasyonu arttırdığı ve meme kanseri gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu hormonlara uzun süre ve/veya yüksek dozda maruz kalınmasına neden olan durumların (erken menarş, geç menopoz, nulliparite gibi menstrüel döngü sayısının fazla olduğu durumlar, ilk bebeğin geç yaşta doğurulması, hormon replasman tedavileri vb.) meme kanseri riskini arttırdığı belirtilmiştir. Aksine, geç menarş, erken menopoz, ilk bebeğin erken yaşlarda doğurulması, uzun emzirme süresi, erken yaşta oofektomi geçirilmesi durumlarında da riskin azaldığı saptanmıştır. Obezite, özellikle postmenopozal kadınlarda bir risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Postmenopozal dönemdeki

östrojeninin en önemli kaynağı periferik yağ dokudaki androstenedionun aromatisasyon ile östrona (E1) dönüşümüdür. Obezite ile östrojene maruziyetin artması postmenopozal dönemde özellikle hormon reseptörü pozitif meme kanseri riskini arttırmaktadır (32, 33).

Meme kanseri riskini hormonal olmayan faktörler de arttırmaktadır. Beslenme durumu (uzun süre yüksek yağlı diyetle beslenme, alkol tüketimi), radyasyona maruz kalma bu faktörler arasında sayılabilir.

Meme kanserine yatkınlık oluşturan genetik faktörler arasında en önemlileri DNA hasar yanıt yollarında görev alan tümör baskılayıcı *breast cancer type 1/2 susceptibility gene* (BRCA1 ve BRCA2) otozomal dominant germ hattı mutasyonlarıdır. BRCA1 geni 17. kromozomun (17q), BRCA2 geni de 13. kromozomun uzun kolunda yer alır. Kanserin inisiasyonu için her iki allelin de fonksiyonunu kaybetmiş olması gerekir. Herediter meme kanserlerinin %45'inden BRCA1, %35'inden de BRCA2 gen mutasyonlarının sorumlu olduğu saptanmıştır. PALB2 (*Partner and localization of BRCA2*) adı verilen, BRCA2'nin nükleer lokalizasyonuna izin veren proteini kodlayan genin mutasyonu da meme kanseri için risk faktörü olarak kabul edilmektedir. PTEN mutasyonlarıyla seyreden Cowden hastalığı, TP53 mutasyonlarıyla seyreden Li-Fraumeni sendromu, MSH2/MLH1 mutasyonlarıyla seyreden Muir-Torre sendromu, STK11/LKB1 mutasyonlarıyla seyreden Peutz-Jeghers sendromu, ATM mutasyonlarıyla seyreden Ataksi Telenjipektazi, Lynch sendromu gibi CDH1 mutasyonlarıyla seyreden herediter diffüz gastrik kanser sendromu da artmış meme kanseri riskiyle seyreden klinik tablolar olarak dikkat çekmektedir (32, 34).

2.2.3. Histopatoloji, Sınıflandırma

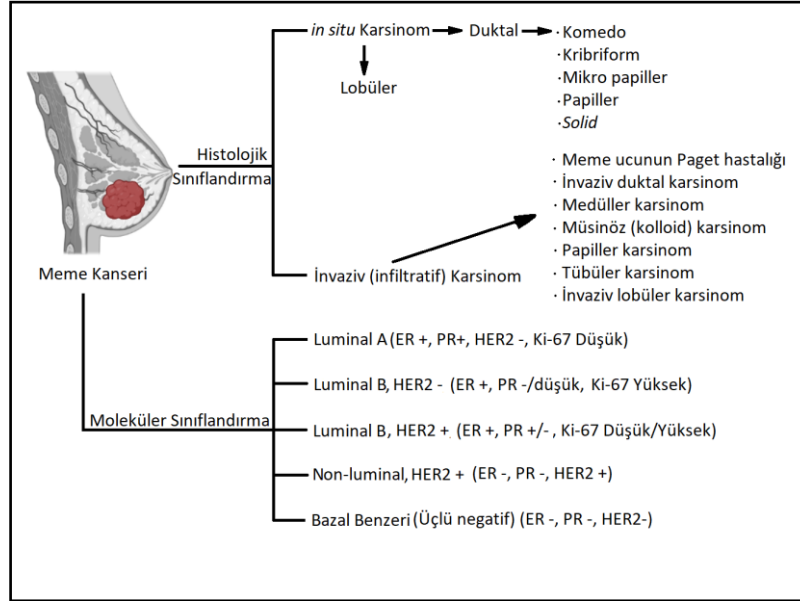
Meme kanserleri, kanser hücrelerin bazal membran tutulumu yapıp yapmamasına göre invaziv ya da *in situ* olarak ikiye ayrılırlar. *In situ* (bazal membranı tutmamış) karsinomlar da lobüler ya da duktal olarak sınıflandırılırlar. Lobüler *in situ* karsinomlar lobülün asinüslerinden ya da terminal duktuslarından köken alırken, duktal

in situ karsinomlar duktusları çevreleyen epitelin proliferasyonu ve duktus laminası içinde papiller büyüme ile seyrederek ilerler. Lobüler *in situ* karsinomların ileriki yıllarda %25-35, duktal *in situ* karsinomların ise %25-70 oranında invaziv karsinoma dönüşme riski bulunmaktadır.

İnvaziv meme kanserleri de köken aldıkları bölgeye göre lobüler ya da duktal karsinomlar olarak ayrılırlar. Ayrıca meme kanseri spesifik alt tipleri de tanımlanmıştır.

Klinik evrelemede meme kanserinde tümör çapı, lenf nodu tutulumu, metastaz durumuna göre değerlendirilmenin yapıldığı TNM (T=tümör, N = nod/lenf nodülü ve M = metastaz) sınıflandırması kullanılmaktadır (35).

Anatomik olarak yaygınlık, patolojik tiplendirme yanında çeşitli reseptörlerin ekspresyonunun varlığı/yokluğu/artmış olmasına göre de meme kanserleri sınıflandırılmaktadır. Bu reseptörler, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)'dir (36). Bunlar luminal A (ER ve PR pozitif, HER2 negatif ve düşük Ki-67 proliferasyon indeksi), luminal B (ER pozitif, PR pozitif/negatif/düşük, HER2 negatif veya pozitif ve yüksek/düşük seviyedeki Ki-67 proteini), HER2 pozitif/non-luminal (ER ve PR negatif ve HER2 pozitif) ve bazal benzeridir (ER, PR ve HER2 negatif) (37). Tedavinin planlamasında bu sınıflama önemlidir. Meme kanserinin histopatolojik ve moleküler sınıflandırması Şekil 2.1.'de özetlenmiştir (32, 38, 39).



Şekil 2.1. Meme kanserlerinin histopatolojik ve moleküler sınıflandırılması. Referans (39) 'dan esinlenerek hazırlanmıştır (32, 38).

2.2.4. Prognostik ve Prediktif Belirteçler

Meme kanseri için tedaviden bağımsız olarak hastalığın gidişini tahmin etmeye yardımcı prognostik belirteçler ve belirli tedavilere yanıtı öngörmeye yardımcı prediktif belirteçler tanımlanmıştır. İnvaziv meme kanserlerinde tümöre ait faktörler ve hastaya ait faktörler içinde (Tablo 2.1) moleküler belirteçler de prognostik ve prediktif faktörler arasında önemli yer tutmaktadırlar (32).

Bu belirteçler arasında steroid hormon reseptörleri ekspresyonu (ER ve PR) önemlidir. Hormonal faktörlerin meme kanserinin başlaması ve ilerlemesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Tümörde ER ve PR ekspresyonu olan hastaların, bu reseptörün ekspresyonu olmayan hastalara göre daha uzun yaşadığı, endokrin tedaviye daha iyi yanıt verdiği gösterilmiştir (33).

Tablo 2.1. İnvaziv meme kanserinde prognostik ve prediktif belirteçler (32).

Tümöre ait faktörler	Hasta bireye ait faktörler
▪ Tümör boyutu	▪ Yaş
▪ Lenf nodlarının durumu	▪ Menopoz durumu
▪ Histolojik/nükleer <i>grade</i>	▪ Aile öyküsü
▪ Lenfatik/Vasküler invazyon	▪ Öncesinde meme kanseri öyküsü varlığı
▪ Patolojik evre	▪ Immünsüpresyon
▪ Hormon reseptör durumu	▪ Beslenme
▪ DNA içeriği (ploidi, S-faz fraksiyonu)	▪ Öncesinde kemoterapi görmüş olması
▪ İntraduktal kompartmanın durumu	
▪ HER2/neu ifadenmesi	

Reseptör tirozin-protein kinaz erbB-2 (ERBB2), büyüme faktörü reseptörleri ailesine ait insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ekspresyonu da meme kanserinde prediktif/prognostik olarak kullanılan bir diğer belirteçtir. HER2/neu'nun tümör biyopsisinde immünohistokimyasal olarak aşırı ifadenmesi bu tümörlerin yüksek proliferasyon indeksi, az diferansiyasyon ve yüksek rekürrens ihtimalinin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Bu hastalar ayrıca anti-HER2 tedavisine aday olarak kabul edilmektedirler (32, 38).

Proliferasyon ilişkili Ki-67 antijeni moleküler sınıflamada kullanılmakta, bunun yanında yüksek mitotik indeksin bir göstergesi olarak dördüncü bir immünohistokimyasal belirteç olarak kabul edilmektedir (38).

Bu dört belirteç dışında tümör baskılayıcı p53, çeşitli siklinler, siklin bağımlı kinazlar, sinyal iletim yollarındaki bazı moleküller gibi pek çok belirteç/aday belirteç tanımlanmıştır. Bu moleküller Tablo 2.2'de özetlenmiştir (32).

Tablo 2.2. Meme kanserinde kullanılan/aday prognostik/prediktif belirteçler (32).

İnvaziv meme kanserlerinde kullanılan/aday prediktif/prognostik moleküler belirteçler
– Steroid hormon reseptörleri (Östrojen, Progesteron)
– Büyüme faktörleri, Büyüme faktörleri reseptörleri (İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2/neu), Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), Transforme edici büyüme faktörü (TGF), Plateletlerden derive büyüme faktörü (PDGF), İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ailesi)
– Proliferasyon belirteçleri (Prolifere hücre nükleer antijeni, Ki-67)

Tablo 2.2'nin devamı.
– Anjiyogenez belirteçleri (Vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF))
– Rapamisin'in memeli hedefi (mTOR) sinyal yolağı
– Tümör baskılayıcı gen (p53)
– Hücre döngüsü, siklinler, siklin bağımlı kinazlar
– Proteazom
– COX-2 enzimi
– Peroksizom proliferatör aktive reseptörler (PPAR)
– Apoptoz, Apoptoz modülatörleri
– bcl-2 (B-hücre lenfoma 2), bax (Bcl-2 ilişkili X proteini): bcl-2 oranı

2.2.5. Tedavi

Meme kanserinde tedavi planlanırken tümörün evresi, histopatolojik tipi, alt tipi, bireye ait faktörler, moleküler belirteç düzeyleri gibi pek çok parametre değerlendirilir. Meme kanseri tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormonal, reseptör hedefli tedavi yöntemleri kullanılmaktadır (32).

Cerrahi tedavi, eksizyonel biyopsi, meme korunarak primer tümörün çıkarılması, sentinel lenf nodu diseksiyonu, lumpektomi, unilateral/bilateral mastektomi gibi seçenekleri kapsar (40).

Radyoterapi, meme kanserinin her evresinde kullanılacak bir tedavidir (41).

Endokrin (Hormonal) tedaviler:

Meme kanserlerinin çoğunda steroid hormon reseptörü (ER/PR) pozitifdir. Endokrin tedavi vücuttaki östrojen düzeyini azaltıcı ya da östrojenin etkinliğini engelleyici etki gösterir. Bu nedenle hormon tedavisi, anti-östrojen tedavi olarak da isimlendirilir.

Bu tedavide 3 farklı ilaç grubu kullanılır: 1-Seçici östrojen reseptör modülatörleri (SERM); 2-Aromataz inhibitörleri; 3-Seçici östrojen reseptör *down*-regülatörleri (SERD). (3).

Birinci grupta yer alan tamoksifen, raloksifen ve toremifen gibi ilaçlar, en sık kullanılan SERM'lerdir. Tamoksifen sitozoldeki östrojen reseptörlerine bağlanır ve östrojenin meme dokusuna alınmasını engeller (4). İkinci grupta, östrojen sentezinin son

basamağındaki aromataz enzimini inhibe eden anastrozol, letrozol gibi non-steroid, eksemestan gibi steroid yapıdaki ilaçlar yer alır (32). Üçüncü grupta yer alan Fulvestrant (ICI 182,780) ise şu anda meme kanseri tedavisi için onaylanmış tek SERD'dir. SERM'lere göre avantajı yüksek afiniteye sahip olması, östrojen reseptörlerinin aktivitesini engellemesinin yanında bu reseptörlerin degradasyonunu hızlandırıcı etkisinin olmasıdır (3, 42).

Bunlar dışında progestin (megestrol asetat), androjenler (fluoksimesteron), yüksek doz östrojen (etinil östradiol) de kullanılabilir.

Anti-HER2 hedefli tedaviler:

HER2 ifadelenmesi pozitif olan hastalar anti-HER2 tedaviye adaydırlar. Bu grupta HER2'yi hedefleyen anti-HER2 monoklonal antikor tedavileri (Trastuzumab, Margetuksimab, Pertuzumab vb.), HER2 reseptör yolağını bozan ikili tirozin kinaz inhibitörü Lapatinib ve anti-HER2 antikorlarla konjuge edilmiş küçük moleküllerin kullanıldığı farklı ilaç alternatifleri bulunmaktadır (32, 43).

Kemoterapi:

Kemoterapi, özellikle kanser gibi hızlı büyüyen hücreleri öldürmek için kullanılan ilaç tedavisinin genel adıdır. Cerrahi tedavi planlanan hastalarda pre-operatif uygulanan kemoterapi neoadjuvan, ana kanser tedavisi sonrası hastalığın rekürrens ve metastaz riskini azaltması amacıyla uygulanan tedavi ise adjuvan kemoterapi olarak isimlendirilir. Uzak metastaz görülen hastalarda öncelikli tedavi olarak kemoterapi tercih edilir (44, 45).

Farklı etki mekanizmalarına sahip birçok kemoterapi ilacı mevcuttur (5). Bunlar; alkilleyiciler, nitrozürelere, antimetabolitler, bitki alkaloidleri, anti-tümör antibiyotikleri ve topoizomeraz inhibitörleri olarak sıralanabilirler (5).

Alkilleyici ajanlar (siklofosfamid, sisplatin-karboplatin gibi platin içeren ilaçlar, melfalan, temozolomid vb.), DNA zincirleri arasında çapraz bağlar oluşturarak DNA'da hasar oluştururlar. DNA'da meydana gelen bu değişiklikler replikasyonu engeller ve hücrenin apoptozuna yol açar. Nitrozürelere (karmustin, lomustin, semustini

streptozosin) diğer alkilleyicilerden ayıran en büyük özellik kan-beyin bariyerini geçebilir nitelikte olmalarıdır. Antimetabolitler, folat antagonistleri, pürin antagonistleri ve pirimidin antagonistleri olarak sınıflandırılabilirler. Bu kategorideki moleküller nükleotidlerle yapısal benzerlik gösterir ve DNA/RNA sentezi üzerinden etki ederler. Nükleik asit sentezi bozulduğu için genellikle hücre döngüsünün S fazı sırasında yüksek etkiye sahipken, G₀ evresindeki hücreler üzerinde çok az etki gösterirler. Bu nedenle de çok hızlı büyüyen tümörlerde etkileri oldukça fazladır (46).

Antrasiklinler veya anti-tümör antibiyotikler, DNA ile interkalasyon yaparak DNA metabolizmasına ve RNA sentezine etki eder. Böylece transkripsiyonu ve replikasyonu engelleyerek özellikle hızlı büyüyen hücrelerde canlılığı etkiler. Ayrıca hücreye girdikten sonra oksidoredüktaz enzimleri (sitokrom P450 redüktaz, NADH dehidrogenaz, ksantin oksidaz vb.) tarafından indirgenerek serbest radikaller oluştururlar. Bu radikaller oksijen ile etkileşime girerek süperoksitleri, peroksitleri ve hidroksil radikallerinin oluşmasını sağlar. Reaktif oksijen türleri de oksidatif strese neden olur ve DNA hasarı ve lipid peroksidasyonuna neden olur ve hücre apoptozunu tetikler (6).

Meme kanserinde kemoterapi seçeneğinin kullanılmasında tümörün evresi ve moleküler belirteçlerin durumu önemlidir. Güncel protokoller antrasiklin içeren ya da içermeyen ilaç kombinasyonları olarak gruplandırılabilir. Antrasiklinler (doksorubisin ya da epirubisin) genellikle taksanlarla (paklitaksel, dosetaksel) birlikte kullanılır. Antrasiklin içermeyen protokollere en klasik örneklerden biri alkilleyici bir ajan olan siklofosfamid (*Cyclophosphamide*), antimetabolit ajanlardan olan Metotreksat (folat antagonisti) ve 5-Fluorourasilin (sentetik fluoropirimidin antagonisti) birlikte kullanıldığı CMF rejimidir (32, 47, 48).

Platin içeren ilaçlardan (sisplatin, karboplatin, oksaliplatin vb.) ilk tanımlanıp kullanılan sisplatinin meme kanserinde etkili olabileceği 1970'li yıllarda gösterilmiş (49), o tarihten sonra sisplatinin meme kanserinde kullanılabilirliği ve etkinliği üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalar farklı makalelerde derlenmiştir (50, 51). O

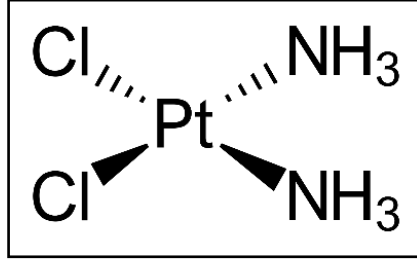
yıllarda sisplatinin bulantı, kusma, nefrotoksik, nörotoksik yan etkileri tedaviyi sınırlandırıcı bir faktör olarak ele alınmıştır (50, 52). Jurga ve ark. (1994), sisplatin içeren kemoterapi protokollerinin ilk basamak (n=26), ikinci ve üçüncü basamak (n=36) tedavide kullanıldığı durumda meme kanseri için tedavi yanıt oranını sırasıyla %53,9 ve %30,6 olarak saptamışlar, sisplatin içeren protokollerin ilerlemiş meme kanserli hastalarda etkin olduğunu rapor etmişlerdir (53). Decatris ve ark. (2004) da sisplatin ve karboplatinin ilerlemiş meme kanserli hastalarda etkili yanıt oluşturduğunu saptamışlardır (54). İki binli yıllarda yeni ilaçların da bulunmasıyla sisplatinin meme kanserinde kullanımı konusu önemini kaybetmiş görünse de (32, 55) son yıllarda çeşitli ilaçlarla kombine kullanımı başta üçlü negatif meme kanserlerinde olmak üzere araştırmacılar tarafından yeniden ele alınmaktadır (56-58). Güncel protokol şemalarında platin içeren ilaçlardan karboplatin yer alabilmektedir (32).

2.3. Sisplatin

Sisplatin (cis-diamin dikloro platin II, cis-DDP) ilk olarak 1845’de rapor edilmiş, proliferasyonu engelleyici etkisi 1960’larda gösterilmiş, 1978’de anti tümör etkili olarak onaylanmış platin bazlı bir moleküldür (7). Günümüzde pek çok yeni kanser ilacı tasarlanmış ve kullanımda olmasına rağmen sisplatin ve sonrasında geliştirilen platin bazlı ilaçlar pek çok kanser türünün tedavi protokolünde sıklıkla yer almaktadır. Baş-boyun, testis, over, mesane, akciğer kanserleri gibi kanserlerde kullanımı bulunmaktadır (6).

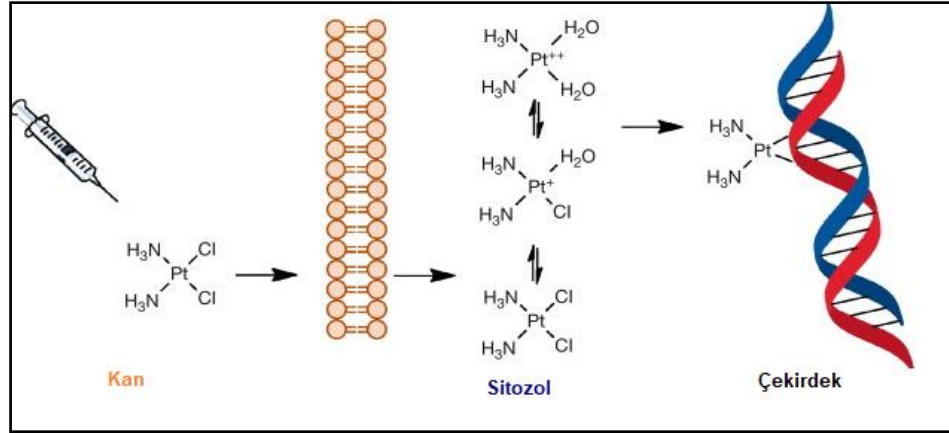
Sisplatin, inorganik yapıda merkezi platin atomuna bağlı cis pozisyonunda ve yatay düzlemde iki klor atomu ile iki amin grubu içeren, suda çözülebilir, göreceli polar yapıda alkilleiyici özellikte kemoterapötik bir ajandır (59-61).

Sisplatinin kimyasal yapısı Şekil 2.2’de gösterilmiştir (60).



Şekil 2.2. Sisplatinin kimyasal yapısı.

Sisplatin, çözünürlüğünün kısıtlı olması nedeniyle intravenöz olarak uygulanır. Kandaki yüksek klor düzeyi nedeniyle (~100 mM) göreceli yüksüz, reaktif olmayan şekilde hücreye ulaşır (8). Hücre içine dikloro formunda bakır taşıyıcı protein 1 (CTR1) kontrolünde girer (62). Sitozoldeki düşük klor düzeyi (~4 mM) sisplatinin su bağlamasını (*aquation*) sağlar (9). Böylece yapısındaki 2 kloru hidroliz yoluyla kaybederek aktif platin (II) formuna dönüşür (Şekil 2.3).

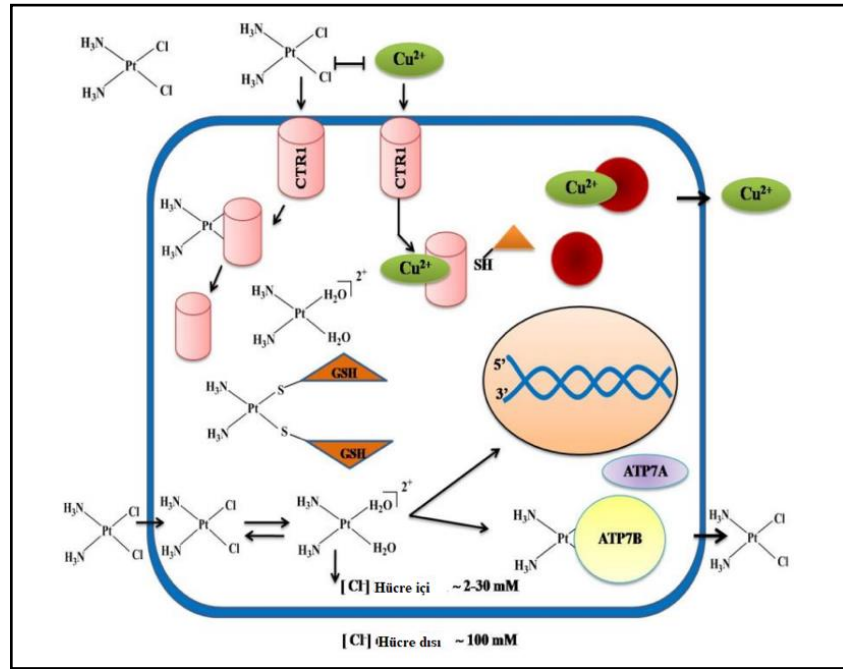


Şekil 2.3. Sisplatinin kandan hücre içine geçişi sonrası aktif forma dönüşmesi ve nükleusta DNA hasarı oluşturması (63)'ten Türkçeleştirilerek alınmıştır.

Aktif form güçlü elektrofilik özelliktedir ve nükleofilik bölgesi olan herhangi bir makromolekül (DNA, RNA, proteinler, membran fosfolipitleri, hücre iskeleti elemanları ve tiyol grubu içeren moleküller) ile etkileşebilir. Sisplatin, hücrede glutasyon, tiyol içeren moleküllere bağlanarak inaktifleşebilir. Hücreden atılımı bakır içeren ATPaz bakır taşıyıcı

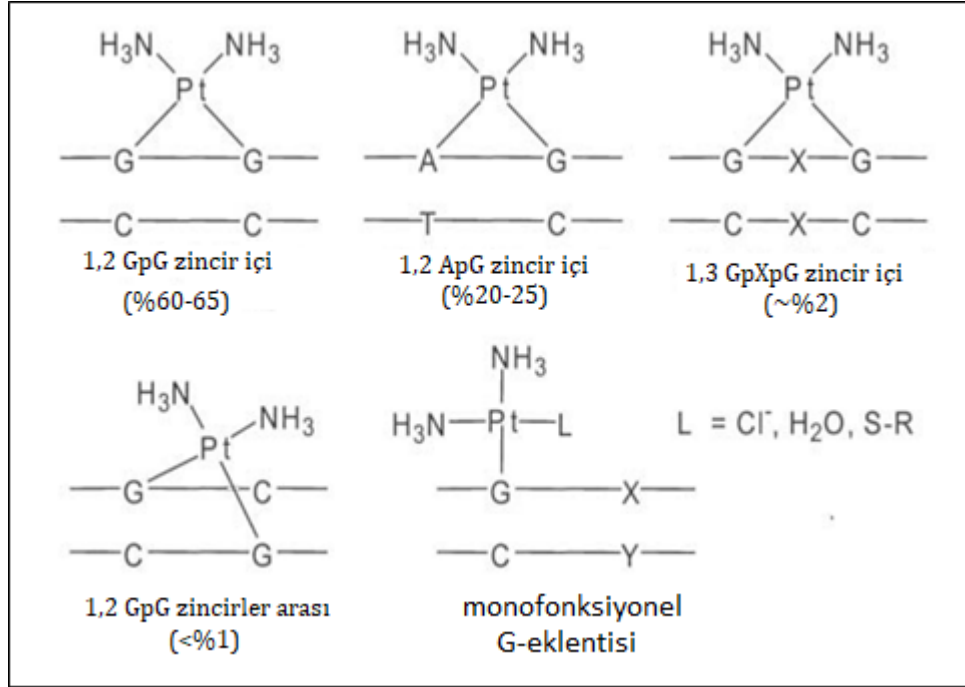
alfa (ATP7A) ya da beta (ATP7B) ile gerçekleşir (10, 11). Memeli hücrelerinde cisplatinin hücre içine alımı, birikimi ve atılımı Şekil 2.4.'te şematize edilmiştir (64).

Sisplatinin aktif formu hücre içinde pek çok makromolekülle etkileşmekle birlikte asıl sitotoksik etkisinin hücre DNA'sında hasarlar oluşturmasından kaynaklandığı kabul edilmektedir (64).



Şekil 2.4. Memeli hücrelerinde cisplatinin hücre içine alımı, birikimi ve atılımı (64).

Sisplatinin DNA hasarlarını oluşturması ilk olarak pozitif yüklü aktif cisplatinin negatif yüklü yapıya sahip DNA'da büyük oluktaki N7 pozisyonundaki guanine atağı ile başlar. Oluşan DNA eklentisi ikinci bir pürine intramoleküler bir atak yaparak pürinler arasında zincir içi/zincirler arası çapraz bağlar/DNA eklentilerinin oluşmasına neden olur. Bu hasarların büyük kısmı cis-Pt-1,2-d(GpG) (1,2 GpG, Pt-GG, %60-65), 1,2-d(ApG) (1,2 ApG, Pt-AG, %20-25) zincir içi çapraz bağ/eklenmesi şeklindedir. Yaklaşık %2 oranında 1,3-d(GpNpG) (1,3 GpXpG, Pt-GNG) zincir içi, %1'den daha az oranda 1,2 GpG zincirlerarası çapraz bağlanma, çok az miktarda da monofonksiyonel G-eklenmesi olabileceği belirtilmiştir (Şekil 2.5.) (7, 9).



Şekil 2.5. Sisplatin-DNA eklentileri ve görülme sıklıkları (65).

Sisplatinin indüklediği DNA hasarları DNA replikasyonunun ilerlemesini engeller. Durmuş replikasyon hücrede apoptozu tetikleyerek hücreyi ölüme götürür. Kanser hücreleri gibi hızlı çoğalan hücreler ilacın en çok etkisini gösterdiği hücrelerdir.

2.3.1. Sisplatine Karşı Direnç Gelişimi

Sisplatin tedavisindeki en büyük sorunlardan biri ilaç tedavisine karşı direnç gelişimidir. Direnç gelişiminde farklı mekanizmalar üzerinde durulmuştur. Olası mekanizmalar aşağıda özetlenebilir:

- Sisplatinin hücre içine alım taşıyıcılarının aktivitesinin bozulması (deaktivasyonu) ya da alım/atım dengesinin bozulması nedeniyle sisplatinin hücre içinde birikiminin azalması (10-12)
- Sisplatinin glutatyon, metalloproteinin ya da diğer sülfür içeren moleküllerle inaktivasyonu (13)

- Sisplatin-DNA çapraz bağları eklentilerini onaran onarım mekanizmalarının (özellikle NER) artışı (14, 15)
- Sisplatinle indüklenen eklentilerin replikasyon sırasında DNA *by-pass* polimerazlarıyla atlanarak (translezyon DNA sentezi) replikasyonun devamlılığının sağlanması (16, 17)

2.4.2. Sisplatinin İndüklediği DNA Hasarlarına Hücresel Yanıtlar

Hücre DNA'sı sisplatin gibi genotoksik bir ajanla karşılaştığında hasar görür. DNA hasarı oluştuğunda hasara karşı ilk yanıt hasarın sensörler tarafından algılanmasıdır. Hasar sensörlerinden en önemlileri ataksi-telenjiyektazi-*mutated* (ATM) kinaz, ATM- ve Rad3-ilişkili (ATR) kinaz, DNA-bağımlı protein kinaz (DNA-PK)'dir. Hasar sensörleri mediyatör molekülleri fosforiller. Mediyatör moleküller de *transducer* moleküller olan *checkpoint* kinaz 1 (Chk1) ve *checkpoint* kinaz 2 (Chk2)'yi bölgeye çağırır, fosforile eder ve aktifleştirir. Fosforile olmuş bu moleküller, substratları olan efektör molekülleri fosforiller ve DNA hasarına karşı hücrede dört önemli yanıt oluşmasına aracılık ederler:

1. Hasarı onarmaya yönelik DNA onarım mekanizmasının aktifleşmesi;
2. Hücre döngüsünün kontrol noktalarında durdurulması,
3. Transkripsiyonel profilin değişmesi ve
4. Apoptotik mekanizmaların aktivasyonu (19, 66-69).

DNA hasarının onarılması, oluşan hasarın türüne bağlı olarak farklı mekanizmalarla gerçekleşir. Direkt onarım mekanizması, nükleotid eksizyon onarımı (NER), baz eksizyon onarımı (BER), yanlış eşlenmiş bazların onarımı (MMR), homolog rekombinasyonel onarım (HRR), non-homolog uçların birleşimi (NHEJ), zincirler-arası çapraz bağların onarımı bilinen onarım mekanizmalarındandır. Direkt onarım mekanizmalarında hasar tek bir enzim tarafından tanınır ve genellikle aynı enzim tarafından onarılır. İnsanda bulunan onarım mekanizmalardan NER, BER ve MMR'de hasar, hasarın yer aldığı zincirden kesilerek uzaklaştırılır. Hasarın çıkarılması ile oluşan

boşluk, komplementer zincir kalıp olarak kullanılarak DNA polimeraz enzimleri ile doldurulur. Zincir bütünlüğü ise DNA ligazlar ile sağlanır. Genel olarak bakıldığında NER, çift zincir DNA'da bükülmeye neden olan büyük DNA eklentilerini; BER tek bir bazı ilgilendiren DNA hasarlarını (okside, deamine bazlar vb.); MMR yanlış eşlenmiş bazların tamirini gerçekleştirir. Çift zincir kırıklarının onarımı ise HRR ya da NHEJ ile gerçekleştirilir. Bu mekanizmalardan HRR'de tamir sentezi için kardeş kromatiddeki homolog dizi kalıp olarak kullanılır. Homolog olmayan uçların birleşimi ise hataya açık bir tamir yoludur (19, 20, 68, 70-74)

Sisplatin tarafından indüklenen hasarların çoğu (>%90) zincir içi platin eklentileridir (9) ve oluştukları DNA bölgesinde çözülme ve büyük oluğa doğru bükülme meydana getirirler (75). Bu hasarlar da NER ile onarılırlar. İlgili mekanizma Bölüm 2.4.6'da ayrıntılı olarak ele alınacaktır. Sisplatinin neden olduğu diğer hasarların tamirinde diğer onarım mekanizmalarının da rol oynadığı belirtilmiştir (76)

Sisplatin, DNA'da Bölüm 2.3.'te bahsedildiği şekilde doğrudan hasarlar oluşturabildiği gibi dolaylı olarak, oksidatif strese ikincil olarak da hasarı indükleyebilir. Sisplatin, hücrede glutasyon ve metalotiyeninler ile etkileşerek inaktive edilir (64). İndirgenmiş glutasyon ile konjügasyonu enzimatik olarak (glutasyon S-transferaz ile) ve/veya non-enzimatik olarak gerçekleşir (66, 77). Bu durum, indirgenmiş/okside glutasyon oranını azaltarak reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu uyarır ve oksidatif stres oluşturur (78).

Sisplatinin bir diğer hedefi de mitokondridir. Sisplatin, mitokondriyel membran potansiyelini değiştirerek, mitokondriyel DNA hasarı oluşturarak, antioksidan mekanizmaları azaltarak ROS'u arttırır. Artan ROS, hücre membranı ve organellerine zarar vermenin yanı sıra nükleer DNA'da da hasarlar oluşturur (78). Oksidatif stres sonucu oluşan DNA hasarlarından apürinik/apirimidinik (AP) bölgeler ve 8-oksoguanin BER'in substratlarıdır (73, 79). Çift zincir kırıklarının onarılmasında ise HR ya da NHEJ görev alır (80, 81).

Tablo 2.3. İnsanda DNA hasarları ve onarımında rol alan ana mekanizmalar (68, 82).

DNA Hasarı	Onarım Mekanizması
O ⁶ -Metilguanin	Direkt Onarım (O ⁶ -Metilguanin-DNA metil transferaz)
Urasil	Baz Eksizyon Onarımı (BER)
Abazik Bölgeler	
8-oksoguanin	
Tek zincir kırıkları	
O ⁶ -Metilguanin	
N ⁶ - Metiladenin	
(6-4) Işın Ürünleri (6-4 PP)	Nükleotid Eksizyon Onarımı (NER)
Büyük Eklentiler	
Siklobütan Primidin Dimerleri (CPD)	
2-Asetilaminofluoren	
Benzo[a]piren diol epoksit	
Sisplatin 1,2-d(GpG)	
Sisplatin 1,2-d(ApG)	
Sisplatin 1,3-d(GpNpG)	
Psoralen tek eklentisi	
Psoralen zicirler arası çapraz bağları	
Zincirler Arası Çapraz Bağlar	Rekombinasyonel Onarım (HR, NHEJ)
Çift Zincir Kırıkları	Yanlış Eşleşmiş Bazların Onarım (MMR)
A-G Yanlış Eşleşme	
T-C Yanlış Eşleşme	
G-G Yanlış Eşleşme	
İnsersiyonlar	
Delesyonlar	

2.4.3. Baz Eksizyon Onarımı ve Sisplatin

Bu mekanizmada DNA hasarı, DNA glikozilazlar ile tanınır ve glikozilazın katalizi ile hasar bölgesinde apürinik/apirimidinik (AP) bir bölge oluşur. AP bölgesi, AP endonükleaz (APE) tarafından tanınır ve hasar bölgesinde kesim gerçekleşir. Kesim sonrası oluşan boşluk, poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) bağımlı bir mekanizma ile DNA polimeraz β aracılığıyla yeni DNA sentezlenerek doldurulur. DNA ligaz III-XRCC1 kompleksi ile de zincir bütünlüğü sağlanır (73, 76). Literatürde multifonksiyonel bir protein olan, BER'de de rol alan PARP1'in sisplatin tarafından indüklenmiş DNA hasarına bağlandığı gösterilmiştir

(83). XRCC1, PARP1, POLB *knock-out* edilerek BER'in işlevsiz hale getirildiği DLD-1 hücrelerinde sisplatin ve oksaliplatine duyarlılığın arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada POLB *knock-out* ya da inhibe edildiğinde bu hücrelerde transkripsiyonun da ilerleyemediği rapor edilmiştir (76). Osteosarkom hastalarında yapılan bir çalışma da APE1'in sisplatin direncinde rol oynadığı gösterilmiştir (84).

2.4.4. Homolog Rekombinasyonel Onarım ve Sisplatin

Bu yol iyonizan radyasyon, ROS gibi faktörler tarafından indüklenmiş çift zincir kırıklarının hatadan yoksun onarımını sağlar. Hücre döngüsünün S fazında aktiftir (85, 86). Mekanizmada 3' uçlar daha uzun kalacak şekilde kırık uçlar kısaltılır, zincir invazyonuyla 3' uç kardeş kromatiddeki homolog diziyi bulur ve eşleşir. Homolog bölge kalıp olarak kullanılarak yeni DNA sentezi gerçekleştirilir. Rekombinasyona da olanak verdiği için HRR olarak adlandırılan bu mekanizma hatadan yoksun bir onarım sağlar (19, 69, 87) Mekanizmada siklin bağımlı kinaz (CDK), Mre11-Rad50-NBS1 (MRN) kompleksini hasar bölgesine çağırır. Bu kompleks de mekanizmada gerekli nükleazların bölgeye gelmesini sağlar. RAD51, BRCA1, BRCA2 proteinleri homolog diziyi bulmakta önemlidir. ATM; MRN kompleksi aracılığıyla hasar bölgesine çağırılır, aktive olur, Chk2'yi fosforiller ve hücre döngüsünü durdurur (88). ATM, BRCA1'in aktifleşmesinde kritik bir proteindir (89). Mekanizmada rolü olan BRCA1, meme kanserinde önemli bir belirteçtir. BRCA1 mutasyonu taşıyan hastaların sisplatine daha iyi yanıt verdiği rapor edilmiştir. CHO hücrelerinde HR'nin çalışmamasının sisplatinin etkisini arttırdığının rapor edilmesi bu mekanizmanın sisplatin duyarlılığında rol oynayabileceğini düşündürmüştür (90).

2.4.5. Non-Homolog Uçların Birleşmesi ve Sisplatin

DNA çift zincir kırıklarının bir diğer tamir yolu hataya açık NHEJ'dir. Bu yol HR'den farklı olarak hücre döngüsünün en fazla G1 fazında olmak üzere döngü boyunca gerçekleşebilir (86). Kırık uçlar için DNA-PK sensör görevi görür ve DNA-PK'ın

otofosforilasyonu gerçekleşir. Ku70/Ku80 proteinleri kırık uçlara bağlanır. Uçla DNA ligaz4-XRCC4 aracılığıyla birleştirilir (69, 91). Ku80'in sisplatin-DNA hasarına bağlandığı çalışmalarda gösterilmiş (69), sisplatine dirençli akciğer adenokarsinomlarının %80'inden fazlasında Ku80 aşırı ekspresyonunun olduğu, siRNA ile Ku80'in azaltıldığı sisplatine dirençli hale getirilmiş küçük hücre dışı (NSC) akciğer kanseri hücrelerinde (A549) sisplatin duyarlılığının arttığı gösterilmiştir (92).

2.4.6. Yanlış Eşlenmiş Bazların Onarımı ve Sisplatin

Yanlış eşlenmiş bazların onarımının ana substratları replikasyon sırasında yanlış eşlenmiş bazlar, insersiyon/delesyon luplarıdır. İnsanda onarım, *E.coli*'de MMR'i gerçekleştiren MutS, MutL ve MutH proteinlerinin insandaki homologlarının görev aldığı bir mekanizmayla gerçekleştirilir. İnsandaki MutS α ve MutS β homologları olan MSH2/MSH6 ve MSH2/MSH3 heterodimerlerinden biri hasarın türüne göre MMR substratlarını tanır. MutL homologları olan MLH1/PMS2 bu bölgeye çağrılır, hasar bölgesine bağlanır ve 3' endonükleaz aktivitesiyle hasarlı zincirde kesim yapar. Bu olay, bir ekzonükleaz olan EXO1'in zinciri içeren bölgede kesim yaparak hasar bölgesinin uzaklaştırılmasına olanak sağlar. Oluşan boşlukta DNA polimeraz δ ile yeni DNA sentezi gerçekleştirilir ve DNA ligaz 1 yardımıyla çentik kapatılarak zincir bütünlüğü sağlanır. Sisplatin tarafından indüklenmiş DNA hasarlarının MSH2/MSH6 tarafından tanındığı düşünülmektedir (93). Over berrak hücreli kanserli 120 hasta üzerinde yapılan çalışmada, MMR'in defektif olduğu hastalarda MMR'in etkin olduğu gruba göre sisplatin duyarlılığının anlamlı olarak yüksek olduğu belirtilmektedir (94). Over kanserinde MLH1'in aşırı üretimi ile sisplatin duyarlılığı arasında pozitif bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir (95). Ayrıca MSH2, MSH3, PMS2 işlevsizliği/yokluğu ile sisplatin direnci arasında ilişki olduğunu belirten çalışmalar bulunmaktadır (69).

2.4.7. Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Sisplatin

Nükleotid eksizyon onarımı, DNA'da distorsiyona neden olan büyük DNA eklentilerinin onarımından sorumlu olan, bilinen en genel onarım mekanizmasıdır. Sisplatin DNA eklentilerinin çok büyük kısmı DNA onarım mekanizmalarından NER tarafından onarılmaktadır (9).

Bu mekanizmada insanda 6 ana onarım proteini bulunmaktadır. Kseroderma pigmentozum grup A (XPA), XPC, XPG, XPF-ERCC1, Replikasyon proteini A (RPA), Transkripsiyon faktörü IIH (TFIIH) (Tablo 2.4). Ultraviyole ışığı tarafından indüklenerek hasara bağlanan proteini 2'nin (DDB2, XPE, UV-DDB2) *in vitro* olarak NER aktivitesini arttırmadığı (68), *in vivo* NER'de ise etkili olduğu gösterilmiştir (22). DDB2'nin pek çok işlevi ayrıntılı olarak araştırılmaktadır (26).

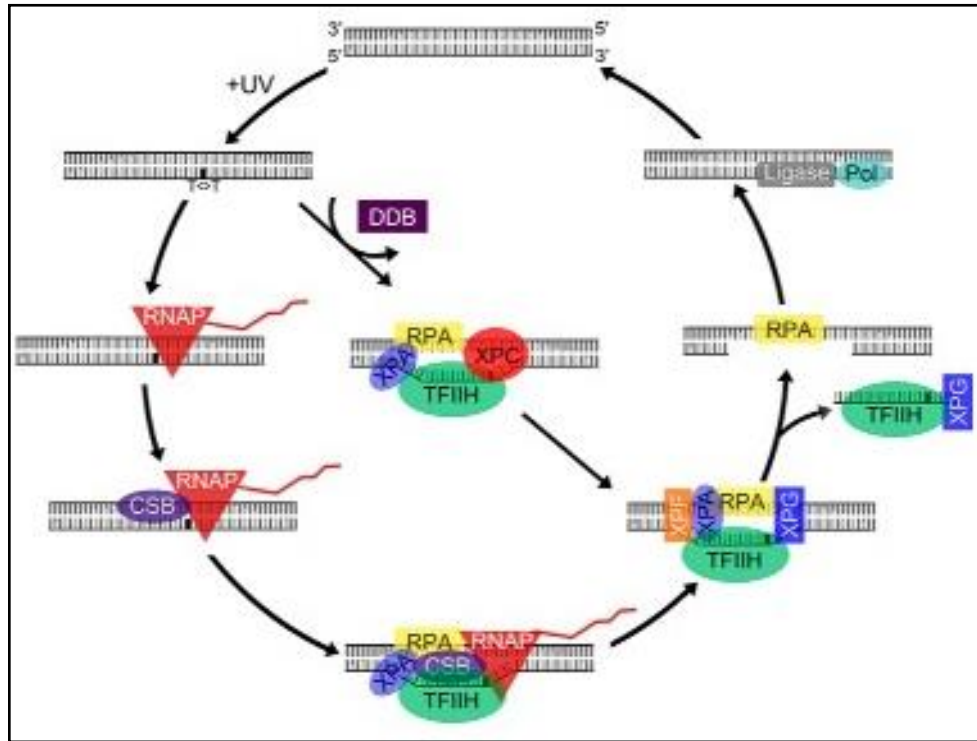
Tablo 2.4. Nükleotid eksizyon onarım faktörleri ve işlevleri (96).

Nükleotid Eksizyon Onarım Faktörleri	
Faktör (Alt Birimleri)	İşlev
RPA (p14, p32, p70)	Hasar tanıma, yeniden sentez aşaması
TFIIH (XPB, XPD, p34, p44, p52, TTD-A*, Cdk7*, siklin H*, MAT1*)	DNA gevşemesi (<i>unwinding</i>), kinetik proofreading, 3'-->5' helikaz (XPB), 5'-->3' helikaz (XPD)
DDB (UV-DDB2, XPE/DDB2)	Kromatin tamiri, DNA'ya bağlanma
XPA	Hasar tanıma
XPC (XPC, HR23B)	Hasar tanıma, moleküler <i>matchmaker</i>
XPG	3' insizyon
XPF (XPF, ERCC1)	5' insizyon
CSA	Transkripsiyona kenetlenmiş onarım
CSB	Transkripsiyona kenetlenmiş onarım, kromatin yeniden modelleme

Bu onarım yolunda hasar RPA, XPC, XPA proteinleri tarafından tanınır. Bu aşamada çoklu alt birime sahip TFIIH de bulunur. TFIIH'nin helikaz aktivitesine sahip XPB ve XPD alt birimleri hasarın bulunduğu bölgede yaklaşık 25 baz çiftlik çift zincirli DNA'nın çözülmesine yardımcı olur. XPG'nin hasar bölgesine gelişiyse XPC hasar bölgesindeki protein kompleksinden ayrılır. XPF-ERCC1'in de gelişiyse hasarı içeren bir 24-32 nükleotidlik oligonükleotid bir parça ikili insizyonla işaretlenir. XPG, hasarın 3' yönünden

5-6 nükleotid uzakta, XPF 5' yönünden 19-22 nükleotid uzaklıkta insizyon yapar. Oligonükleotid parça daha sonra eksizyonla çıkarılır ve komplementer zincir kalıp olarak kullanılarak yüksek güvenilirliğe sahip DNA polimerazlar ile DNA tamir sentezi gerçekleştirilir ve DNA ligazlar ile zincir bütünlüğü sağlanır. İnsanda proliferan hücrelerde bu enzimler DNA polimeraz (pol) δ/ϵ ve proliferan olmayan hücrelerde de DNA pol κ/λ 'dır. Bu yol genel genom onarımı (GG-NER) olarak isimlendirilir (96).

Transkripsiyonun aktif olduğu hücrelerde NER'in daha hızlı gerçekleştiği belirlenmiştir. Aktif transkripsiyon olan genlerde hasar nedeniyle durmuş RNA polimeraz, hasarın tanınmasında önemli rol oynar. *Cockayne syndrome grup A* ve *B* (CSA ve CSB) proteinleri bu bölgeye gelerek sonrasında NER genel genom onarımı ile benzer yolu izler. Bu yol transkripsiyona kenetlenmiş onarım (TCR, TC-NER) olarak adlandırılır(96). XPC dışında diğer NER faktörleri bu yolda da görev almaktadır (Şekil 2.6) (96).



Şekil 2.6. İnsanda nükleotid eksizyon tamiri. Şeklin sol tarafında transkripsiyona kenetlenmiş onarım, sağ tarafında ise genel genom tamiri görülmektedir.

Onarım faktörlerinden pek çoğu ile sisplatin direnci/duyarlılığı arasında ilişki bildirilmiştir. Literatürde, yalnızca GG-NER’de işlev gören XPC’nin aşırı üretiminin/ekspresyonunun artışının sisplatin direncine neden olduğu (69, 97), XPC inhibisyonunun ise bu direnci azalttığı belirtilmektedir (98). ERCC1, sisplatin ilaç yanıtı yönünden araştırmacıların dikkatini çeken faktörlerdendir. ERCC1’in ekspresyon düzeyi ile sisplatin yanıtı, daha uzun yaşam süresi arasında ilişki olduğuna yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Araştırmacılar, over ve küçük hücreli akciğer kanseri hastalarının tümör örneklerinde ERCC1 ekspresyon düzeyinin düşüklüğü durumunda sisplatin yanıtının daha iyi olduğunu rapor etmişlerdir (99, 100). Düşük ERCC1 düzeylerine sahip küçük hücreli olmayan akciğer ve kolorektal kanserli hastalarda daha uzun süreli hayatta kalım olduğu rapor edilmiştir (101, 102). ERCC1 ve XPF genlerinin *knock-down* edilmesinin sisplatin duyarlılığını arttırdığı da belirtilmektedir (103).

XPA (104, 105), XPF (103, 106), XPG (107), DDB2 (108) gibi pek çok onarım faktörü ile sisplatin duyarlılığı/direnci arasındaki ilişki araştırılmış, çoğu çalışma sonuçlarında bu faktörlerle sisplatin yanıtı arasında bir ilişki olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte henüz aydınlatılması gereken pek çok nokta bulunmaktadır.

Sisplatinin indüklediği DNA Hasarları ve Hasara Bağlanan Protein-2

Hasara bağlanan protein 2 (DDB2, XPE, UV-DDV2) heterodimer yapıdaki UV ışığı tarafından indüklenen hasara bağlanan proteinin (DDB) 48 kDa’luk küçük alt birimidir. DDB2, 127 kDa’luk DDB1 ile bu dimer yapıyı oluşturur. *In vitro* çalışmalar GG-NER’de DDB’nin DNA hasarına bağlanan esas alt birim olduğu, ancak GG-NER’in gerçekleşmesi için esansiyel olmadığını, *in vivo* çalışmalar ise GG-NER aktivitesini artırdığını göstermiştir (22). *In vitro* çalışmaların çıplak DNA ile yapılması DDB2’nin NER’de kromatin yeniden modellemesinde rol oynayarak etkili olabileceğini düşündürmüştür. DDB2, DDB1 yanında Cullin 4A, E3 ubiquitin ligaz ile de kompleks oluşturmakta, COP9 signalozom kompleksi içinde de yer almaktadır (21). Çalışmalar DDB2’nin transkripsiyonda,

kromozom segregasyonunda, hücre döngüsünde, apoptozda, protein degradasyonunda da işlev gören bir multifonksiyonel protein olduğunu ortaya koymaktadır (21, 23-26).

DDB2 mRNA düzeylerinin hücre döngüsü fazlarında belirgin düzeyde değişmediği, DDB2 proteini düzeylerinin ise hücre döngüsü ile düzenlendiği gösterilmiştir. Bölünmeyen hücrelerde DDB2 saptanamazken, bölünen hücrelerde G1'in orta fazında artarak G1/S geçiş fazında maksimuma ulaşır ve S fazında saptanamayacak düzeye gelecek şekilde düşer. DDB2'nin protein düzeyindeki bu düzenleniminde ubiquitin proteazom sisteminin ve proteinin poliADP-ribozilasyonunun rolü olduğu düşünülmektedir (109).

DDB2 geninin transkripsiyon düzenleyici bölgesi ile p53'ün etkileşmesi DDB2 geninin aktifleşmesine neden olmaktadır. DDB2'nin de p53'ün kararlılığında rol oynaması DDB2 ve p53 arasında bir *feedback* loop olduğunu düşündürmektedir. Tümör Protein P53 (p53), hücrel tümör antijen p53, fosfoprotein p53, tümör baskılayıcı p53 olarak da adlandırılır. p53, tümör baskılayıcı bir protein olarak işlev görür. DNA hasarı olduğunda onarım mı olacağı, yoksa apoptoz mu olacağını önemli bir düzenleyicisidir. p53, hedef genlerinin transkripsiyon düzenleyici bölgelerine bağlanarak ekspresyonlarını düzenler. DDB2 gibi DNA polimeraz η ekspresyonunun düzenlenmesinde de p53 rol oynamaktadır (110-115).

DDB2'nin transkripsiyonel aktivasyonuna neden olan bir diğer tümör baskılayıcı BRCA1'dir (116).

DDB2 (XPE) gen mutasyonları fotosensitivite ve ultraviyole ışığın indüklediği cilt kanserleri ile seyreden kseroderma pigmentozum grup E (XPE) sendromuna neden olmaktadır. XPE fare modellerinde yalnızca cilt kanserleri değil, farklı spontan malin tümörlerin de geliştiği, farelerin yaşam sürelerinin ise kısaldığı bildirilmiştir. Bu bulgular da DDB2 yokluğunun tümöre yatkınlık oluşturan bir fenotip oluşturduğu, proteinin multifonksiyonel bir protein olduğu bulgusunu desteklemektedir (109).

Son yıllarda DDB2'nin tümör gelişimi, invazyonu gibi onkolojik süreçler rol oynadığına dair pek çok kanıt ortaya konmuştur. Cilt (117), prostat (118), over (119), kolon (120) kanseri gibi pek çok kanser türünde DDB2 ekspresyonunun değiştiği, DDB2 ekspresyonu düşüklüğü ve bazı kanserlerin prognozunun kötü olması arasında doğru bir ilişki olduğuna dair bulgular rapor edilmiştir (26).

Bu kanıtlar DDB2'nin kanserin moleküler mekanizmasında önemli bir yeri olduğunu göstermektedir. Ancak etkisinin kanseri indüklemeye ya da baskılamaya yönünde olduğuna ait veriler net bir sonuca ulaşmamıştır. Meme kanseri hücre hatlarında DDB2'nin tümör büyüme hızı ve klonojenitesini arttırdığı gösterilmiştir (121). DDB2'nin antioksidan etkili süperoksit dismutaz geninin, replikasyon ve hücre döngüsündeki bazı genlerin transkripsiyonunu değiştirdiği, bunun da DDB2'nin tümörjenik etkili olmasında etkili olabileceği bildirilmiştir. Aksine over ve prostat kanserinde ise aynı proteinin antiproliferatif etkisi olduğunun gösterilmesi bu konuda net bir sonuca varmayı engellemektedir (118, 119). Bunun dışında tümör migrasyonu, invazyonu, anjiogenezi, tedaviye direnci artırıp artırmadığı konularında da aynı antiproliferatif etkide olduğu gibi fikir birliğine varılamamıştır (122). Farklı sonuçların tümör lokalizasyonu ile mi, proteinin dölal etkisi ile ya da farklı değişkenlerle mi ilişkili olduğu konusunda çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.4.8. DNA Hasarına Tolerans-Translezyon DNA Sentezi

Yaşayan bütün canlılar sürekli bir şekilde içsel ve dışsal faktörler tarafından DNA bütünlüğünü tehdit eden etkilere maruz kalırlar. Bunun sonucu olarak hücreler, DNA hasarını ortadan kaldıracak DNA tamir mekanizmaları geliştirmiştir. Ancak bazı durumlarda (hasarın çok fazla olması gibi) bu onarım mekanizmaları yeterli olmaz lezyon yeterince hızlı bir şekilde ortadan kaldırılamaz ve replikasyonun ilerlemesi engellenir.

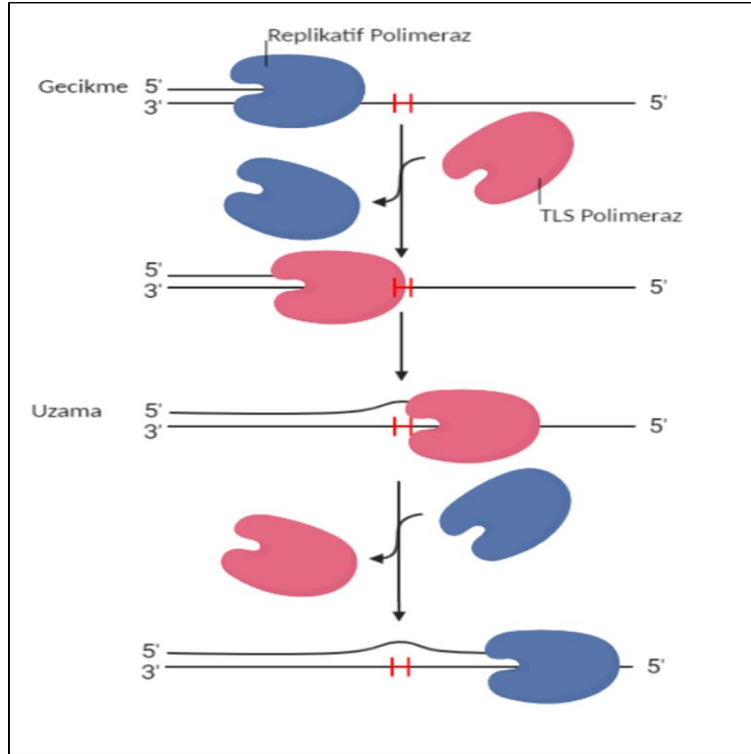
Bu durumlarda hücre;

- rekombinasyonun aracılık ettiği bir yolak olan "*template switching*" ile (123),

- DNA lezyonundan sonra DNA sentezinin tekrar başlaması (*repriming*) ile (124) veya

- lezyona rağmen polimeraz aktivitesi gösterebilen ve bunun için özelleşmiş DNA polimerazlar ile (27) replikasyona devam edebilir.

Son süreç, translezyon DNA sentezi (TLS) olarak adlandırılır. DNA replikasyonu, DNA hasarına bağlı olarak replikasyondan sorumlu, *proofreading* aktivitesi olan polimerazlar ile devam ettirilemez ise bu durumda geciken DNA sentezine karşı hücre, replikasyonun engelini ortadan kaldırmak için çeşitli tamir mekanizmaları ile yanıt verir. DNA tamir yanıtının yetersiz olması durumunda replikasyondan sorumlu DNA polimeraz ile translezyon sentezi için özelleşmiş DNA polimerazlar replikasyon çatalında yer değiştirir, lezyon TLS polimerazlar tarafından atlanır ve tekrar replikatif DNA polimerazlar DNA sentezine devam ederek replikasyon gerçekleşir (Şekil 2.7). Hücre, TLS sayesinde, DNA replikasyonunun devamını ve canlılığını sürdürmüş olur.



Şekil 2.7. Translezyon sentezinin basit mekanizması (125).

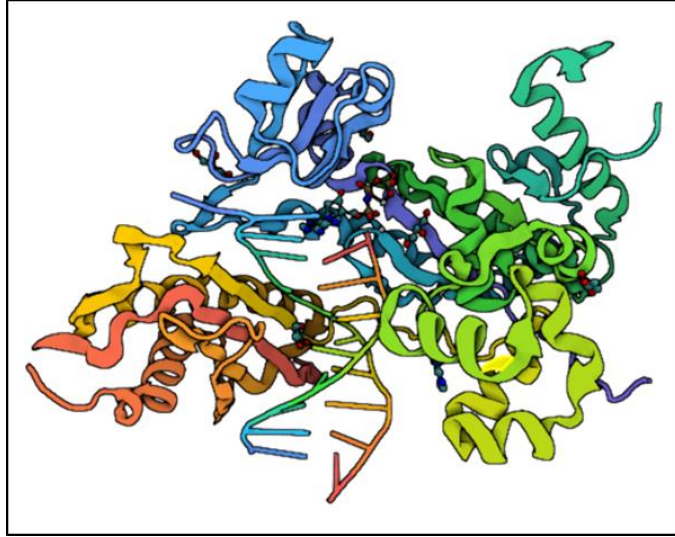
Farklı DNA hasar yanıt yollarıyla ilgili birçok TLS polimeraz enzimi (Pol η, Pol ι, Pol κ, Pol ζ, Pol θ, Rev 1, PrimPol gibi) vardır. Özelleşmiş bu DNA polimerazlar 3' → 5' eksonükleaz (*proofreading*) aktivitesine sahip değildir. *Proofreading* etkinliğinin olmaması, özellikle hasar görmemiş DNA'yı kopyalarken bu polimerazları hataya açık hale getirir (125, 126).

DNA Polimeraz η

POLH (veya XPV) geni tarafından kodlanan DNA polimeraz η, translezyon DNA sentezinden görevli proteinlerden bir tanesidir. Bu genin mutasyonu kseroderma pigmentosum V sendromuna neden olur.

Pol η da hasar görmemiş DNA'yı, substrat olarak kullanabilir ancak *proofreading* aktivitesi olmadığı için replikatif DNA polimerazlardan daha düşük bir doğrulukla çalışır. Daha düşük bir doğrulukla UV-hasarlı DNA'nın karşı zincirini de sentezleyebilir. Lezyonu atlar ve UV kaynaklı DNA hasarının etkisini bastırır (125). İnsan DNA polimeraz η'nın (hpol η), platin ilaçları tarafından oluşturulan zincir içi çapraz bağların ortadan kaldırılmasında görev aldığı da yapılan bazı çalışmalarda vurgulanmıştır (127, 128). DNA polimeraz eta'nın bu işlevi onu sisplatin direncine yönelik bir hedef haline getirir. Over kanser kök hücreleri ile yapılan bir çalışmada (129) azaltılmış Pol η ekspresyonunun sisplatin ile indüklenmiş apoptozu arttırdığı gösterilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada da Pol η inhibisyonunun over hücrelerini sisplatine duyarlı hale getirdiği belirtilmiştir (130).

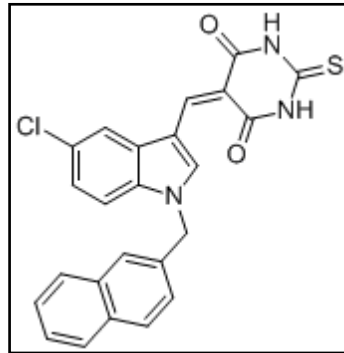
İnsan DNA polimeraz η proteinin yapısı Şekil 2.8'de gösterilmiştir (131).



Şekil 2.8. Protein data bank'tan alınmış (131), biorender ile düzenlenmiş DNA Pol η görüntüsü (PBD ID: 3MR2).

DNA Polimeraz η İnhibitörü Olarak PNR-7-02

Kimyasal adı 5-((5-kloro-1-(naftalen-2-ilmetil)-1H-indol-3-il)metilen)-2-tioksodihidro pirimidin-4,6(1H,5H)-dion olan PNR-7-02 insan DNA polimerazı η'nın inhibitörü olarak geliştirilmiştir (Şekil 2.9) (130).

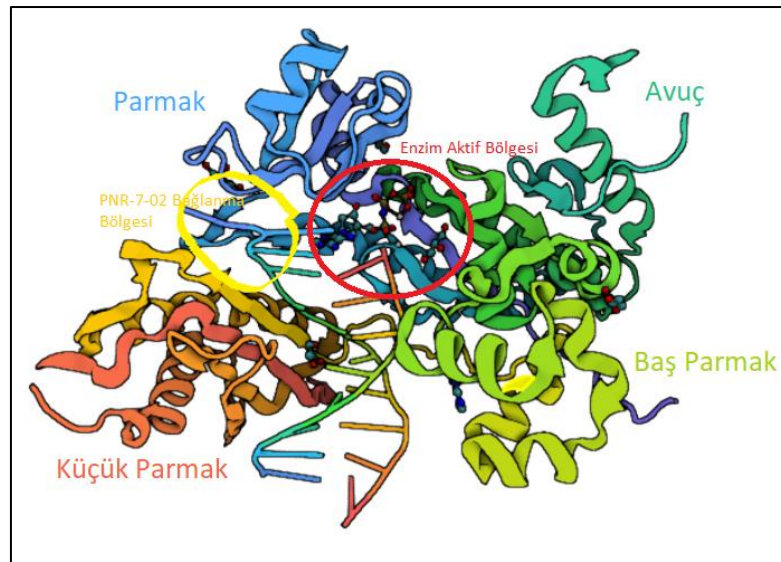


Şekil 2.9. PNR-7-02'nin yapısı (130).

İndol barbitürik asit, indol tiyobarbitürik asit ve indol kinüklidin iskeletinden türevlendirilen PNR-7-02'nin, yapılan *in vitro* çalışmalarla insan DNA polimeraz η (hpol η)

için IC50 değeri 8 μ M olup replikatif polimerazlara göre hpol η için 5-10 kat özgülükte olduğu gösterilmiştir (130).

PNR-7-02'nin, Pol η 'yı inhibisyonunu, enzimin parmak ve küçük parmak bölgesi arasındaki (aktif bölge dışında kalan) bir bölgeye bağlanarak (Şekil 2.10'da gösterilmiştir) kalıp DNA'nın DNA polimeraz η ile doğru yönelimini engelleyerek kısmi yarışmalı olarak gerçekleştirdiği belirtilmiştir (130).



Şekil 2.10. İnsan DNA polimeraz η proteininin *domain*leri. PNR-7-02 bağlanma bölgesi (sarı ile işaretlenmiş) ve enzim aktif merkezi (kırmızı ile işaretlenmiş).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, sisplatin \pm DNA Polimeraz η inhibitörü PNR-7-02'nin hücre canlılığına etkisi MTT yöntemi ile, DDB2 ve DNA Polimeraz η gen ekspresyonu üzerine etkisi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile incelendi. Bu amaçla hücreler çoğaltıldı. Büyümenin doğrusal olduğu hücre sayısı aralıkları belirlendi. Kullanılacak ilaçların IC50 değerleri MTT yöntemi kullanılarak, elde edilen verilerin GraphPad Prism 8 yazılımı ile hesaplandı. Kombine ilaç etkisi, Chou-Talalay yöntemiyle CompuSyn yazılımı kullanılarak değerlendirildi ve kombinasyon indeksleri (CI), ilaç azaltıcı indeks (DRI) değerleri hesaplandı. Gen ekspresyon analizleri için hücrelerden total RNA ekstraksiyonları TriPure kullanılarak yapıldı. RNA bütünlüğü agaroz jel elektroforezi kullanılarak, RNA konsantrasyonları da spektrofotometrik olarak belirlendi. İzole edilen total RNA'dan ticari kit ile cDNA sentezlendi ve qRT-PCR ile DDB2 ve DNA Polimeraz η genlerinin ekspresyonları incelendi. Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak anlamlılığı SPSS 23 programı kullanılarak değerlendirildi.

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasallar

Deneyde kullanılan tüm kimyasalların listesi Tablo 3.1'de listelendi.

Tablo 3.1. Deneyde kullanılan kimyasal malzemelerin listesi.

Kullanılan Kimyasallar	Üretici Firma/Katalog numarası
Agaroz	Beckmann/338400
DMEM	Euroclone / ECM0066L
DPBS	Euroclone ECM4004-XL
Etidyum bromür	Sigma/E8751
Fetal siğir serumu	Euroclone / ECS0180L
<i>Molecular biology grade su</i>	Biological Industries / 018691A
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid)	Sigma / M-2128
Penisillin-Streptomisin	Euroclone / ECB3001D
PNR-7-02 (5-((5-Kloro-1-(naftalen-2-ilmetil)-1H-indol-3-il)metilen)-2-tiyoksodihidropirimidin-4,6(1H,5H)-dion)	Axon Chem / 2965
Primerler	Ella Biotech GmbH
RNA izolasyon reaktifi	TriPure, Sigma / 11667157001
RNA Yükleme tamponu	Retroscrip 8542G1
Sisplatin	Sigma Aldrich / P-4394
Tripan mavisi	Biological Industries
Tripsin-EDTA	Biological Industries / 03-050 LB

3.1.2. Kitler

Gen ifadelenme çalışmalarında kullanılan cDNA Sentez Kiti (G236) ABM, Luna Universal qPCR Master Mix (M3003S) New England BioLabs Inc. firmasına aittir.

3.1.3. Hücre Hatları

Çalışmalarda kullanılacak MCF-7 insan meme adenokarsinom hücreleri (ATCC, HTB-22) Anabilim Dalı'mız öğretim üyesi Prof. Dr. Yasemin Aksoy ve Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü öğretim üyesi Prof. Dr. Lale Doğan'dan temin edildi.

3.1.4. Primerler

Primerler 20 – 22 nükleotid uzunluğunda, GC oranı %50-60 aralığında, kendi içlerinde/aralarında baz eşlemesi yapmayacak şekilde, Tm dereceleri çiftler arasında minimum olacak şekilde ve gen özgül olacak şekilde NCBI sitesi üzerinden primer blast sekmesi kullanılarak tasarlanmış (132) ve internal kontrol olarak β -aktin geni (GenBank ID: NM_001101.5) kullanılmıştır.

Deneylerde kullanılan primerler Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Deneyde kullanılan primerler.

Primer Adı	Dizisi (5'- 3')
Beta Aktin F	CCGACAGGATGCAGAAGGAG
Beta Aktin R	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC
DDB2 F	GGGAGCATCACTGGGCTGAA
DDB2 R	CCTGTGACCACCATTGGCT
POLH F	TTCGTGAGTCCCGTGGGAAA
POLH R	TGGCACGTTCAATCACAGCA

3.1.5. Cihazlar

Deneylerde kullanılan cihazlar Tablo 3.3'te listelenmiştir.

Tablo 3.3. Deneylerde kullanılan cihazların listesi.

Ürün Adı	Üretici Firma / Modeli
-80°C dondurucu	Sanyo / MDF-U6086S
Buz makinesi	Scotsman / AF
Deiyonize su cihazı	MES / mp MINIpure
Dikey akış kabini	Bioair / AURA B4
Gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi için Thermal Cyclers	Qiagen / Rotor-Gene Q
Güç kaynağı	Bio Rad / 1000/500 Power Supply
Hassas terazi	METTLER TOLEDO / PB303-S
İnkübatör	Major Science / Dry Bath Incubator
<i>Inverted</i> mikroskop	Leica
Jel Görüntüleme Sistemi (UV Transluminatör)	Life Technologies / TFX-20M
Karbondioksitli inkübatör	Sanyo / MCO-18AC
Manyetik karıştırıcı	IKA / Mini MR
Mikroplaka okuyucu	Molecular Devices / SpectraMax i3x

Tablo 3.3'ün devamı.	
Nanodrop	DeNovix / DS-11 Spectrophotometer
pH metre	Consort C830 / Multi-channel analyser
Sıvı azot tankı	Thermolyne / Biocane 20
Soğutmalı Santrifüj	Hettich / ROTINA 38R
Soğutmalı mikrosantrifüj	Eppendorf / Centrifuge 5417R
Su banyosu	YHDER / BH
Termal <i>Cycler</i>	Bio-rad / iCycler
Thoma lamı	Neubauer
Vorteks	Heidolph / REAX 2000

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücrelerin Büyütülmesi

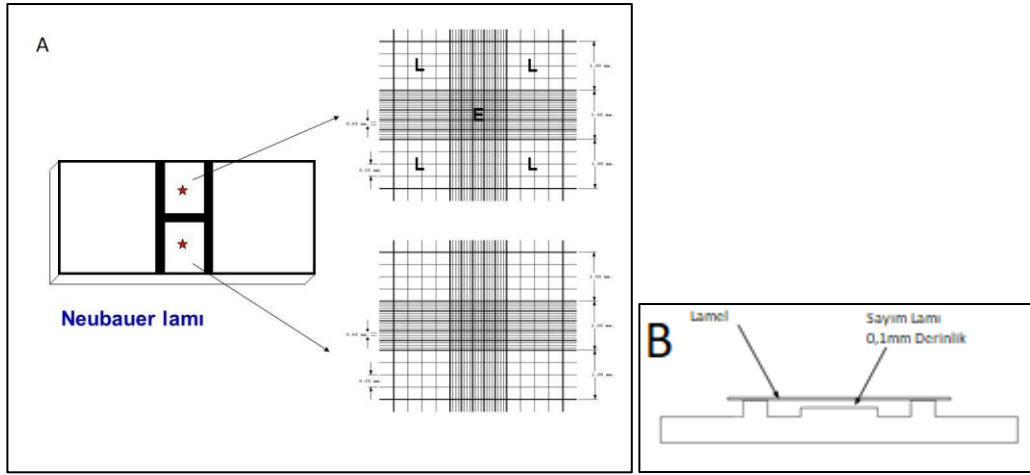
MCF-7 hücreleri %10 fetal sığır serumu, %1 Penisillin-Streptomisin ve 2 mM Glutamin içeren DMEM-LG besiyeri kullanılarak 37°C sıcaklıkta, %95 nem oranında ve %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Hücrelerin sağlıklı çoğalması ve doygunlukları (konflüensileri) *inverted* mikroskopta kontrol edildi ve %80-90 doygunluğa ulaşan hücreler deneylerde kullanılmak üzere sayıldı ya da pasajlandı.

3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması ve Sayılması

Hücreler ekildikleri kabın yüzey alanının %80-90'lık bir bölümünü doldurdıkları zaman besiyeri pipet ile uzaklaştırıldı. Kabın yüzeyi DPBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine %0,25 Tripsin-%0,02 EDTA çözeltisi eklenip birkaç dakika beklenecek hücrelerin kabın yüzeyinden ayrılması sağlandı. Hücrelerin kabın yüzeyinden ayrılma durumları *inverted* mikroskop (Leika) ile kontrol edildi. Hücreler yüzeyden ayrıldıklarında kap üzerine besiyeri eklendi. Hücre içeren besiyeri 15 ml'lik falkon tüplere alındı. Hücre sayımı için 20 µl örnek steril bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak ayrıldı. Kalan kısım Hettich / ROTINA 38R santrifüj ile 500 x g santrifüj gücü ile 5 dakika boyunca +4°C'de santrifüldü. Bu şekilde çöktürülen MCF-7 hücrelerinin üzerindeki süpernatant (besiyeri) uzaklaştırıldı ve pellet (hücreler) 1 ml yeni besiyeri ile tekrar süspansiyon edildi.

Hücre sayısını belirlemek için ayrılmış olan 20 µl'lik hücre süspansiyonu üzerine 20 µl tripan mavisi eklendi ve pipetlenerek karıştırıldı. Tripan mavisi, canlı hücrelerde hücre zarı bütünlüğü olduğundan dolayı hücre içine giremeyen, bir boyadır. Ölü hücrelerde ise hücre sitoplazmasına geçerek hücreyi mavi renge boyar.

Canlı hücrelerin sayılması mikroskop altında *Neubauer* lamı ile gerçekleştirildi (Şekil 3.1.A ve 3.1.B)

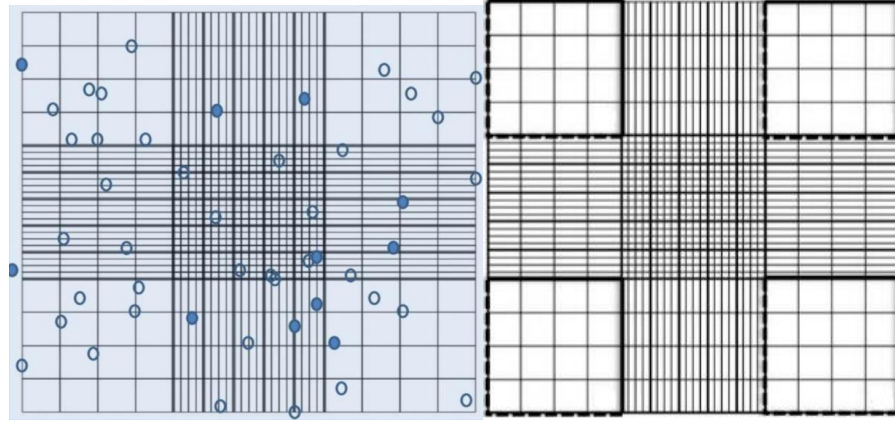


Şekil 3.1. Neubauer lamının görünümü A. Üstten görünüş, B. Yandan görünüş.

Lamdaki yıldız ile gösterilen her iki alan üzerine bu karışımdan 10 µl pipetlendi ve üzerine lam yerleştirildi. *Inverted* mikroskop altında 40X büyütme ile hücre sayımı gerçekleştirildi (Şekil 3.5). Her iki alanda sayılan canlı hücre sayılarının ortalaması alındı. Elde edilen değerlerin ortalaması alındıktan sonra seyreltme faktörü olan 2 ile çarpıldığında sayım yapılan alanın hacmi olan 0,1 µl'deki hücre sayısı bulundu. Bu sayı da 10^4 ile çarpılarak 1 ml besiyerindeki hücre sayısı elde edildi.

Özetle, ilk hücre süspansiyonundaki canlı hücre/ml sayısı aşağıdaki formül ile hesaplandı:

Canlı hücre sayısı (hücre/ml) = Sayılan canlı hücre (2 alandaki canlı hücre sayısı ortalaması) x Seyreltme faktörü (2×10^4)



Şekil 3.2. Neubauer lamında örnek bir hücre sayım görüntüsü. Mavi, hücre membran geçirgenliği bozulmuş (cansız kabul edilen) hücreler; Şeffaf, hücre membranı belirgin canlı hücreler. Siyah kalın düz çizgiler üzerine düşen hücreler sayılır, siyah kalın kesikli çizgiler üzerine gelen hücreler ise sayıma dahil edilmez.

Falkon tüpte yer alan toplam hücre sayısı, toplam hacim (ml) x canlı hücre sayısı (hücre/ml) formülüyle belirlendi ve kullanılmak istenen sayıda hücre hesaplandı.

3.2.3. Hücre Büyümesinin Doğrusal Olduğu Aralığın Belirlenmesi

96 kuyulu plakalar kullanarak 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 32 x 10³ hücre/kuyu (100 µl besiyeri) olacak şekilde hücreler kuyulara ekildi. 96 kuyulu plakanın en dışında kalan kuyulara 100 mikrolitre DPBS eklendi. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde bekletildi. Ekimden 48, 72 ve 96 saat sonra MTT yöntemi (133) ile hücre canlılıkları değerlendirildi (134) Her bir örnek 4 kez tekrar edildi.

3.2.4. MTT Deneyi

MTT testi, metabolik aktivite yoluyla hücrelerin canlılığının ölçülmesine dayanmaktadır (133). Sarı, suda çözünür MTT (3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür), canlı hücrelerde metabolik olarak mavi-mor çözünmeyen bir formazan kristaline indirgenir. Oluşan formazan kristallerinin alkol içinde çözülmesinden

sonra fotometrik ölçümlerle belirlenen renk yoğunluğu, canlı hücrelerin sayısı ile ilişkilidir.

MTT deneylerinde kullanılan protokol kaynak (134)'ten alınmış ve aşağıda özetlenmiştir.

- 1 mg/ml MTT çözeltisi fenol kırmızısı içermeyen besiyeri içinde hazırlandı.
- Doksan altı kuyulu plakadaki besiyerleri uzaklaştırılır. MTT çözeltisinden her bir kuyuya 50 µl eklendi ve plaka inkübatöre kaldırıldı.
- Üç saat sonra MTT çözeltisi uzaklaştırıldı. Yerine 100 µl izopropanol eklendi ve orbital karıştırıcı üzerinde plaka karıştırıldı.
- Sonrasında 570 nm dalga boyunda Spektramax i3x mikropilaka okuyucuda absorbans ölçümü yapıldı.

3.2.5. Sisplatin ve PNR-7-02'nin MCF-7 Hücre Hattındaki IC50 Değerlerinin Belirlenmesi

İki tane 96 kuyulu plakaya, 6000 hücre/kuyu olacak şekilde 100 µl besiyeri ile hücreler kuyulara ekildi. 96 kuyulu plakanın en dışında kalan kuyulara 100 mikrolitre DPBS eklendi ve inkübatöre kaldırıldı. 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırıldı ve 0-64 µM konsantrasyonlarında sisplatin ve 0-64 µM konsantrasyonlarında PNR-7-02 içeren besiyerlerinden 100 µl hücrelerin üzerine eklendi ve tekrar inkübatöre kaldırıldı. İlaç uygulandıktan 24, 48 ve 72 saat sonra MTT ile hücre canlılıkları değerlendirildi. % hücre canlılık- ilaç konsantrasyonu grafikleri çizildi ve IC50 değerleri GraphPad Prism 8 yazılımı kullanılarak hesaplandı. Deneyler dört tekrar olarak gerçekleştirildi.

Deneylerde kullanılacak olan sisplatinin stok çözeltisi kullanılmadan hemen önce DPBS içinde final derişimi 2 mM olacak şekilde hazırlandı. PNR-7-02 ise son konsantrasyonu 8,7 mM stok olacak şekilde DMSO içinde çözüldü ve besiyeri ile seyreltilerek kullanıldı.

3.2.6. İlaç Kombinasyon Testleri

MCF-7 meme kanseri hücre hattında sisplatin ve PNR-7-02'nin kombinasyonu ve ikili ilaç etkilerini incelemek için Chou-Talalay kombinasyon indeks metodu kullanıldı. CI, etkilenen fraksiyon (Fa) ve doz azaltım indeksi (DRI) CompuSyn yazılımı ile değerlendirildi. Kombinasyon indeksi (CI), sinerjistik ve antagonistik açıdan ilaç etkileşiminin sayısal bir ölçüsüdür (135, 136). Çalışmada iki ilacın kombine etkisinin değerlendirmesinde $CI < 1$, sinerjistik, $CI = 1$ aditif ve $CI > 1$ olduğu durumda da antagonistik etkili olarak değerlendirilmiştir (135). İlaç azaltım indeksi (DRI), kombinasyonda kullanılan ilaçlar için DRI'nın 1 olduğu dozlarda, azaltmanın olmadığı, $DRI > 1$ olduğunda doz azaltmanın uygun olduğunu ve $DRI < 1$ olduğu durumda da doz azaltımının uygun olmadığını ifade eder (135).

3.2.7. Gen İfadelenme Çalışmaları

10 cm çaplı petrilere 10 ml besiyeri içerisinde yaklaşık 1×10^6 hücre olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi ve 37°C 'de %5 CO_2 ve %95 nem içeren inkübatöre kaldırıldı.

24 saat sonra petrileredeki besiyeri uzaklaştırılıp IC_{50} değerlerine uygun sisplatin/PNR-7-02/sisplatin ve PNR-7-02 içeren besiyerleri hücreler üzerine eklendi. Yeniden inkübatöre kaldırılan hücreler 24 ya da 48 saat süre ile ilaçlarla inkübe edildi ve sonrasında toplandı.

3.2.8. Hücrelerin Toplanması ve RNA izolasyonları

Besiyerleri uzaklaştırıldı. Petri yüzeyleri soğuk DPBS ile iki kez yıkandı. Daha sonra buz üzerine alınarak hücre kazıyıcı ile yüzeyden kazındı ve 1 ml DPBS kullanılarak mikrosantrifüj tüplerine alındı.

Önceden +4°C'ye soğutulmuş santrifüjde 500 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 1ml TriPure çözeltilisi eklendi. Pipetaj yapılarak hücrelerin lizisi sağlandı ve TriPure protokolü üreticinin önerdiği şekilde uygulandı.

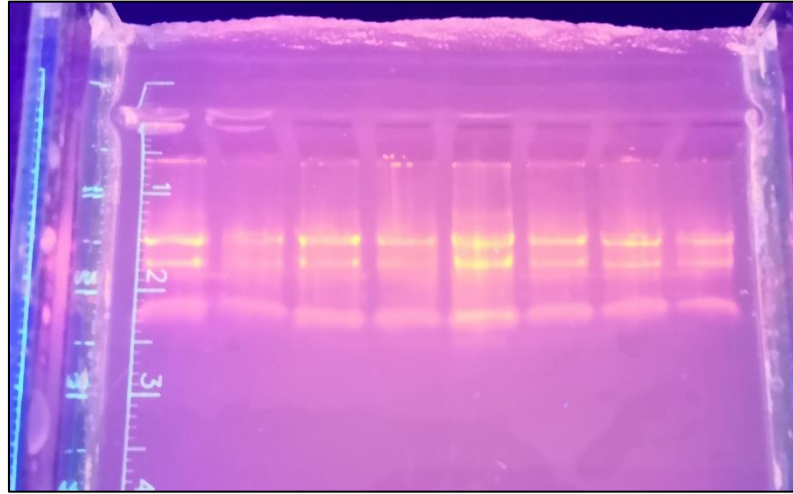
- Eppendorflar 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Üzerine 0,2 ml kloroform eklendi.
- 15 saniye sallanarak çalkalandı.
- 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 12000 x g'de 15 dakika santrifüj yapılarak faz ayrımı sağlandı.
- Üst fazlar yeni eppendorflara alınarak üzerlerine 0,5 ml izopropanol eklendi.
- Alt üst yapılarak karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 12000 x g'de 10 dakika santrifüj yapıldı.
- Süpernatant atıldı.
- 1 ml %75 etanol eklendi. Vorteks ile RNA pelleti yıkandı.
- 7500xg'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve etanolün uçması oda sıcaklığında bekletilerek sağlandı.
- 30 µl nükleaz içermeyen su eklenerek RNA pelleti çözüldü.
- 56°C'de 10 dakika ısıtıldı.
- Ardından bütün RNA örnekleri nanodrop ile derişim ($A_{260\text{ nm}}$) ve saflık (260/230 oranı > 1,8) kontrolleri yapıldıktan sonra daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.
- Elde edilen örnekler kullanılmadan önce bütünlüklerinin kontrolü için agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi.

3.2.9. Agaroz Jel Elektroforezi

1 g agaroz 100 ml TBE tamponu (89mM Tris, 89mM borikasıit, 2 mM EDTA, pH 8,3) içerisinde mikrodalga fırın (Bosch) yardımıyla çözüldü. Yaklaşık 50°Cye kadar soğuması

beklendikten sonra 5 µL (10 mg/ml) etidyum bromür eklendi ve ardından yaklaşık 5 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü ve taraklar takıldı. Jelin donması beklenirken örnekler hazırlandı.

1 µl total RNA örneği 1 µl 2X yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Jel oda sıcaklığında 80 Voltta yaklaşık yarım saat yürütüldükten sonra UV altında görüntülendi. Transluminatör üstündeki örnek bir agaroz jel görüntüsü Şekil 3.3'te sunulmuştur.



Şekil 3.3. Total RNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

3.2.10. cDNA Sentezi

cDNA sentez kiti (ABM, G236) ve total RNA kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 0,2 ml'lik PCR tüplerinde Tablo 3.4'te özetlendiği gibi gerekli bileşenler kullanılarak 15 dakika boyunca 50°C'de gerçekleştirildi. Ortam 85°C'ye kadar ısıtılarak, enzimin inhibe edilmesiyle reaksiyon sonlandırıldı ve tüpler buz üzerinde hızlı bir şekilde soğutuldu.

Sentezlenen cDNA'lar 50 ng/ml olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile seyreltildi ve daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Tablo 3.4. cDNA sentezi reaksiyon ortamı.

Bileşen	Hacim (10 µl)
Total RNA	1 µl
Primer (OligodT) (10 µM)	0,5 µl
dNTP Karışımı (10 µM)	0,5 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	5,25 µl
5x RT Tamponu	2 µl
<i>RNase OFF</i>	0,25 µl
RTaz	0,5 µl

3.2.11. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Luna Universal qPCR Master Mix qPCR kiti kullanılarak gen ifadenme analizleri QIAGEN marka Rotor-Gene Q cihazı kullanılarak aşağıdaki (Tablo 3.5 ve 3.6) reaksiyon ortam ve koşullarında gerçekleştirildi.

Tablo 3.5 qRT-PCR reaksiyon ortamı.

Bileşen	Hacim (10 µl)
qPCR Karışımı	5 µl
<i>Forward</i> primer	0,25 µl
<i>Reverse</i> primer	0,25 µl
Kalıp DNA	1 µl
Nükleaz içermeyen su	3,5 µl

Tablo 3.6. qRT-PCR reaksiyon koşulları.

Döngü Adımı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95°C	60 Saniye	1
Denatürasyon	95°C	15 Saniye	45
Uzama	60°C	30 Saniye*	
Erime Eğrisi	60-95°C	Değişken	1

* floresans okumanın yapılacağı adım.

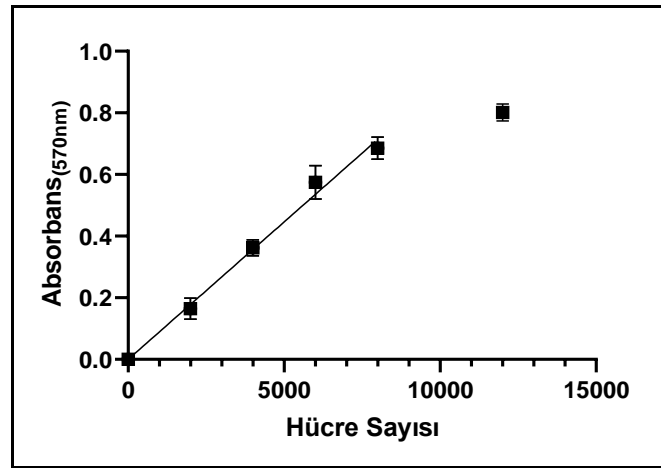
3.2.12. İstatistiksel Analizler

Yapılan deneylerden elde edilen sonuçlara ilişkin gruplar arası farklılıklar Kruskal-Wallis yöntemi ile non-parametrik olarak SPSS 23 programı kullanılarak değerlendirildi.

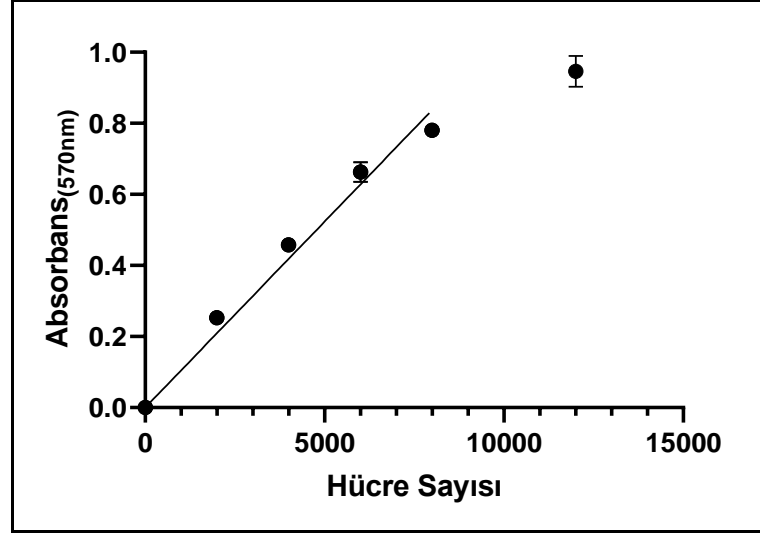
4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılık Deneylerinde Kullanılacak Hücre Sayısının Belirlenmesi

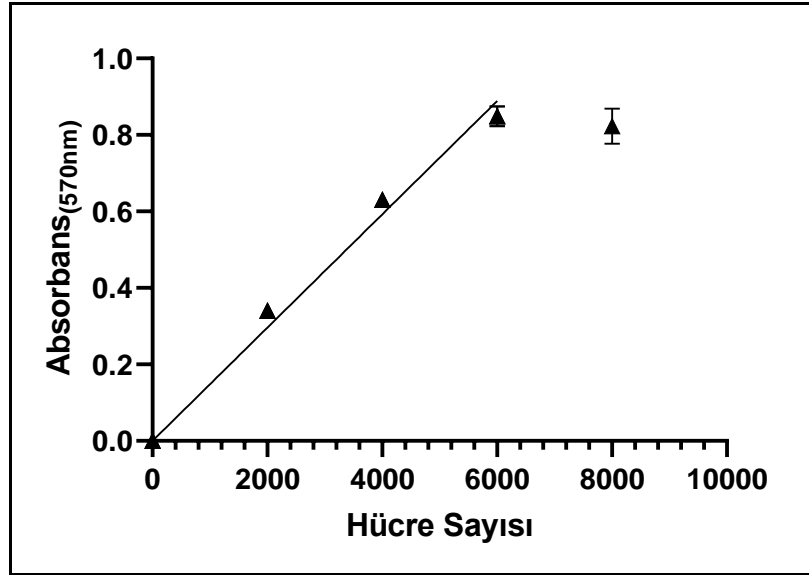
Hücre canlılık deneylerinin gerçekleştirilmesi için ilk olarak proliferasyonun doğrusal olarak gerçekleştiği hücre sayılarının belirlenmesi hedeflendi. Hücre sayısı optimizasyonu deneylerin tekrarlanabilirliğini arttırmak adına yapılması gereken bir adımdır (137, 138). Bu amaçla, her bir kuyucukta farklı sayıda hücre olacak şekilde ($2-32 \times 10^3$) 3 farklı 96 kuyucuklu plakaya (24, 48, 72 saat için) ekim yapıldı. Hücre canlılık deneylerinde hücrelerin ekiminden sonra 24 saat beklenmesi ve sonrasında planlanan süre boyunca ilaç verilmesi planlandı. Bu nedenle, bu deneylerde de öncelikle ekimden sonra hücrelerin plakalara yapışması için 24 saat süreyle beklendi. Daha sonra hücreler her bir deney seti için 24, 48 ve 72 saat süreyle büyütüldü ve MTT yöntemi (133) ile hücre canlılıkları değerlendirildi. Elde edilen verilerle çizilen hücre sayısına karşı absorbans (570nm) grafikleri Şekil 4.1- 4.3'te gösterilmiştir. Büyümenin doğrusal olduğu aralığı daha net göstermesi açısından grafiklere yalnızca doğrusallıktan sapan ilk noktalar dahil edilmiştir.



Şekil 4.1. MCF-7 meme kanseri hücre hatlarının (ekimden 48 saat sonra) artan hücre sayılarına (Hücre sayısı: $2-8 \times 10^3$) karşı absorbans grafiği (n=4).



Şekil 4.2. MCF-7 meme kanseri hücre hatlarının (ekimden 72 saat sonra) artan hücre sayılarına (Hücre sayısı: $2-12 \times 10^3$) karşı absorbanst grafiği (n=4).



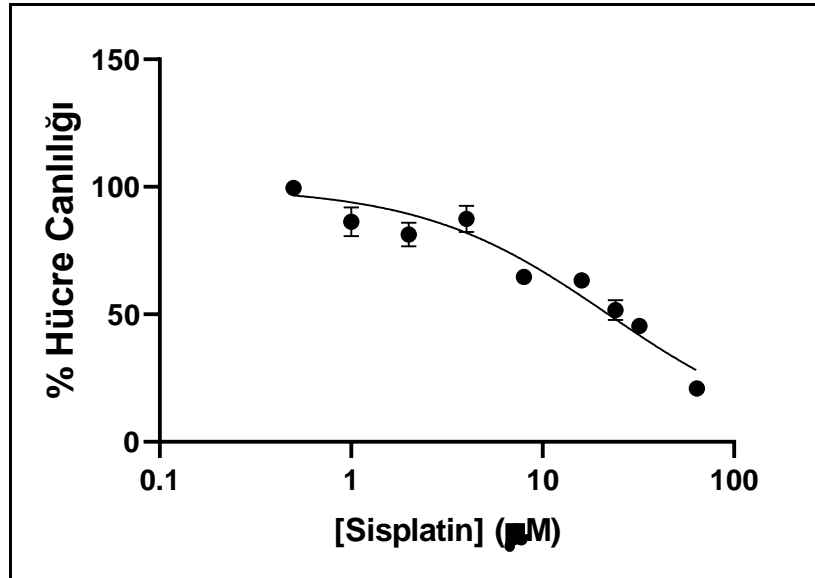
Şekil 4.3. MCF-7 meme kanseri hücre hatlarının (ekimden 96 saat sonra) artan hücre sayılarına (Hücre sayısı: $2-12 \times 10^3$) karşı absorbanst grafiği (n=4).

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, her üç grafik birlikte değerlendirildiğinde, 6×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapılmasının, büyümede lineerliğin olduğu en yüksek absorbanst değerinin görüldüğu hücre sayısı olması nedeniyle sonraki deneylerimiz için

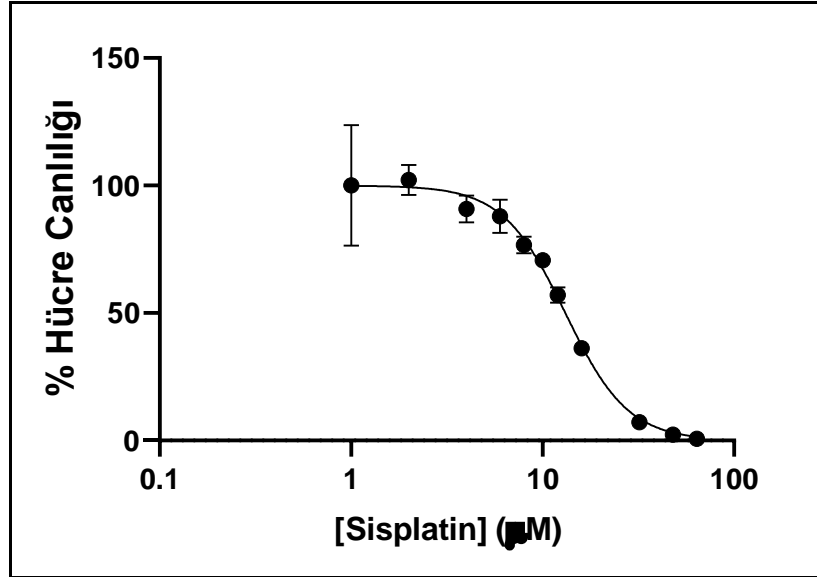
en iyi seçenek olduğu görüldü. Bu nedenle de hücre canlılık deneylerinin bu hücre sayısı ile gerçekleştirilmesine karar verildi.

4.2. Sisplatinin MCF-7 Hücre Hattında Hücre Canlılığına Etkisinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi

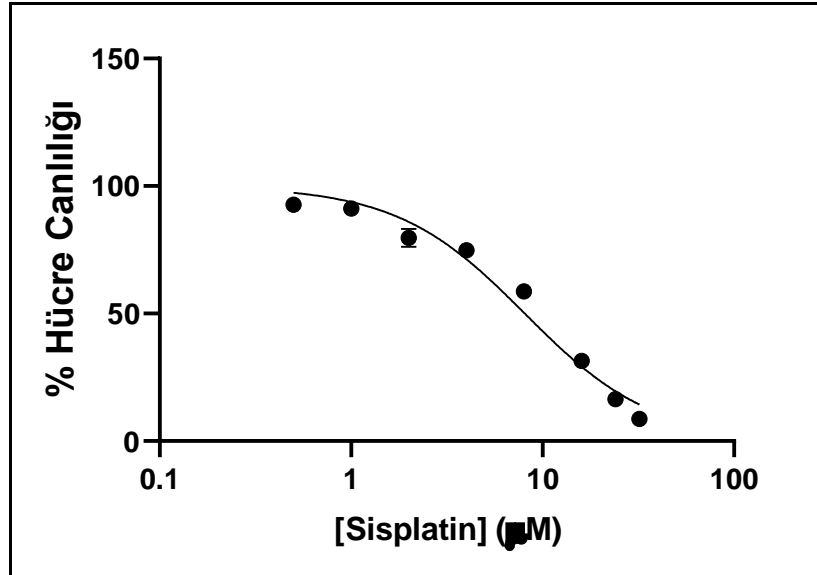
MCF-7 hücreleri farklı derişimlerde sisplatine 24, 48 ya da 72 saat süreyle maruz bırakıldıktan sonra MTT deneyleri gerçekleştirildi. Elde edilen veriler sisplatin derişimine karşı % hücre canlılık grafiklerinin (Şekil 4.4-4.6) ve farklı sisplatin dozu ve farklı inkübasyon zamanlarındaki % hücre canlılığının birlikte gösterildiği grafiğin (Şekil 4.7) çizilmesinde ve istatistiksel analizlerde kullanıldı.



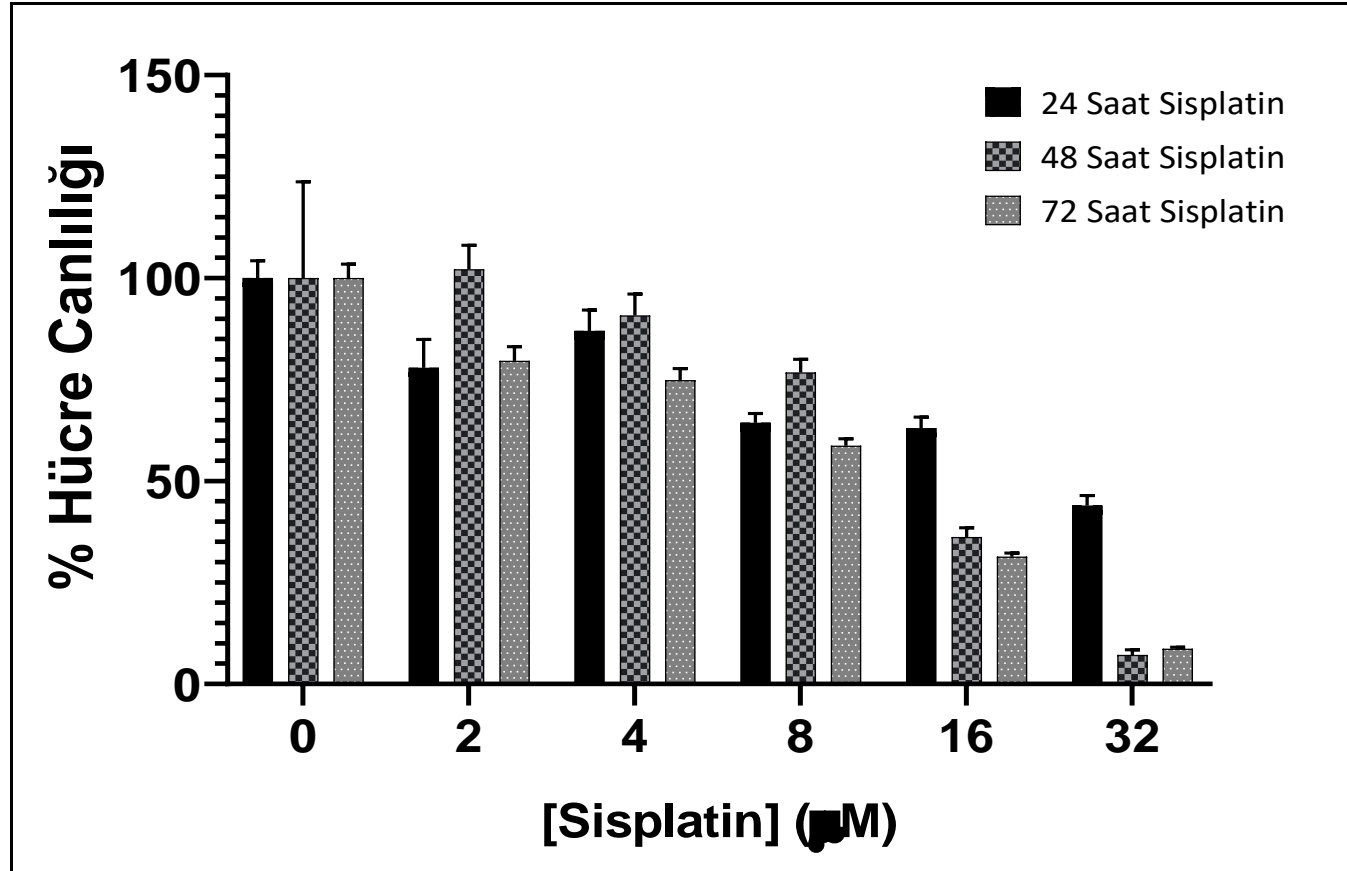
Şekil 4.4. MCF-7 hücrelerinin farklı sisplatin dozları ile 24 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % hücre canlılık grafikleri (n=4).



Şekil 4.5. MCF-7 hücrelerinin farklı sislipatin dozları ile 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % hücre canlılık grafikleri (n=4).



Şekil 4.6. MCF-7 hücrelerinin farklı sislipatin dozları ile 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % hücre canlılık grafikleri (n=4).

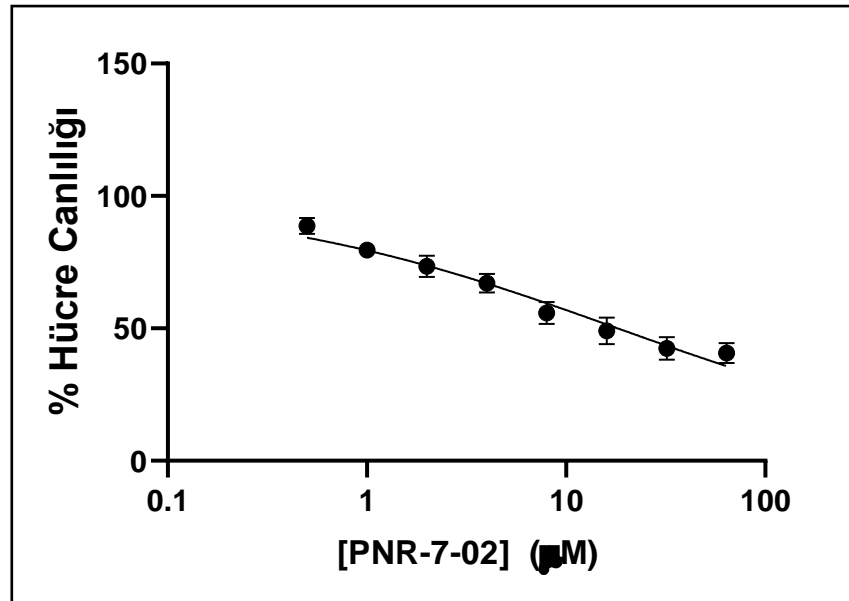


Şekil 4.7. MCF-7 hücrelerinin farklı sisplatin dozları ile 24-48-72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % hücre canlılık değerleri (n=4).

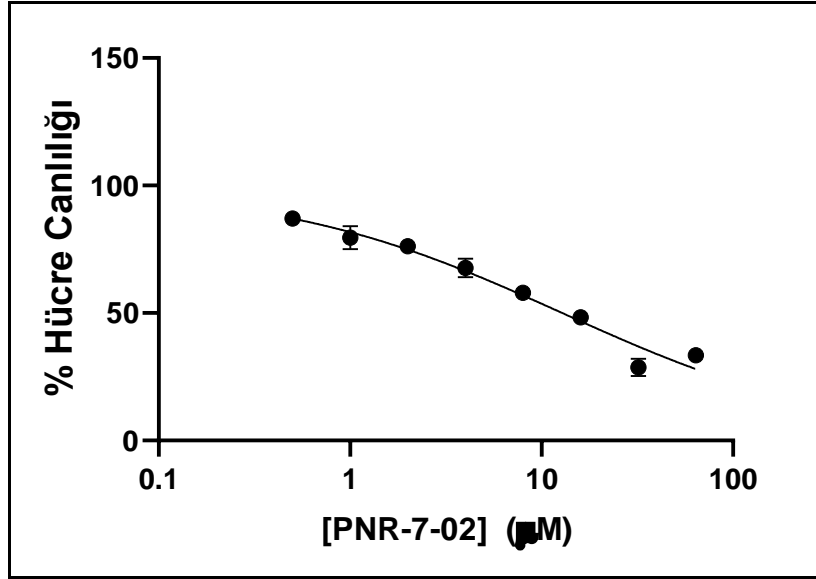
Sisplatine maruz bırakılmış MCF-7 hücrelerinin sisplatin dozları ile % hücre canlılığı oranları arasındaki etki Kruskal-Wallis analizi ile karşılaştırıldığında 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri için 2-4-8-16 μM 'lık sisplatin uygulamalarının birbirlerine göre, hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadığı saptandı ($p>0,05$).

4.3. PNR-7-02'nin MCF-7 Hücre Hattında Hücre Canlılığına Etkisinin Belirlenmesi

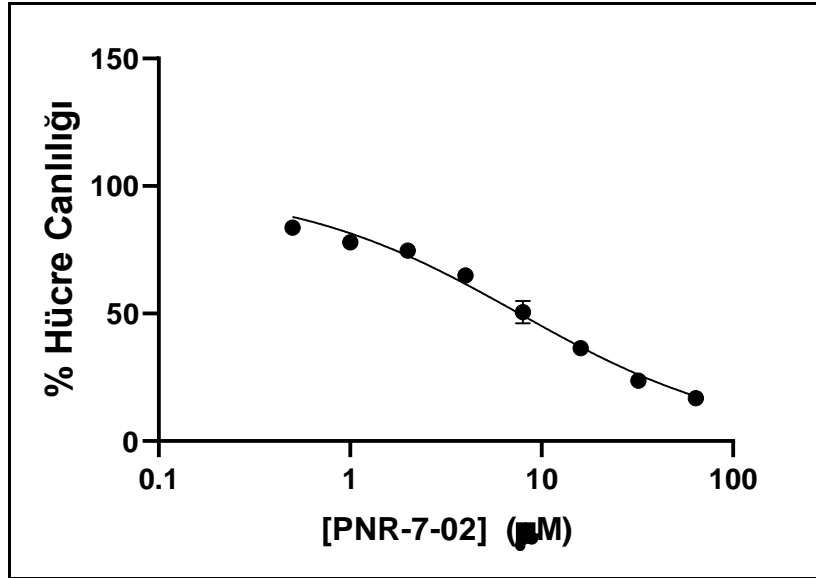
MCF-7 hücreleri farklı derişimlerde PNR-7-02'ye 24, 48 ya da 72 saat süreyle maruz bırakıldıktan sonra MTT deneyleri gerçekleştirildi. Elde edilen veriler PNR-7-02 derişimine karşı % hücre canlılığı grafiklerin (Şekil 4.8-4.10) ve farklı PNR-7-02 dozu ve farklı inkübasyon zamanlarındaki % hücre canlılığının birlikte gösterildiği grafiğin çizilmesinde (Şekil 4.11) ve istatistiksel analizlerde kullanıldı.



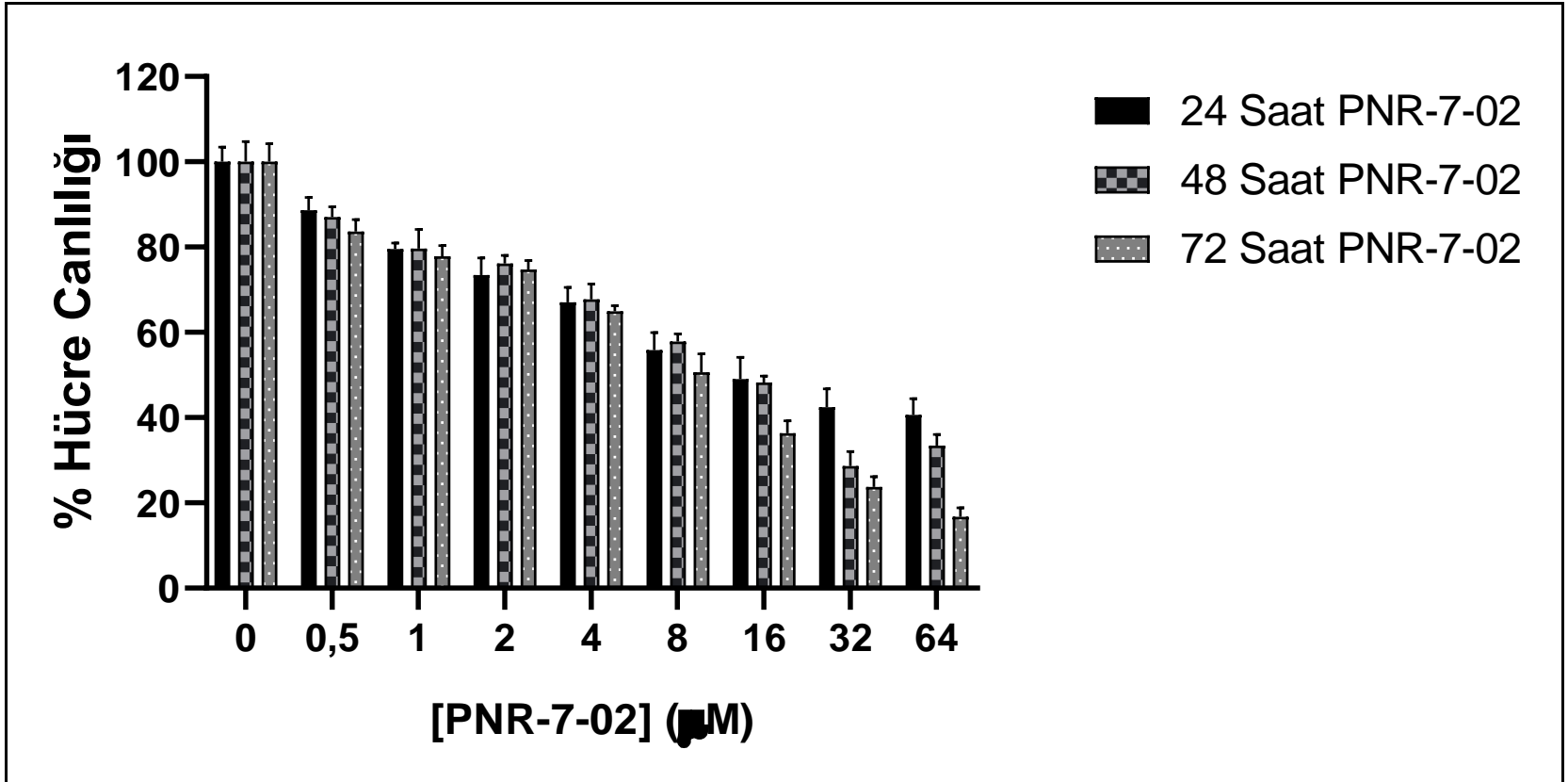
Şekil 4.8. MCF-7 hücrelerinin farklı PNR-7-02 dozları ile 24 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % hücre canlılığı grafikleri (n=4).



Şekil 4.9. MCF-7 hücrelerinin farklı PNR-7-02 dozları ile 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % hücre canlılığı grafikleri (n=4).



Şekil 4.10. MCF-7 hücrelerinin farklı PNR-7-02 dozları ile 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % hücre canlılığı grafikleri (n=4).



Şekil 4.11. MCF-7 hücrelerinin farklı PNR-7-02 dozları ile 24-48-72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % hücre canlılık değerleri.

PNR-7-02'ye maruz bırakılmış MCF-7 hücrelerinin PNR-7-02 dozları ile % hücre canlılığı oranları arasındaki etki Kruskall-Wallis analizi ile karşılaştırıldığında 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri için 0,5-1-2-4-8-16 μM uygulamalarının ve 72 saatlik inkübasyon süreleri için 0,5-1-2-4-8-16-32 μM uygulamalarının birbirlerine göre, hücre canlılığına istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundurmadiğı saptandı ($p>0,05$).

4.4. Sisplatin ve PNR-7-02 için IC50 değerlerinin hesaplanması

Elde edilen verilerin GraphPad 8 yazılımına girilmesiyle sisplatin ve PNR-7-02 için hesaplanan IC50 değerleri ve %95 güven aralığındaki değerleri Tablo 4.1'de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Sisplatin ve PNR-7-02 için hesaplanan IC50 değerleri.

	IC ₅₀					
	Sisplatin (μM)			PNR-7-02 (μM)		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat
IC50 + SD	21,46 \pm 1,1	13,15 \pm 1,03	8,073 \pm 1,05	18,17 \pm 1,09	12,83 \pm 1,07	7,65 \pm 1,05
(%95 CI)	18,11- 25,71	12,51- 13,86	7,31- 8,92	15,34- 21,88	11,18- 14,82	6,98 - 8,38

4.5. Kombinasyon İndeksi ve İlaç Azaltım İndeksi Verileri

Graphpad 8 yazılımı ile hesaplanan IC50 değerleri referans alınarak 24 saat için IC50 değerleri sisplatin için 21,5 μM ve PNR-7-02 için 18,2 μM ve 48 saat için de sırasıyla 13 μM ve 12,8 μM IC50 değerleri kullanılarak, $\frac{1}{4}$ IC50, $\frac{1}{2}$ IC50, IC50, 2xIC50, 4xIC50 derişimleri olacak şekilde kombine ilaç uygulaması gerçekleştirildi. Chou-Talalay yöntemi ile kombinasyon indeksi (CI) verileri hesaplandı (135).

Yirmi dört saatlik kombine ilaç uygulaması için ölen/etkilenen hücre fraksiyonu (Fa) 0,65 olana kadarki bölgede sinerjistik ($CI<1$), Fa'nın 0,70 ve daha fazla olduğu durumlar için de antagonist bir etki ($CI>1$) görülebileceğı saptandı (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. MCF-7 hücrelerinde 24 saat boyunca kombine ilaç uygulaması ile elde edilmiş verilerle CompuSyn yazılımında hesaplanan CI değerleri.

CI Data for Drug Combo: C+P (C+P [21.5:18.2])		
Fa	CI Value	Total Dose
0.05	0.07673	0.00789
0.1	0.10967	0.04777
0.15	0.14028	0.14568
0.2	0.17204	0.33725
0.25	0.20683	0.67461
0.3	0.24625	1.23621
0.35	0.29211	2.14290
0.4	0.34671	3.58543
0.45	0.41316	5.87343
0.5	0.49592	9.52633
0.55	0.60166	15.4511
0.6	0.74085	25.3110
0.65	0.93082	42.3496
0.7	1.20220	73.4107
0.75	1.61413	134.524
0.8	2.29499	269.095
0.85	3.57630	622.966
0.9	6.59580	1899.65
0.95	18.3878	11501.5
0.97	38.7689	41421.1

Kırk sekiz saatlik kombine ilaç uygulaması için ise için ölen/etkilenen hücre fraksiyonu (Fa) 0,70 olana kadarki bölgede sinerjistik (CI<1), Fa'nın 0,75 ve daha fazla olduğu durumlar için de antagonist bir etki (CI>1) görülebileceği hesaplandı (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. MCF-7 hücrelerinde 48 saat boyunca kombine ilaç uygulaması ile elde edilmiş verilerle CompuSyn yazılımında hesaplanan CI değerleri.

CI Data for Drug Combo: C + P (C+P [13:12.8])		
Fa	CI Value	Total Dose
0.05	0.54130	0.08434
0.1	0.45880	0.25185
0.15	0.42424	0.49577
0.2	0.40873	0.82555
0.25	0.40455	1.25793
0.3	0.40891	1.81738
0.35	0.42092	2.53850
0.4	0.44073	3.47033
0.45	0.46926	4.68363
0.5	0.50833	6.28309
0.55	0.56087	8.42875
0.6	0.63159	11.3756
0.65	0.72815	15.5514
0.7	0.86367	21.7221
0.75	1.06228	31.3828
0.8	1.37327	47.8195
0.85	1.91449	79.6278
0.9	3.05013	156.751
0.95	6.68449	468.061
0.97	11.8199	1019.39

CompuSyn verilerine göre 24 saatlik (sisplatin dozunun 46,1 μM 'dan az olduğu koşul) inkübasyon için Fa değerinin %70'e eşit ya da daha az olmasının beklendiği durumlarda sispilin için DRI değerinin PNR-7-02'nin birlikte kullanımının doz azaltımını sağlayacağı hesaplandı (DRI>1). Daha yüksek dozlarında ise PNR-7-02'nin sispilin dozunu azaltıcı etkisi olmayacağı belirlendi (Tablo 4.4). Kırk sekiz saatlik ilaç uygulaması için DRI>1 olduğu durumlar ise Fa'nın 0,75 olduğu (Sispilin dozunun 17,9 μM altında olduğu) koşul olarak hesaplandı. (Tablo 4.5).

Tablo 4.4. MCF-7 hücrelerinde 24 saat boyunca kombine ilaç uygulaması ile elde edilmiş verilerle CompuSyn yazılımında hesaplanan DRI değerleri.

DRI Data for Drug Combo: C+P (C+P [21.5:18.2])				
Fa	Dose C	Dose P	DRI C	DRI P
0.05	1.15349	0.04953	269.941	13.6939
0.1	2.38549	0.22160	92.2048	10.1184
0.15	3.74071	0.56030	47.4154	8.38980
0.2	5.24869	1.12647	28.7381	7.28609
0.25	6.94297	2.00554	19.0041	6.48485
0.3	8.86504	3.31951	13.2416	5.85735
0.35	11.0683	5.24614	9.53740	5.34020
0.4	13.6231	8.05041	7.01596	4.89774
0.45	16.6251	12.1381	5.22668	4.50795
0.5	20.2075	18.1507	3.91687	4.15611
0.55	24.5618	27.1416	2.93530	3.83173
0.6	29.9743	40.9231	2.18671	3.52677
0.65	36.8932	62.7981	1.60860	3.23457
0.7	46.0622	99.2458	1.15861	2.94898
0.75	58.8139	164.269	0.80729	2.66363
0.8	77.7990	292.459	0.53385	2.37071
0.85	109.162	587.987	0.32356	2.05884
0.9	171.178	1486.67	0.16639	1.70710
0.95	354.007	6650.94	0.05683	1.26138
0.97	593.667	19312.9	0.02647	1.01705

Tablo 4.5. MCF-7 hücrelerinde 48 saat boyunca kombine ilaç uygulaması ile elde edilmiş verilerle CompuSyn yazılımında hesaplanan DRI değerleri.

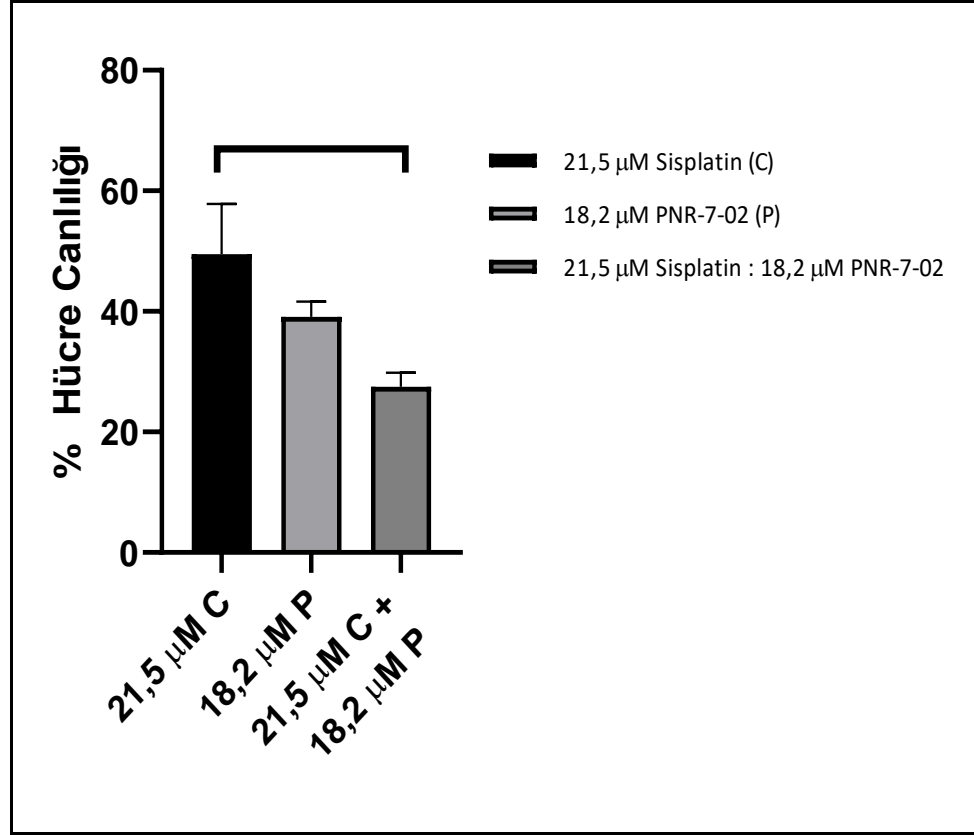
DRI Data for Drug Combo: C + P (C+P [13:12.8])				
Fa	Dose C	Dose P	DRI C	DRI P
0.05	3.91875	0.07888	92.2104	1.88516
0.1	5.18992	0.28766	40.8979	2.30229
0.15	6.17594	0.64088	24.7228	2.60559
0.2	7.04010	1.17140	16.9244	2.86004
0.25	7.84431	1.92770	12.3759	3.08884
0.3	8.62168	2.97871	9.41506	3.30364
0.35	9.39430	4.42260	7.34454	3.51165
0.4	10.1798	6.40155	5.82163	3.71813
0.45	10.9946	9.12621	4.65880	3.92751
0.5	11.8563	12.9180	3.74500	4.14411
0.55	12.7854	18.2851	3.01043	4.37265
0.6	13.8088	26.0677	2.40912	4.61889
0.65	14.9635	37.7321	1.90958	4.89047
0.7	16.3044	56.0222	1.48963	5.19839
0.75	17.9202	86.5662	1.13325	5.55990
0.8	19.9672	142.457	0.82868	6.00467
0.85	22.7611	260.382	0.56729	6.59106
0.9	27.0854	580.099	0.34293	7.45938
0.95	35.8715	2115.47	0.15210	9.10989
0.97	43.8091	5311.45	0.08529	10.5022

4.6. Sisplatin ve PNR-7-02'nin Kombine Uygulanmasının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi

MCF-7 hücrelerine tek başlarına hesaplanan IC50 değeriyle uyumlu olarak sisplatin ya da PNR-7-2 verilip inkübe edilerek sonrasında MTT yöntemi ile hücre canlılığı değerlendirildi.

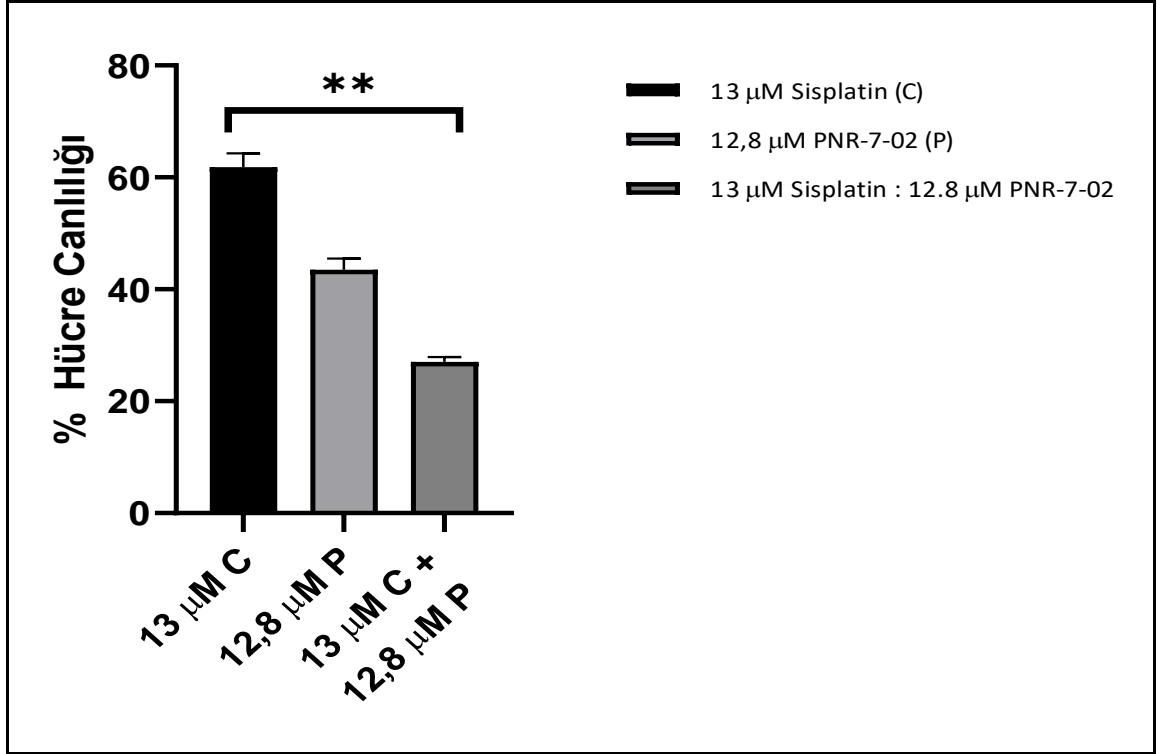
MCF-7 hücrelerinin 24 saat süre ile IC50 değerlerine uygun derişimlerde sisplatin ve/veya PNR-7-02'ye maruz bırakılması ile elde edilen % hücre canlılık grafiği Şekil 4.12'de sunulmuştur.

Bulgularımız, 24 saatlik inkübasyon için 18,2 µM PNR-7-02 uygulaması ile kombine ilaç uygulaması karşılaştırıldığında kombine ilaç uygulamasında %hücre canlılığındaki azalmanın daha belirgin olduğunu, ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını ($p=0,078$) göstermiştir. 21,5 µM sisplatin uygulaması ile kombine ilaç uygulaması sonucu elde edilen veriler karşılaştırıldığında ise %hücre canlılığında, kombine ilaç uygulamasında tek başına sisplatin uygulamasına göre anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır ($p=0,003$).



Şekil 4.12. MCF-7 hücrelerinin 24 saat süre ile IC50 değerlerine uygun derişimlerde sisplatin ve/veya PNR-7-02'ye maruz bırakılması ile elde edilen % hücre canlılık grafiğı (**, p<0,05).

MCF-7 hücrelerinin 48 saat süre ile IC50 değerlerine uygun derişimlerde sisplatin ve/veya PNR-7-02'ye maruz bırakılması ile elde edilen % hücre canlılık grafiğı de Şekil 4.13'te gösterilmiştir. İnkübasyonun 48 saatlik olduğu durumda, 12,8 µM PNR-7-02'nin tek uygulaması ile kombine ilaç uygulaması karşılaştırıldığında kombine ilaç uygulamasında %hücre canlılığındaki azalmanın daha çok olduğu, ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını (p=0,117) saptanmıştır. 13 µM sisplatin uygulaması ile kombine ilaç uygulaması sonucu elde edilen veriler karşılaştırıldığında ise %hücre canlılığında, kombine ilaç uygulamasında tek başına sisplatin uygulamasına göre anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır (p=0,002).



Şekil 4.13. MCF-7 hücrelerinin 24 saat süre ile IC50 değerlerine uygun derişimlerde sisplatin ve/veya PNR-7-02'ye maruz bırakılması ile elde edilen % hücre canlılık grafiği (**, p<0,05).

4.7. Sisplatin ve PNR-7-02'nin Kombine Uygulanmasının DDB2 ve Pol η Gen İfadelemesi Üzerindeki Etkisi

İlaç uygulamalarının gen düzeylerine olan etkileri RT-PCR sonunda elde edilen Cycle Threshold (Ct, Döngü Eşığı) değerleri kullanarak relatif olarak hesaplanmıştır. Bağlı gen ifadesi analizlerinde β-aktin referans gen olarak alınıp buna göre ΔCT ve $\Delta\Delta CT$ değerleri, $\Delta CT = Ct_{\text{örnek}} - Ct_{\text{referans}}$ ve $\Delta\Delta CT = \Delta Ct_{\text{örnek}} - \text{ortalama } \Delta Ct_{\text{kontrol}}$ olarak hesaplanmıştır. Gen ifade seviyelerinin karşılaştırması $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri üzerinden yapılmıştır (Örnek, ilaç uygulanmış; kontrol, ilaç uygulaması yapılmamış örnekler) (139).

Sisplatinin ve PNR-7-02'nin IC50 değerlerine uygun derişimlerde 24 ve 48 saat uygulanmasının DDB2 ve Pol η gen ekspresyonunun analizi sonucu elde ettiğimiz veriler Tablo 4.6 – 4.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. 24 saat süreyle IC50 dozlarında ilaç uygulaması sonrası DDB2 gen ekspresyonlarındaki değişim ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

24 Saat DDB2 Gen Ekspresyonu					
	1	2	3	Ort.	Ort.*
Kontrol	1,301	0,768		1,035	1
Sisplatin 21,5 μM	2,639	8,398	9,254	6,763	6,534
PNR-7-02 18,2 μM	3,387	2,071	0,250	1,903	1,839
Kombine	1,840	1,301	0,566	1,236	1,194

* Kontrole göre normalize edilmiş ortalama

Tablo 4.7. 24 saat süreyle IC50 dozlarında ilaç uygulaması sonrası POLH gen ekspresyonlarındaki değişim ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

24 Saat POLH Gen Ekspresyonu					
	1	2	3	Ort.	Ort.*
Kontrol	1,064	0,940		1,002	1
Sisplatin 21,5 μM	3,010	3,340	5,618	3,990	3,982
PNR-7-02 18,2 μM	1,214	1,320	1,320	1,284	1,281
Kombine	1,057	2,144	0,818	1,339	1,336

Tablo 4.8. 48 saat süreyle IC50 dozlarında ilaç uygulaması sonrası DDB2 gen ekspresyonlarındaki değişim ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

48 Saat DDB2 Gen Ekspresyonu					
	1	2	3	Ort.	Ort.*
Kontrol	0,801	0,507	2,462	1,257	1
Sisplatin 13 μM	6,063	8,754	14,420	9,746	7,753
PNR-7-02 12,8 μM	0,865	2,395	3,160	2,140	1,702
Kombine	2,071	4,028	2,888	2,995	2,383

* Kontrole göre normalize edilmiş ortalama

Tablo 4.9. 48 saat süreyle IC50 dozlarında ilaç uygulaması sonrası DDB2 gen ekspresyonlarındaki değişim ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

48 Saat POLH Gen Ekspresyonu					
	1	2	3	Ort.	Ort.*
Kontrol	0,833	1,363	0,881	1,026	1
Sisplatin 13 μ M	4,713	7,551	14,998	9,087	8,857
PNR-7-02 12,8 μ M	6,528	4,307	2,561	4,465	4,352
Kombine	2,651	5,605	11,686	6,647	6,479

* Kontrole göre normalize edilmiş ortalama

5. TARTIŞMA

Sisplatin, çok çeşitli kanserlerin ilaçla tedavisinde sıklıkla kullanılan, platin içeren bir kemoterapötiktir. İlaç tedavisinde en önemli sınırlayıcı faktör, sisplatinin etkisine karşı hücrede direnç gelişimidir. İlaça direnç kazanılması daha yüksek doz ilaç kullanımı ile sonuçlanır. Bu da bulantı-kusma, nefrotoksik, nörotoksik, ototoksik vb. yan etkilerin artmasına neden olur. Sisplatinin yan etkileri de kullanımını sınırlayıcı ikinci bir parametre olarak yer alır. Sisplatin etkisinin düşük dozlarda kullanımını sağlayacak, ilaç direncini azaltacak stratejilerin geliştirilmesi etkin bir tedavi için kritiktir.

Sisplatine karşı hücrede ilaç direnci gelişiminde ilacın hücrede birikiminin azalması (10, 11), glutasyon, metalloproteinin gibi moleküllerle bağlanarak inaktivasyonu gibi pek çok mekanizma üzerinde durulmuştur (13). İlaç, sitotoksik etkisini DNA'da hasarlar oluşturarak hücreyi ölüme götürmek yoluyla gerçekleştirmektedir (15). İlaç direnci gelişimi mekanizmaları arasında, hücrede bu DNA hasarlarını onaracak tamir mekanizmalarının artışı ve hasarın *bypass* edilerek replikasyonun ilerlemesine olanak veren translezyon DNA sentezinin artması ayrı bir öneme sahiptir (16, 17).

Meme kanseri, en sık görülen kanser türü olması nedeniyle önemlidir (1). Meme kanserinde tümör histopatolojik tipi, TNM sınıflamasına göre yaygınlığı, moleküler belirteçler, bireye ait faktörler vb. pek çok faktör değerlendirilerek cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hedefe yönelik tedavilerden biri ya da birkaçı kullanılır (32). Sisplatin, geliştirilen yeni ilaçlar nedeniyle kemoterapi protokollerindeki yerini kaybetmiş görünmekle birlikte son yıllarda tedavide kullanımı yeniden gündeme gelmiştir ve sisplatin/sisplatine direnç mekanizmaları bu kanser türünde yeni pek çok araştırmanın konusunu oluşturmaktadır (140-142).

Sisplatinin indüklediği DNA hasarlarının %90'ından fazlası zincir içi DNA çapraz bağlanması/eklentisidir (9). Bu hasarları onaran mekanizma ise NER'dir (15). DDB2, UV

ışık tarafından hasarlanmış DNA'ya bağlanan DDB (UV-DDB) heterodimerinin 48 kDa'luk küçük alt birimidir ve bir grup araştırmacıya göre NER'de hasarın tanınmasında görev alan bir proteindir (120, 143). Bununla birlikte, Sancar ve ark. ları ve büyük bir araştırmacı grubunun gerçekleştirdiği çalışmalar, NER'de ana hasar tanıma proteinlerinin XPA, XPC, RPA olduğu göstermiştir (19). DDB2'nin hasar bölgesine ivedilikle giden ve bağlanan bir protein olmakla birlikte (20) *in vitro* olarak NER etkinliği üzerindeki etkisinin bulunmadığı saptanmıştır (21). *In vivo* çalışmalarda ise NER etkinliğini arttırdığı bulunmuştur (22). DDB2 (XPE) proteinini kodlayan genin mutasyonu kseroderma pigmentozum grup E (XPE) sendromuna neden olur (144). XPE hücrelerinde hem UV ışık hem de sisplatin tarafından indüklenmiş DNA hasarlarının onarımı bozulmaktadır (145). Sisplatin yanıtı ile DDB2 arasında bir ilişki olduğu rapor edilmiş, sisplatin direnci ile DDB2 ekspresyonu arasında doğrusal ya da ters bir korelasyon olduğunu yönelik farklı sonuçlar sunulmuştur (26).

DNA polimeraz η , translezyon DNA sentezinde görev alan ana polimerazlardandır. DNA hasarına karşı tolerans oluşturarak replikasyonun ilerlemesine olanak sağlar. Pol η 'nın GG-NER defekti olan ultraviyole ışığa maruz kalmış hücrelerde hücre canlılığını devam ettirmek için gerekli olduğu rapor edilmiştir. Sisplatin tarafından indüklenen zincir içi bağ oluşumu ile karakterize DNA hasarlarının *by-pass*'ında DNA polimeraz η 'nın önemli rol oynadığı belirtilmektedir (130). Translezyon DNA sentezinin artışının sisplatin direnci gelişiminde rol oynadığına yönelik pek çok çalışma bulunmaktadır (128, 129). Bu da DNA polimeraz η 'nın inhibisyonunun sisplatin duyarlılığını arttırabileceği, aynı etkiyi oluşturmak için kullanılan sisplatin dozunu azaltabileceği düşüncesini beraberinde getirmektedir. Translezyon polimerazları replikasyonun gerçekleştiği hızlı çoğalan hücrelerde aktif olarak çalıştığı için, inhibisyonu özellikle kanserli hücreleri hedefleyerek etkisini gösterebilir.

Zafaar MK ve arkadaşları tarafından DNA polimeraz η inhibitörü olarak tanımlanan PNR-7-02, indol tiyobarbütirik asit derivativesi olan küçük bir moleküldür. Aynı araştırmacı grubu tarafından hücre içindeki davranış özellikleri ve etki mekanizması

tanımlanmış, ayrıca HAP-1 hücre hatlarında sisplatin sensitivitesini arttırdığı belirtilmiştir. PNR-7-02, DNA polimeraz η 'nın DNA'ya bağlanmasını engellememekte, ancak artan dozla birlikte enzimin dNTP'ye olan afinitesini azaltmaktadır. Molekülün DNA Pol η için kısmi kompetitif bir inhibitör olarak işlev gördüğü belirlenmiş, Y ailesine ait diğer polimerazlar üzerinde de etkin olduğu gösterilmiştir. Literatürde PNR-7-02 ile ilgili çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. MCF-7 hücre hatlarındaki etkisini araştıran bir çalışmaya ise rastlanılamamıştır.

Bu çalışmada, meme kanseri hücre hatlarında;

1. Sisplatin uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin gösterilmesi,
2. Sisplatin ile DNA polimeraz η inhibitörü PNR-7-02'nin birlikte uygulanmasının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin araştırılması ve bu etkinin yalnızca sisplatinin verildiği hücrelerdeki etki ile karşılaştırılması,
3. Kombine uygulamanın etki şeklinin, sisplatin dozunu azaltabilme potansiyelinin değerlendirilmesi,
4. Sisplatin \pm PNR-7-02 uygulamasının DNA Pol η ve DDB2 gen ve protein ifadenmesi üzerinden değerlendirilmesi planlanmıştır.

DDB2 ve Pol η 'nın protein ifadenmesi için temin edilen antikorun çalışmaması nedeniyle bu aşamada yalnızca gen ifadenme çalışmaları gerçekleştirilebilmiştir.

Meme kanseri hücre hatlarından insan epitelyal adenokanser MCF-7 hücrelerinin diğer hücrelere göre göreceli olarak dirençli olduğu belirtilmektedir (141). Bu çalışmada da MCF-7 hücreleri kullanılmıştır. MCF-7 hücreleri invaziv duktal tipte, luminal epitelyal fenotip gösteren, ER ve PR pozitif, HER2 ekspresyonu göstermeyen adenokanser hücre hatlarıdır (145).

Lerner KL ve ark. melanom hücrelerinde 12,5 μ M sisplatin uygulaması sonrasında Pol η protein ekspresyonunu 24. saatte yüksek bulmuşlardır (115). Verileri, 48. saatte de Pol η ekspresyonunun bulunduğunu göstermektedir. Ultraviyole tarafından indüklenmiş ışın ürünleri, aynı sisplatin tarafından indüklenmiş DNA hasarları gibi NER'in önemli

substratlarıdır. Araştırmacılar, UV ışığa maruz kalmış farklı hücre tiplerinde de ekspresyon paterninin benzer olduğunu belirtmişlerdir. UV maruziyeti sonrası 0. ve 6. saate göre DDB2 gen ekspresyonunun normal fibroblastlarda ve DNA Pol η yoksun XPV hücrelerinde 24. saatte çok anlamlı yüksek olduğunu, daha sonra da azalmaya başladığını ortaya koymuşlardır. Ultraviyole ışık maruziyeti sonrası Pol η protein ekspresyonunun da 24. saatte anlamlı derecede yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (115). Bu çalışma, her ne kadar MCF-7 hücreleri kullanılmamış olsa da farklı hücre hatlarının kullanıldığı durumlarda da Pol η ve DDB2 ifadenmesinin benzer bir patern gösterebileceği konusunda fikir vermektedir. Literatürde PNR-7-02 ile gerçekleştirilen sınırlı çalışma bulunmaktadır. Zafaar ve arkadaşları PNR-7-2 ile yaptıkları çalışmada PNR-7-02 uygulama süresini 24 ve 48 saat olarak belirtmişlerdir (130). Bizim çalışmamızda da yukarıdaki bütün verilere paralel olarak, ilaç uygulamaları için 24 saat ve 48 saat, bazı deneylerde de 72 saatlik inkübasyon süreleri kullanılmasına karar verildi.

Hücre canlılık deneylerinde, MCF-7 hücreleri ekildikten sonra hücrelerin yapışması için 24 saat beklendikten sonra ilaç uygulamaları gerçekleştirildi. Artan dozlarda sisplatin ya da PNR-7-02 uygulandı. Hücreler 24, 48, 72 saat süreyle bu şekilde inkübe edildi. Takiben hücre canlılıkları MTT yöntemi ile ölçüldü. Elde edilen veriler ile GraphPad Prism 8 yazılımı kullanılarak sisplatin ve PNR-7-02 için IC50 değerleri hesaplandığında (Tablo 4.1) her iki molekül için de uygulama süresi arttıkça IC50 değerlerinin azaldığı gözlemlendi. Sisplatin için hesaplanan %50 inhibisyon yapan derişim 24, 48 ve 72 saat için sırasıyla $21,5 \pm 1,1 \mu\text{M}$, $13,2 \pm 1,0 \mu\text{M}$, $8,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$ 'dir. PNR-7-02 için ise IC50 değerleri sırası ile $18,2 \pm 1,1 \mu\text{M}$, $12,8 \pm 1,1 \mu\text{M}$, $7,7 \pm 1,1 \mu\text{M}$ olarak hesaplandı.

Literatürde MCF-7 hücrelerinde sisplatin için hesaplanmış IC50 değerleri ile bizim bulduğumuz değerleri karşılaştırdığımızda, benzerlik gösteren değerler yanında farklılık gösteren değerlerle de karşılaşıldı. Leon-Galicia I ve ark., sisplatine 48 saat süre ile maruz bırakılmış MCF-7 hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak hücre canlılığını ölçmüşler ve IC50 değerini $11,91 \mu\text{M}$ olarak hesaplamışlardır (146). Bu değer, bizim bulduğumuz değer

olan 13,1 μM ile benzerlik göstermektedir. Jou ve ark. 1-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sisplatin ile 48 saat süreyle inkübe ettikleri MCF-7 hücrelerine 1 saat süre ile CCK-8 ile muamele ederek 450nm'de ölçüm yapmış, IC50 değerini de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\sim 13 \mu\text{M}$) olarak rapor etmişlerdir (147). Suberu JO ve ark ise hücrelerin ekiminden sonra 48 saat beklemiş, sisplatin uygulamasını 24 saat süreyle gerçekleştirmiş, ilaç hücrelerden uzaklaştırıldıktan sonra 48 saat süre kendini toparlaması için bekledikten sonra SRB deneyi ile sisplatin için IC50 değerini $5,75 \pm 0,02 \mu\text{M}$ olarak hesaplamışlardır (148). Farklı sonuçların deney koşullarındaki ölçüm yöntemlerindeki farklılıklardan (ilaç uygulaması öncesi bekleme süresi, ilaçla inkübasyonun belirli bir süre gerçekleştirilip daha sonra besiyeri değiştirilerek bir süre daha beklenmesi, kullanılan hücre sayısı vb.) kaynaklanabileceği düşünüldü. MCF-7 hücrelerinde PNR-7-02 için IC50 değerlerini hesaplayan bir çalışmaya ise literatürde rastlanılmadı.

Her iki molekül için proliferasyonu %50 inhibe eden derişimler hesaplandıktan sonra birlikte uygulandıklarında hücre canlılığına ne tür bir etki oluşturacakları araştırıldı. Bu amaçla Chou-Thalalay yöntemi kulanıldı. Bu yöntem, birden fazla ilaç uygulamasında, oluşan etkinin ne tür (sinerjik, aditif, antagonistik) olduğu yönünde bilgi vermektedir. Elde edilen hücre canlılık verilerinin CompuSyn yazılımına girilmesi ile bilgisayar temelli simülasyonla ilaç kombinasyon indekslerinin (CI), ilaç doz azaltım indekslerinin (DRI) hesaplanması mümkün olmaktadır. Çalışmamızda PNR-7-02 uygulaması, Zafar ve arkadaşlarının uyguladığı şekilde sisplatin ile aynı anda verildi ve inkübasyon süresi bitiminden hemen sonra %hücre canlılığı MTT yöntemi ile ölçüldü. CompuSyn yazılımı yardımı ile 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için CI ve DRI hesaplamaları yapıldığında PNR-7-02'nin daha düşük sisplatin dozlarında (24 saat için 36,9 μM sisplatin derişimine ve Fa 0,65'e kadar, 48 saat için 16,3 μM sisplatin derişimine ve Fa 0,70'e kadar) % hücre canlılığını azaltma yönünde sinerjistik bir etki gösterdiği, sinerjistik etkinin sisplatin dozu arttıkça azaldığı hesaplandı. Daha yüksek dozlarda ise antagonist bir etkinin görüleceği hesaplandı. Benzer şekilde DRI verileri incelendiğinde düşük dozlarda sisplatin için doz

azaltıcı indeks değerlerinin her iki inkübasyon süresi için de daha yüksek olduğu, kullanılması gereken sisplatin dozu arttıkça DRI değerinin azaldığı hesaplandı. DRI değerinin yüksek olması, aynı etkiyi elde etmek için kullanılacak sisplatin dozunun azaltılabilesinin göstergesidir. DRI verileri de 24 saat için 46,1 uM, 48 saat için ise 17,9 µM sisplatin dozuna kadar sisplatin dozunun azaltılabileceğini öngörmektedir.

Sisplatin ve PNR-7-02 kombine uygulamasının etkilerinin CompuSyn ile hesaplanmasından sonra, bu etkiler deneysel olarak araştırıldı. Sisplatin ve PNR-7-02 için GraphPad 8 yazılımıyla hesaplanan IC50 değerlerine eşit derişimlerde tek ve kombine uygulama gerçekleştirildiğinde, hem 24 saat hem de 48 saatlik inkübasyon süresi için, sisplatinin tek olarak uygulanmasına kıyasla kombine uygulamada hücre canlılığının daha fazla etkilendiği, bu azalmanın da tek başına sisplatin uygulaması ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Yirmi dört saatlik uygulamada 21,5 µM sisplatin için % hücre canlılığı $49,5 \pm 8,4$, 18,1 µM, PNR-7-02 için $39,1 \pm 2,5$ bu ikisinin kombine uygulaması için de $27,5 \pm 2,3$ olarak bulundu (n=4). Tek başına sisplatin uygulanması durumuna göre kombine uygulamada hücre canlılığının anlamlı olarak azaldığı saptandı (p<0,01). Kırk sekiz saatlik uygulamada 13 µM sisplatin için % hücre canlılığı $61,8 \pm 2,5$, 12,8 µM PNR-7-02 için $43,5 \pm 2,0$ bu ikisinin kombine uygulaması için de $27,1 \pm 0,8$ olarak bulundu. Tek başına sisplatin uygulanması durumuna göre kombine uygulamada -24 saatlik uygulamada olduğu gibi- hücre canlılığının anlamlı olarak azaldığı saptandı (p<0,005) Bu sonuçlar, deneysel olarak da PNR-7-02'nin sisplatinin hücre proliferasyonunu azaltıcı etkisini arttırdığını desteklemektedir.

Çalışmada, tek başına sisplatin ve tek başına PNR-7-02 için büyümede %50 inhibisyon olmasını beklediğimiz dozlarda ilaç uygulanmasına rağmen 48 saatlik uygulama süresinde sisplatin için beklenenden daha az, PNR-7-02 için ise daha fazla inhibisyon olduğu dikkatimizi çekti. CompuSyn'de hesaplanan IC50 değerleri ile GraphPad ile hesaplanandan az da olsa farklılık göstermesinde, GraphPad'de elde

ettiğimiz sonuçların %95 güvenilirlik aralığında belli bir değer aralığında bulunabilmesi, deneysel faktörler vb. faktörlerin rol oynayabileceği düşünüldü.

Çalışmada, son olarak sisplatinin PNR-7-02 ile birlikte uygulanmasının sisplatinin indüklediği DNA hasarlarını onaran mekanizmada rol alan DDB2'nin ve bu hasarlara tolerans mekanizmada esansiyel olan Pol η 'nın ait genlerinin ifadelenmeleri üzerine etkisi incelendi. Yukarıda bahsedilen IC50 derişimine eş dozlarda ilaç uygulaması tek ya da kombine olarak uygulandıktan sonra RT-PCR ile gen ekspresyonları incelendi. 24 saatlik inkübasyon süresi için 21,5 μ M sisplatin uygulamasının DDB2 ekspresyonunu kontrol grubuna göre 6,5 kat, 18,2 μ M PNR-7-02 uygulanmasının 1,8 kat, her ikisinin kombine uygulanmasının da 1,2 Kat arttırdığı bulundu. Pol η gen ekspresyonlarının ise sırasıyla 4 kat (sisplatin), 1,3 kat (PNR-7-02) ve 1,3 kat arttığı saptandı. Hücrelere 48 saat süreyle ilaç uygulandığında 13 μ M sisplatin uygulamasının DDB2 ekspresyonunu kontrol grubuna göre 7,8 kat, 12,8 μ M PNR-7-02 uygulanmasının 1,7 kat, her ikisinin kombine uygulanmasının da 2,4 kat arttırdığı bulundu. Pol η gen ekspresyonlarının ise aynı inkübasyon süresi için sırasıyla 8,9 kat (sisplatin), 4,4 kat (PNR-7-02) ve 6,5 kat arttığı bulundu.

Sisplatin tarafından indüklenmiş zincir içi DNA eklentileri hücrede NER mekanizmasını aktive eder. DDB2 bu yolda *in vivo* etkisi gösterilmiş multifonksiyonel bir proteindir. Bu tür DNA hasarlarına bir diğer yanıt da DNA Pol η 'nın önemli rol oynadığı TLS'dir. Hasar NER ile onarılırsa (hatadan yoksun DNA hasar yanıtı), ya da TLS ile *bypass* edilerek replikasyonun devamlılığı sağlanırsa (hataya açık yanıt) bu durumda hücre canlılığı devam edebilir. Her iki yol da p53 bağımlı olarak işlev görmektedir. Tümör baskılayıcı bir protein olan p53 sisplatin tarafından indüklenen DNA hasar yanıtında da sinyal *transduceri* olarak rol alır (66). Hem DNA polimeraz eta hem de DDB2 genlerinin promotör bölgelerinde p53 yanıt elemanları bulunur. Bu bölgelere p53'ün bağlanması bu genlerin transkripsiyonlarını aktive eder (149). DDB2 de p53'ün kararlılığında düzenleyici rol oynar (114). BRCA1 de DDB2'nin aktivasyonunda rol oynayan bir diğer proteindir

(112). Çalışmamızda kullanılan MCF-7 hücre hatlarında p53 ya da BRCA1 mutasyonu bulunmamakta ve her ikisinin gen ürünleri de etkin olarak çalışmaktadır. Sisplatinin hem 24 hem de 48 saat süre ile tek başına uygulanması sonrası DDB2 ve Pol η 'nın gen ifadelenmelerinde artış gözlenmesi, önceki çalışmalara paralel şekilde oluşan bu yanıtın p53 bağımlı bir mekanizma ile gerçekleşmiş olduğunu desteklemektedir.

PNR-7-02, DNA polimeraz eta için kısmi bir kompetitif inhibitör olarak tanımlanmıştır. İnhibitör, DNA polimeraz eta'nın DNA'ya bağlanmasını engellemekle birlikte enzimin işlevini görmesini önlemesi dolayısıyla etkisini göstermektedir. PNR-7-02'nin tek başına uygulanması sonrası DDB2 ve Pol η gen ekspresyonlarında sisplatin uygulamasına göre daha ılımlı bir artış saptanmıştır. Hücrede sisplatin gibi genotoksik bir ajan bulunmadığı durumda da DNA hasarları oluşabilir. Bu nedenle, eksojen bir uyarı bulunmadığı durumlarda da TLS gerçekleşebilir ve belli bir miktar DNA Pol η 'ya ihtiyaç bulunur. PNR-7-02 uygulanması TLS'nin gerçekleşmesini engellediğinden hücre bunu Pol η gen ekspresyonunu arttırarak kompanse etmeye çalışıyor olabilir. Bir diğer olasılık da bu artışın, ortamdaki inhibitörün yaratabileceği inhibisyonun azaltılmaya çalışılmasından kaynaklanabilmesidir. PNR-7-02 uygulaması sonrası sisplatin uygulamasına göre her iki inkübasyon süresinde DDB2 gen ekspresyonu da kontrole göre yüksek bulundu. Bu da DDB2'nin NER dışında olası işlevlerinin bulunduğunu destekleyici olarak değerlendirildi.

Gen ekspresyon analizlerinde ilgi çekici bir nokta da sisplatin ve PNR-7-02 birlikte uygulandığında hem DDB2 hem de Pol η gen ekspresyonları artışı gözlenmesine rağmen, % artışın tek başına sisplatin uygulamasına göre daha düşük olmasıdır. Sisplatinle birlikte PNR-7-02 uygulandığında, ortamda yeterli Pol η bulunmakla birlikte, hasar toleransı gerçekleşmemektedir. Bugüne kadar literatürden edindiğimiz bilgiler, DNA hasarı ortamda bulunmaya devam ettiği için hasar sinyalinin devam ettiği, hasar toleransını gerçekleştirecek Pol η gen ekspresyonunun daha da artabileceğini

düşündürmektedir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, kombine uygulamada daha kompleks bir DNA hasar yanıtı oluşuyor olabileceğini düşündürmüştür.

Gen ekspresyon çalışmalarında dikkatimizi çeken bir diğer nokta da sisplatin uygulanması ve kombine uygulamada (PNR-7-02'nin tek başına uygulandığı durum hariç) her iki gen ekspresyonunun da 48 saat ilaç uygulaması için 24 saate göre % kat değişim olarak daha fazla arttığıdır. Farklı inkübasyon süreleri (24 ve 48 saat) için IC50'lere uygun sisplatin ve PNR-7-02 uygulanması gerçekleştirildiğinden bu değerlendirme yanıltıcı olabilir. Ek deneylerle sonuçlarımızın doğrulanması uygun olabilir.

Lerner KL ve ark. farklı hücre hatlarında yaptıkları çalışmada DDB2 ve Pol η gen ekspresyonunun 24 saatte en belirgin artış gösterdiğini, daha sonra azaldığını rapor etmişlerdir (115). Aleksandrov ve ark. HeLa Kyoto hücrelerine UV-lazer uygulaması sonrası hasar bölgesine ilk giden NER proteinlerinin DDB2 ve XPC olduğunu, ilgi çekici şekilde DDB2'nin DDB heterodimerinde partneri olan ve ubiquitinleme/otoubikitinlenmesi için Cullin 4A ile birlikte işlev gören DDB1'in daha geç olarak bölgeye ulaştığını, ondan bir süre sonra da POLH'nın bu bölgeye geldiğini göstermişlerdir (150). Her ne kadar hasar bölgesine gidiş sırasını saniyeler düzeyinde ölçmüş ve modellemiş olsalar da her iki gen için ekspresyon düzeylerinde de böyle bir korelasyon olup olmadığını gösteren detaylı bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda her bir koşul 3-4 kez tekrar edilerek ortalamaları alınmış ve verilerimiz elde edilmiş olmakla birlikte kit kısıtlılığımız nedeniyle gen ekspresyon deneylerinin tekrarı yapılamamıştır. Malzeme temin edilebilirse gen ekspresyonunun zamana bağlı değişimi ve kombine uygulama durumundaki değişikliklerin tekrarının yapılması planlanmaktadır.

Elde ettiğimiz sonuçlar gen ekspresyon düzeyindedir ve protein düzeyindeki değişimleri yansıtmayabilir. Çalışma planlanırken protein ekspresyon analizlerinin yapılması planlanmış, ancak antikorumuzun çalışmaması nedeniyle gerçekleştirilememiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında sisplatin ve PNR-7-02'nin tek tek ve kombine şekilde MCF-7 meme kanseri hücrelerine verilmesinin hücre canlılığı üzerine etkisi, DDB2 ve POLH gen ifadelerinin değişimleri incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler de aşağıda değerlendirilmiştir:

- MCF-7 hücrelerine farklı dozlarda (0 – 64 μM) ve sürelerde (24, 48 ve 72 Saat) sisplatin uygulanarak, sisplatinin IC50 değerleri (%95 güven aralığı ile birlikte) 24, 48 ve 72 saat için sırasıyla; 21,46 μM (18,11 μM - 25,71 μM), 13,15 μM (12,51 μM - 13,86 μM) ve 8,07 μM (7,31 μM - 8,92 μM) olarak hesaplanmıştır.
- MCF-7 hücrelerine farklı dozlarda (0 – 64 μM) ve sürelerde (24, 48 ve 72 Saat) PNR-7-02 uygulanarak, PNR-7-02'nin IC50 değerleri (%95 güven aralığı ile birlikte) 24, 48 ve 72 saat için sırasıyla; 18,17 μM (15,34 μM - 21,88 μM), 12,83 μM (11,18 μM - 14,82 μM) ve 7,65 μM (6,98 μM - 8,38 μM) olarak hesaplanmıştır.
- 24 ve 48 saatlik IC50 değerlerinde kombine ilaç uygulamasının hücre canlılığını tek başına sisplatin uygulamasına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı (24 saat için $p < 0,01$, 48 saat için $p < 0,005$) Kruskal-Wallis yöntemi ile non-parametrik olarak hesaplanmıştır.
- Chou-Talalay yöntemi ile sisplatin ve PNR-7-02 kombinasyonunun IC50 değerine uygun bir şekilde uygulandığında (24 ve 48 saat için) MCF-7 hücre canlılığı üzerinde gözlenen etkisinin sinerjistik bir etkileşimden kaynaklandığı gösterilmiştir.
- IC50 değerlerinde tek olarak ve kombine olarak verilen sisplatin ve PNR-7-02'nin MCF-7 hücre hatlarındaki 24 saatlik inkübasyon süresi için 21,5 μM sisplatin uygulamasının DDB2 ekspresyonunu kontrol grubuna göre 6,5 kat, 18,2 μM PNR-7-02 uygulanmasının 1,8 kat, kombine uygulamada ise 1,2 kat arttırdığı

bulunmuştur. POLH gen ekspresyonlarının da 24 saatlik inkübasyon süreleri için sisplatin uygulamasında 4 kat, PNR-7-02 uygulamasında 1,3 kat ve kombine uygulamada da 1,3 kat arttığı bulunmuştur. 48 saat süreyle ilaç uygulandığında 13 μ M sisplatin uygulamasının DDB2 ekspresyonunu kontrol grubuna göre 7,8 kat, 12,8 μ M PNR-7-02 uygulanmasının 1,7 kat, her ikisinin kombine uygulanmasının da 2,4 kat arttırdığı saptanmıştır. Pol η gen ekspresyonlarının ise aynı inkübasyon süresi için sırasıyla 8,9 kat (sisplatin), 4,4 kat (PNR-7-02) ve 6,5 kat arttığı bulunmuştur.

Bulgularımız PNR-7-02 ile sisplatin uygulamasının uygulanan doza bağlı olarak hücre canlılığı üzerinde sinerjik bir etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Proliferasyonun yaklaşık %50 inhibe edilmesinin beklendiği sisplatin derişimlerinde 24 ve 48 saat süre ile bu ilacın uygulanmasının hücre canlılığını azalttığı, DDB2 ve Pol η gen ekspresyonlarını arttırdığı gözlenmiştir. PNR-7-02'nin de IC50'sine uygun dozlarda MCF-7 hücrelerine uygulanması hücre canlılığını azaltmış, sisplatine göre IC50 değerleri hem 24 saat hem de 48 saat için DDB2 ve Pol η ifadelenmesini -sisplatine göre daha ılımlı olmakla birlikte azaltmıştır. Kombine uygulamada ise bu iki gen ifadelenmesinde artış gözlenmiş, kat değişiminin tek başına PNR-7-02 için elde edilen değerlere daha yakın olduğu belirlenmiştir. Aynı ilaç dozlarının kombine uygulanmasının % hücre canlılığı üzerine etkisi ise (24 ve 48 saat uygulama için) sisplatinin oluşturduğu etkiden istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, MCF-7 hücrelerinin doz bağımlı olmakla birlikte sisplatin duyarlılığını arttırıcı etkisinin bulunduğunu göstermektedir. Ancak, bu etkinin detaylı araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yakın gelecekte, malzeme temin edilerek gen ve protein analizlerinin gerçekleştirilmesi planlanmaktadır. DDB2 ekspresyonunun (PNR-7-02'nin tek ya da kombine verildiği durumlarda) artışının TLS'den kaynaklanıp kaynaklanmadığının araştırılması için diğer GG-NER faktörleri (örneğin XPC) ile DDB2 ekspresyonunun paralel olup olmadığı, DDB2 ve Pol η ekspresyonu artışının p53

ve BRCA1 ile ilişkili olduğunu doğrulama yönünde deney planının ayrı bir araştırma konusu olarak planlanması düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Cancer. 2021 [Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>].
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
3. Lumachi F, Brunello A, Maruzzo M, Basso U, Basso MMS. Treatment of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Current Medicinal Chemistry*. 2013;20(5):596-604.
4. Lumachi F, Luisetto G, Basso SM, Basso U, Brunello A, Camozzi V. Endocrine therapy of breast cancer. *Curr Med Chem*. 2011;18(4):513-22.
5. Chu EDVT. Physicians' cancer chemotherapy drug manual 2019. 2019.
6. Katzung BG, Kruidering-Hall M, Trevor AJ. *Cancer Chemotherapy. Katzung & Trevor's Pharmacology: Examination & Board Review*, 12e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2019.
7. Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Pérez JM. Novel concepts in the development of platinum antitumor drugs. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2002;2(4):539-51.
8. Reedijk J, Poepelmeier K. *Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition): From Elements to Applications* 2013. 1-7196 p.
9. Rocha CRR, Silva MM, Quinet A, Cabral-Neto JB, Menck CFM. DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics (Sao Paulo)*. 2018;73(suppl 1):e478s-es.
10. Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M, Chen ZS, Terada K, Furukawa T, et al. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res*. 2000;60(5):1312-6.
11. Nakayama K, Kanzaki A, Terada K, Mutoh M, Ogawa K, Sugiyama T, et al. Prognostic value of the Cu-transporting ATPase in ovarian carcinoma patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2004;10(8):2804-11.
12. Howell SB, Safaei R, Larson CA, Sailor MJ. Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Mol Pharmacol*. 2010;77(6):887-94.
13. Kasahara K, Fujiwara Y, Nishio K, Ohmori T, Sugimoto Y, Komiya K, et al. Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer Res*. 1991;51(12):3237-42.
14. Lai GM, Ozols RF, Smyth JF, Young RC, Hamilton TC. Enhanced DNA repair and resistance to cisplatin in human ovarian cancer. *Biochem Pharmacol*. 1988;37(24):4597-600.
15. Reardon JT, Sancar A. Nucleotide excision repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2005;79:183-235.
16. Xie K, Doles J, Hemann MT, Walker GC. Error-prone translesion synthesis mediates acquired chemoresistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(48):20792-7.
17. Srivastava AK, Han C, Zhao R, Cui T, Dai Y, Mao C, et al. Enhanced expression of DNA polymerase eta contributes to cisplatin resistance of ovarian cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(14):4411-6.

18. Cohen SM, Lippard SJ. Cisplatin: From DNA damage to cancer chemotherapy. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 67: Academic Press; 2001. p. 93-130.
19. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*. 2004;73(1):39-85.
20. Mechanism of Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *DNA Repair and Mutagenesis* 2005. p. 317-50.
21. Kulaksız G, Reardon JT, Sancar A. Xeroderma Pigmentosum Complementation Group E Protein (XPE/DDB2): Purification of Various Complexes of XPE and Analyses of Their Damaged DNA Binding and Putative DNA Repair Properties. *Molecular and Cellular Biology*. 2005;25(22):9784-92.
22. Alekseev S, Luijsterburg MS, Pines A, Geverts B, Mari P-O, Giglia-Mari G, et al. Cellular Concentrations of DDB2 Regulate Dynamic Binding of DDB1 at UV-Induced DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*. 2008;28(24):7402-13.
23. Hayes S, Shiyonov P, Chen X, Raychaudhuri P. DDB, a putative DNA repair protein, can function as a transcriptional partner of E2F1. *Mol Cell Biol*. 1998;18(1):240-9.
24. Itoh T, Linn S, Ono T, Yamaizumi M. Reinvestigation of the classification of five cell strains of xeroderma pigmentosum group E with reclassification of three of them. *J Invest Dermatol*. 2000;114(5):1022-9.
25. Datta A, Bagchi S, Nag A, Shiyonov P, Adami GR, Yoon T, et al. The p48 subunit of the damaged-DNA binding protein DDB associates with the CBP/p300 family of histone acetyltransferase. *Mutat Res*. 2001;486(2):89-97.
26. Gilson P, Drouot G, Witz A, Merlin J-L, Becuwe P, Harlé A. Emerging Roles of DDB2 in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20):5168.
27. Vaisman A, McDonald JP, Woodgate R. Translesion DNA Synthesis. *EcoSal Plus*. 2012;5(1):10.1128/ecosalplus.7.2.2.
28. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. *Cancer Statistics, 2021*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021;71(1):7-33.
29. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Ninth edition. ed. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, editors. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2015.
30. Compton C. *Cancer: The Enemy from Within: A Comprehensive Textbook of Cancer's Causes, Complexities and Consequences* 2020.
31. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-49.
32. Brunnicardi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Kao LS, Hunter JG, et al. *Schwartz's Principles of Surgery, 11e*. Schwartz's Principles of Surgery, 11e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2019.
33. Spicer DV, Pike MC. Chapter 5 - Risk Factors for Development of Breast Cancer. In: Roses DF, editor. *Breast Cancer (Second Edition)*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005. p. 49-57.
34. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol*. 2015;26(7):1291-9.
35. Singletary SE, Connolly JL. Breast Cancer Staging: Working With the Sixth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2006;56(1):37-47.

36. Jhan JR, Andrechek ER. Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy. *Pharmacogenomics*. 2017;18(17):1595-609.
37. Eliyatkin N, Yalçın E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *J Breast Health*. 2015;11(2):59-66.
38. WHO Classification of Tumours Editorial Board. WHO Classification of Breast Tumours. 5th ed: World Health Organization; 2019.
39. Fahad Ullah M. Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status. In: Ahmad A, editor. *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance: Challenges and Progress*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 51-64.
40. Pfeifer MLC, Christopher. *Breast Cancer Surgery* [Text]. StatPearls Publishing; 2021 [updated 2021/09/14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>].
41. Hennequin C, Barillot I, Azria D, Belkacémi Y, Bollet M, Chauvet B, et al. [Radiotherapy of breast cancer]. *Cancer Radiother*. 2016;20 Suppl:S139-46.
42. Estrogen Receptor Antagonist, ICI 182,780 - CAS 129453-61-8 - Calbiochem | 531042 2021 [Available from: https://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/Estrogen-Receptor-Antagonist-ICI-182780-CAS-129453-61-8-Calbiochem,EMD_BIO-531042].
43. Tong CWS, Wu M, Cho WCS, To KKW. Recent Advances in the Treatment of Breast Cancer. *Front Oncol*. 2018;8:227.
44. Pondé NF, Zardavas D, Piccart M. Progress in adjuvant systemic therapy for breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(1):27-44.
45. Redden MH, Fuhrman GM. Neoadjuvant chemotherapy in the treatment of breast cancer. *Surg Clin North Am*. 2013;93(2):493-9.
46. Chu CS, Rubin SC. 17 - Basic Principles of Chemotherapy. In: DiSaia PJ, Creasman WT, Mannel RS, McMeekin DS, Mutch DG, editors. *Clinical Gynecologic Oncology (Ninth Edition)*: Elsevier; 2018. p. 449-69.e2.
47. Breast Cancer Treatment (Adult) (PDQ®)—Health Professional Version 2021 [updated 10/08/2021 - 08:00. Available from: <https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-treatment-pdq>].
48. Hudis CA, Norton L. Chapter 27 - Systemic Treatment for Stage I and Stage II Breast Cancer. In: Roses DF, editor. *Breast Cancer (Second Edition)*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005. p. 537-55.
49. Gottlieb JA, Drewinko B. Review of the current clinical status of platinum coordination complexes in cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Rep*. 1975;59(3):621-8.
50. Smith I, Talbot D. Cisplatin and its analogues in the treatment of advanced breast cancer: a review. *British Journal of Cancer*. 1992;65(6):787-93.
51. Sledge GW, Jr. Cisplatin and platinum analogues in breast cancer. *Semin Oncol*. 1992;19(1 Suppl 2):78-82.
52. Forastiere AA, Hakes TB, Wittes JT, Wittes RE. Cisplatin in the treatment of metastatic breast carcinoma A prospective randomized trial of two dosage schedules. *American Journal of Clinical Oncology*. 1982;5(3).
53. Jurga L, Misurová E, Kovác V, Sevcíková L. The role of cisplatin in chemotherapy of advanced breast cancer. *Neoplasma*. 1994;41(6):347-52.

54. Decatris MP, Sundar S, O'Byrne KJ. Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status. *Cancer Treatment Reviews*. 2004;30(1):53-81.
55. The "Accidental" Cure—Platinum-based Treatment for Cancer: The Discovery of Cisplatin 2014 [updated 05/30/2014 - 08:00. Available from: <https://www.cancer.gov/research/progress/discovery/cisplatin>.
56. Petrelli F, Barni S, Bregni G, de Braud F, Di Cosimo S. Platinum salts in advanced breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;160(3):425-37.
57. Hill DP, Harper A, Malcolm J, McAndrews MS, Mockus SM, Patterson SE, et al. Cisplatin-resistant triple-negative breast cancer subtypes: multiple mechanisms of resistance. *BMC Cancer*. 2019;19(1).
58. Baek DW, Park J-Y, Lee SJ, Chae YS. Impressive effect of cisplatin monotherapy on a patient with heavily pretreated triple-negative breast cancer with poor performance. *Yeungnam Univ J Med*. 2020;37(3):230-5.
59. Cisplatin 2021 [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cisplatin>.
60. cis-Diaminedichloroplatinum 2021 [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2767>.
61. Ott I. Biodistribution of Metals and Metallodrugs. Elsevier; 2013. p. 933-49.
62. Manohar S, Leung N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *Journal of Nephrology*. 2018;31(1):15-25.
63. Ott I. 3.32 - Biodistribution of Metals and Metallodrugs. In: Reedijk J, Poepelmeier K, editors. *Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition)*. Amsterdam: Elsevier; 2013. p. 933-49.
64. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:364-78.
65. Fuertes AM, Castilla J, Alonso C, Perez MJ. Novel Concepts in the Development of Platinum Antitumor Drugs. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*. 2002;2(4):539-51.
66. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7265-79.
67. Zhu S, Pabla N, Tang C, He L, Dong Z. DNA damage response in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Arch Toxicol*. 2015;89(12):2197-205.
68. Kulaksiz Erkmen G, Sancar A. Nükleotid eksizyon onarımı ve kanser. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2007;32(3):104-11.
69. Kiss RC, Xia F, Acklin S. Targeting DNA Damage Response and Repair to Enhance Therapeutic Index in Cisplatin-Based Cancer Treatment. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15).
70. Correcting Altered Bases in DNA: DNA Repair. *DNA Repair and Mutagenesis2005*. p. 107-.
71. Reversal of Base Damage Caused by UV Radiation. *DNA Repair and Mutagenesis2005*. p. 109-38.
72. Reversal of Alkylation Damage in DNA. *DNA Repair and Mutagenesis2005*. p. 139-68.
73. Base Excision Repair. *DNA Repair and Mutagenesis2005*. p. 169-226.
74. Mismatch Repair. *DNA Repair and Mutagenesis2005*. p. 389-447.

75. Coste F, Malinge JM, Serre L, Shepard W, Roth M, Leng M, et al. Crystal structure of a double-stranded DNA containing a cisplatin interstrand cross-link at 1.63 Å resolution: hydration at the platinated site. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(8):1837-46.
76. Slysokova J, Sabatella M, Ribeiro-Silva C, Stok C, Theil AF, Vermeulen W, et al. Base and nucleotide excision repair facilitate resolution of platinum drugs-induced transcription blockage. *Nucleic Acids Research.* 2018;46(18):9537-49.
77. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews.* 2007;33(1):9-23.
78. Brozovic A, Ambriović-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol.* 2010;40(4):347-59.
79. Baiken Y, Kanayeva D, Taipakova S, Groisman R, Ishchenko AA, Begimbetova D, et al. Role of Base Excision Repair Pathway in the Processing of Complex DNA Damage Generated by Oxidative Stress and Anticancer Drugs. *Front Cell Dev Biol.* 2021;8:617884-.
80. Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol.* 1998;8(12):483-9.
81. Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst).* 2008;7(10):1765-71.
82. Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001;411(6835):366-74.
83. Zhang CX, Chang PV, Lippard SJ. Identification of nuclear proteins that interact with platinum-modified DNA by photoaffinity labeling. *J Am Chem Soc.* 2004;126(21):6536-7.
84. Liu Y, Zhang Z, Zhang L, Zhong Z. Cytoplasmic APE1 promotes resistance response in osteosarcoma patients with cisplatin treatment. *Cell Biochemistry and Function.* 2020;38(2):195-203.
85. Mathiasen DP, Lisby M. Cell cycle regulation of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews.* 2014;38(2):172-84.
86. Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle.* 2008;7(18):2902-6.
87. Managing DNA Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *DNA Repair and Mutagenesis 2005.* p. 663-710.
88. Zannini L, Delia D, Buscemi G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *Journal of Molecular Cell Biology.* 2014;6(6):442-57.
89. Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science.* 1999;286(5442):1162-6.
90. RAAPHORST GP, LEBLANC J-M, LI LF. A Comparison of Response to Cisplatin, Radiation and Combined Treatment for Cells Deficient in Recombination Repair Pathways. *Anticancer Research.* 2005;25(1A):53-8.
91. Managing DNA Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *DNA Repair and Mutagenesis 2005.* p. 711-50.
92. Ma Q, Li P, Xu M, Yin J, Su Z, Li W, et al. Ku80 is highly expressed in lung adenocarcinoma and promotes cisplatin resistance. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2012;31(1):99.

93. Topping R, Wilkinson J, Scarpinato K. Mismatch Repair Protein Deficiency Compromises Cisplatin-induced Apoptotic Signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284:14029-39.
94. Zhu J, Ke G, Bi R, Wu X. Clinicopathological and survival characteristic of mismatch repair status in ovarian clear cell carcinoma. *Journal of Surgical Oncology*. 2020;122(3):538-46.
95. Ding X, Mohd AB, Huang Z, Baba T, Bernardini MQ, Lysterly HK, et al. MLH1 expression sensitises ovarian cancer cells to cell death mediated by XIAP inhibition. *British Journal of Cancer*. 2009;101(2):269-77.
96. Hu J, Selby CP, Adar S, Adebali O, Sancar A. Molecular mechanisms and genomic maps of DNA excision repair in *Escherichia coli* and humans. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;292(38):15588-97.
97. Zhang Y, Cao J, Meng Y, Qu C, Shen F, Xu L. Overexpression of xeroderma pigmentosum group C decreases the chemotherapeutic sensitivity of colorectal carcinoma cells to cisplatin. *Oncol Lett*. 2018;15(5):6336-44.
98. Teng X, Fan XF, Li Q, Liu S, Wu DY, Wang SY, et al. XPC inhibition rescues cisplatin resistance via the Akt/mTOR signaling pathway in A549/DDP lung adenocarcinoma cells. *Oncol Rep*. 2019;41(3):1875-82.
99. Dabholkar M, Vionnet J, Bostick-Bruton F, Yu JJ, Reed E. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest*. 1994;94(2):703-8.
100. Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Lenz HJ, Hayashi K, et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1998;16(1):309-16.
101. Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, Xiong YP, Uetake H, Danenberg KD, et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2001;19(23):4298-304.
102. Lord RV, Brabender J, Gandara D, Alberola V, Camps C, Domine M, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8(7):2286-91.
103. Arora S, Kothandapani A, Tillison K, Kalman-Maltese V, Patrick SM. Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. *DNA Repair (Amst)*. 2010;9(7):745-53.
104. Pajuelo-Lozano N, Bargiela-Iparraguirre J, Dominguez G, Quiroga AG, Perona R, Sanchez-Perez I. XPA, XPC, and XPD Modulate Sensitivity in Gastric Cisplatin Resistance Cancer Cells. *Front Pharmacol*. 2018;9:1197.
105. Cierna Z, Miskovska V, Roska J, Jurkovicova D, Pulzova LB, Sestakova Z, et al. Increased levels of XPA might be the basis of cisplatin resistance in germ cell tumours. *BMC Cancer*. 2020;20(1):17.
106. McNeil EM, Astell KR, Ritchie AM, Shave S, Houston DR, Bakrania P, et al. Inhibition of the ERCC1-XPF structure-specific endonuclease to overcome cancer chemoresistance. *DNA Repair (Amst)*. 2015;31:19-28.
107. Zhang T, Sun J, Lv M, Zhang L, Wang X, Ren JC, et al. XPG is predictive gene of clinical outcome in advanced non-small-cell lung cancer with platinum drug therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(2):701-5.

108. Koyen AE, Madden MZ, Park D, Minten EV, Kapoor-Vazirani P, Werner E, et al. EZH2 has a non-catalytic and PRC2-independent role in stabilizing DDB2 to promote nucleotide excision repair. *Oncogene*. 2020;39(25):4798-813.
109. Yoon T, Chakraborty A, Franks R, Valli T, Kiyokawa H, Raychaudhuri P. Tumor-prone phenotype of the DDB2-deficient mice. *Oncogene*. 2005;24(3):469-78.
110. Hwang BJ, Ford JM, Hanawalt PC, Chu G. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(2):424-8.
111. Takimoto R, El-Deiry WS. DNA replication blockade impairs p53-transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(3):781-3.
112. Hartman AR, Ford JM. BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nat Genet*. 2002;32(1):180-4.
113. Itoh T, Shiro T, Seki T, Nakagawa T, Wakabayashi M, Inoue K, et al. Relationship between p53 overexpression and the proliferative activity in hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med*. 2000;6(2):137-42.
114. Itoh T, O'Shea C, Linn S. Impaired regulation of tumor suppressor p53 caused by mutations in the xeroderma pigmentosum DDB2 gene: mutual regulatory interactions between p48(DDB2) and p53. *Mol Cell Biol*. 2003;23(21):7540-53.
115. Lerner LK, Francisco G, Soltys DT, Rocha CR, Quinet A, Vessoni AT, et al. Predominant role of DNA polymerase eta and p53-dependent translesion synthesis in the survival of ultraviolet-irradiated human cells. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(3):1270-80.
116. Takimoto R, MacLachlan TK, Dicker DT, Niitsu Y, Mori T, el-Deiry WS. BRCA1 transcriptionally regulates damaged DNA binding protein (DDB2) in the DNA repair response following UV-irradiation. *Cancer Biol Ther*. 2002;1(2):177-86.
117. Dong TK, Ona K, Scandurra AE, Demetriou SK, Oh DH. Deficient Nucleotide Excision Repair in Squamous Cell Carcinoma Cells. *Photochem Photobiol*. 2016;92(5):760-6.
118. Chen HH, Fan P, Chang SW, Tsao YP, Huang HP, Chen SL. NRIP/DCAF6 stabilizes the androgen receptor protein by displacing DDB2 from the CUL4A-DDB1 E3 ligase complex in prostate cancer. *Oncotarget*. 2017;8(13):21501-15.
119. Cui T, Srivastava AK, Han C, Wu D, Wani N, Liu L, et al. DDB2 represses ovarian cancer cell dedifferentiation by suppressing ALDH1A1. *Cell Death Dis*. 2018;9(5):561.
120. Yang H, Liu J, Jing J, Wang Z, Li Y, Gou K, et al. Expression of DDB2 Protein in the Initiation, Progression, and Prognosis of Colorectal Cancer. *Dig Dis Sci*. 2018;63(11):2959-68.
121. Kattan Z, Marchal S, Brunner E, Ramacci C, Leroux A, Merlin JL, et al. Damaged DNA binding protein 2 plays a role in breast cancer cell growth. *PLoS One*. 2008;3(4):e2002.
122. Gilson P, Drouot G, Witz A, Merlin JL, Becuwe P, Harle A. Emerging Roles of DDB2 in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20).
123. Branzei D, Szakal B. DNA damage tolerance by recombination: Molecular pathways and DNA structures. *DNA Repair (Amst)*. 2016;44:68-75.
124. Quinet A, Tirman S, Cybulla E, Meroni A, Vindigni A. To skip or not to skip: choosing repriming to tolerate DNA damage. *Molecular Cell*. 2021;81(4):649-58.
125. Sale JE, Lehmann AR, Woodgate R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(3):141-52.

126. Berdis AJ. Inhibiting DNA Polymerases as a Therapeutic Intervention against Cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2017;4(78).
127. Sokol AM, Cruet-Hennequart S, Pasero P, Carty MP. DNA polymerase η modulates replication fork progression and DNA damage responses in platinum-treated human cells. *Scientific Reports*. 2013;3(1):3277.
128. Chen Y-w, Cleaver JE, Hanaoka F, Chang C-f, Chou K-m. A Novel Role of DNA Polymerase η in Modulating Cellular Sensitivity to Chemotherapeutic Agents. *Molecular Cancer Research*. 2006;4(4):257-65.
129. Srivastava AK, Han C, Zhao R, Cui T, Dai Y, Mao C, et al. Enhanced expression of DNA polymerase eta contributes to cisplatin resistance of ovarian cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(14):4411-6.
130. Zafar MK, Maddukuri L, Ketkar A, Penthala NR, Reed MR, Eddy S, et al. A Small-Molecule Inhibitor of Human DNA Polymerase η Potentiates the Effects of Cisplatin in Tumor Cells. *Biochemistry*. 2018;57(7):1262-73.
131. Bank RPD. RCSB PDB - 3MR2: Human DNA polymerase eta in complex with normal DNA and incoming nucleotide (Nrm). 2021.
132. Rychlik W. Selection of primers for polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*. 1993;15:31-40.
133. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*. 1988;48(17):4827-33.
134. Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity 2021 [Available from: <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en>.
135. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*. 1984;22:27-55.
136. Chou T-C. Frequently asked questions in drug combinations and the mass-action law-based answers. *Synergy*. 2014;1(1):3-21.
137. Hatzis C, Bedard PL, Birkbak NJ, Beck AH, Aerts HJWL, Stern DF, et al. Enhancing Reproducibility in Cancer Drug Screening: How Do We Move Forward? *Cancer Research*. 2014;74(15):4016-23.
138. Hafner M, Niepel M, Chung M, Sorger PK. Growth rate inhibition metrics correct for confounders in measuring sensitivity to cancer drugs. *Nature Methods*. 2016;13(6):521-7.
139. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
140. Hodeify R, Siddiqui SS, Matar R, Vazhappilly CG, Merheb M, Al Zouabi H, et al. Modulation of calcium-binding proteins expression and cisplatin chemosensitivity by calcium chelation in human breast cancer MCF-7 cells. *Heliyon*. 2021;7(1):e06041.
141. Fattah A, Morovati A, Niknam Z, Mashouri L, Asadi A, Rizi ST, et al. The Synergistic Combination of Cisplatin and Piperine Induces Apoptosis in MCF-7 Cell Line. *Iran J Public Health*. 2021;50(5):1037-47.
142. Kashkoulinejad-Kouhi T, Safarian S, Arnaiz B, Saa L. Enhancement of cisplatin sensitivity in human breast cancer MCF-7 cell line through BiP and 14-3-3 ζ co-knockdown. *Oncol Rep*. 2021;45(2):665-79.

143. Almomani R, Marchi M, Sopacua M, Lindsey P, Salvi E, Koning B, et al. Evaluation of molecular inversion probe versus TruSeq(R) custom methods for targeted next-generation sequencing. *PLoS One*. 2020;15(9):e0238467.
144. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *DNA Repair and Mutagenesis* 2005. p. 267-315.
145. Chu G, Chang E. Cisplatin-resistant cells express increased levels of a factor that recognizes damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(9):3324-7.
146. Leon-Galicia I, Diaz-Chavez J, Albino-Sanchez ME, Garcia-Villa E, Bermudez-Cruz R, Garcia-Mena J, et al. Resveratrol decreases Rad51 expression and sensitizes cisplatin-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Oncol Rep*. 2018;39(6):3025-33.
147. Zou J, Zhu L, Jiang X, Wang Y, Wang Y, Wang X, et al. Curcumin increases breast cancer cell sensitivity to cisplatin by decreasing FEN1 expression. *Oncotarget*. 2018;9(13):11268-78.
148. Suberu JO, Romero-Canelón I, Sullivan N, Lapkin AA, Barker GC. Comparative cytotoxicity of artemisinin and cisplatin and their interactions with chlorogenic acids in MCF7 breast cancer cells. *ChemMedChem*. 2014;9(12):2791-7.
149. Helton ES, Chen X. p53 modulation of the DNA damage response. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007;100(4):883-96.
150. Aleksandrov R, Dotchev A, Poser I, Krastev D, Georgiev G, Panova G, et al. Protein Dynamics in Complex DNA Lesions. *Molecular Cell*. 2018;69(6):1046-61.e5.

8. EKLER

EK-1: Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Onur Aktan
Ödev başlığı: Tez
Gönderi Başlığı: Meme Kanserinde Sisplatin Hücresel Yanıtının DDB2 ve DNA...
Dosya adı: n_DDB2_ve_DNA_Polimeraz_Eta_zerinden_ncelenmesi_Onur_...
Dosya boyutu: 2.67M
Sayfa sayısı: 69
Kelime sayısı: 12,630
Karakter sayısı: 86,464
Gönderim Tarihi: 11-Oca-2022 12:44ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1740027702

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİNDE SISPLATİN HÜCRESEL YANITININ DDB2 VE DNA POLİMERAZ ETA ÜZERİNDEN İNCELENMESİ

ONUR AKTAN

Öğrenci Programı:
Yüksek Lisans Tezi

TEZ DANIŞMANI:
Doç. Dr. Güneş KALKIÇ ERBİLEN

ANKARA
2021

Copyright 2022 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Ekran Çıktısı

Meme Kanserinde Sisplatin Hücresel Yanıtının DDB2 ve DNA Polimeraz Eta Üzerinden İncelenmesi, Onur Aktan

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 6	% 1	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% 1
3	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
4	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
6	Submitted to Pamukkale Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
7	angora.baskent.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	tur.kyhistotechs.com İnternet Kaynağı	<% 1

earsiv.kastamonu.edu.tr:8080

9. ÖZGEÇMİŞ