

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

İnsan Meme Kanseri Hücre Hatlarında Verapamil'in Doksetel, Gemsitabin ve Karboplatin ile Kombine Tedavisinin, Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması*

Dilek YEĞİN¹, Engin ULUKAYA²

¹ Bursa Şehir Hastanesi Merkez Laboratuvarı, Bursa, Türkiye.

² İstinye Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

ÖZET

Kemoterapi ilaçlarına karşı direnç, kanser tedavisindeki en yaygın ve ciddi klinik sorundur. Başarılı kanser tedavisindeki en büyük zorluk olan bu olguya çoklu ilaç direnci denir. Çoklu ilaç direncinin yaygın bir nedeni P-glikoproteininin aşırı ekspresyonudur. Verapamil, P-glikoprotein ekspresyonunu azaltan bir kalsiyum kanal blokeridir. Bu çalışma, Verapamilin çeşitli dozlarda, MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarını kullanarak, kemoterapötiklerin sitotoksik potansiyelini artırma etkisini araştırdı. İnsan meme kanseri hücre hatları MDA-MB-231 ve MCF-7, Doksetel, Gemsitabin ve Karboplatin kombinasyonlarıyla tedavi edildi. Hücre canlılığı MTT yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Apoptozun varlığı (M30 Antijeni) ELISA yöntemi kullanılarak tespit edildi. Apoptoz tespiti için Annexin-V floresan konjugatları kullanıldı. Primer nekroz veya geç apoptoz (sekonder nekroz) nedeniyle hasarlı membranlara sahip hücrelerin DNA'sına propidyum iyodür, sekonder boya olarak kullanıldı ve floresan mikroskopisi ile analiz edildi. Çalışmada Verapamil'in hem MDA-MB-231 hem de MCF-7 hücre hatlarında Doksetel ve Karboplatinin sitotoksik etkilerini artırdığı tespit edildi. Ek olarak Verapamil, hücre tipine bağlı olarak Gemsitabinin etkinliğini değiştirdi. Verapamil, MCF-7 hücre hattında kaspazla parçalanan sitokeratin 18'i arttırdı. MCF-7 hücrelerinde Gemsitabin-Verapamil kombinasyonunun kullanılmasının sitotoksik etkiyi artırma açısından etkili bir strateji olabileceği düşünüldü. Ancak bu sonuçların daha fazla ve farklı deneylerle doğrulanması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Verapamil. Çoklu İlaç Direnci. Meme Kanseri. P-Glikoprotein. Apoptoz.

Investigation of Cytotoxic and Apoptotic Effects of Combined Treatment of Verapamil with Docetaxel, Gemcitabine and Carboplatin in Human Breast Cancer Cell Lines

ABSTRACT

Resistance to chemotherapeutic drugs is the most common and serious clinical problem in cancer treatment. This phenomenon, which is the major challenge in successful cancer therapy, is referred to as multidrug resistance. A frequent reason for multidrug resistance is the heightened production of P-glycoprotein. Verapamil, a calcium channel antagonist, diminishes P-glycoprotein levels. This study investigated the effect of Verapamil at various doses on enhancing the cytotoxic potential of chemotherapeutics using MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. Human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 were treated with combinations of Docetaxel, Gemcitabine, and Carboplatin. Cell viability was assessed using the MTT method. The presence of apoptosis (M30 Antigen) was detected using the ELISA method. Annexin-V fluorescent conjugates were used for apoptosis detection. Propidium iodide, which binds to the DNA of cells with damaged membranes due to primary necrosis or late apoptosis (secondary necrosis), was used as a secondary dye and analyzed by fluorescence microscopy. In this study, Verapamil was observed to amplify the cytotoxicity of Docetaxel and Carboplatin in both MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines. Furthermore, Verapamil influenced the effectiveness of Gemcitabine in a cell type-dependent manner. Verapamil increased caspase-cleaved cytokeratin 18 in MCF-7 cell line. It is thought that the use of Gemcitabine-Verapamil combination in MCF-7 cells may be an effective strategy in terms of increasing the cytotoxic effect. However, these results need to be confirmed with more and different experiments.

Keyword: Verapamil, Multidrug Resistance, Breast Cancer, P-Glycoprotein, Apoptosis.

Geliş Tarihi: 30.Eylül.2024

Kabul Tarihi: 20.Aralık.2024

Dr. Dilek YEĞİN
T.C. Sağlık Bakanlığı Bursa Şehir Hastanesi,
Merkez Laboratuvarı,
Bursa, Türkiye.
Tel: 0533 657 61 57
E-posta: dyegin2@gmail.com

* 2. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu'nda (24-27 Şubat 2008, Uludağ/Bursa) poster bildiri olarak sunulmuştur.

Yazarların ORCID Bilgileri:
Dilek YEĞİN: 0000-0001-9933-5297
Engin ULUKAYA: 0000-0003-4875-5472

Meme kanseri dünyanın her yerinde kadınları etkileyen yaygın bir kanserdir¹. Sitotoksik ajanlarla sistemik kemoterapi tedavi rejimlerinin önemli bir bileşeni olmaya devam etmektedir². Meme kanseri tedavisinin erken ve ileri aşamaları için önerilen en yaygın ajan taksan bazlı kemoterapidir³. Dosetaksel, meme kanseri de dahil olmak üzere kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan klasik bir antimitotik kemoterapi ilacıdır⁴. Gemsitabin, antimetabolit, antineoplastik ajan olarak yaygın şekilde kullanılan bir nükleozid analogudur. Yumurtalık, mesane, küçük hücreli olmayan akciğer, pankreas ve meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli durumların tedavisinde tek başına veya diğer antikanser ilaçlarla kombinasyon halinde uygulanır⁵. Karboplatin, geniş spektrumlu antitümör aktivitesine sahip, tek ajan olarak veya çoklu tümörlerin tedavisinde kombinasyon halinde kullanılan bir Sisplatin türevidir⁶. Meme kanserinde hastalık heterojen olup, klinik pratikte kemoterapinin yanı sıra cerrahi ve radyoterapi gibi lokal tedaviler olarak çeşitli tedavi seçenekleri uygulanmaktadır. Daha spesifik tedaviler arasında hormon tedavisi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi yer alır. Yine de ilaç direncine bağlı olarak tedavi başarısızlığı ve hastalığın tekrarlamaşı tüm meme kanseri türlerinde yaygın olmaya devam etmektedir. Kemoterapi direnci, tümörlerin kendine özgü ve doğal bir özelliği olabilir. Tümörlerin direnç mekanizmaları daha önce, değişen membran ilaç taşınması, değişen DNA onarımı ve değişen apoptoz mekanizmaları gibi tümör hücresi değişiklikleriyle ilişkilendirilmiştir^{7,8}. Çoklu ilaç direnci (MDR), farklı kimyasal yapılar ve farklı etki mekanizmaları ile karakterize edilen kemoterapötik ilaçlara karşı mikroorganizmaların ve kanser hücrelerinin kazanılmış bir tür ilaç direncidir. MDR, kemoterapi ilacını hücreden dışarı çıkaran ve konsantrasyonunu etkili olanın altına düşüren çeşitli proteinlerin aşırı ekspresyonunun bir sonucudur⁹. P-glikoprotein (P-gp) veya çoklu ilaç direnci proteini 1 (MDR1), birçok kemoterapötik ilaç da dahil olmak üzere substratlarını aktif olarak hücre dışına çıkaran ATP'ye bağımlı bir çoklu ilaç taşıyıcısıdır¹⁰. Bu nedenle çoklu ilaç direncinin gelişmesinde çok önemli rol oynar. P-gp'nin birçok tümör tipinde aşırı eksprese edildiği bilinmektedir^{11,12}. Kanser hücrelerinde P-gp'nin artan ekspresyonunun, çok sayıda antikanser ilacın akışını arttırdığı, kemoterapötik ilaçların hücre içi birikiminin azalmasına yol açtığı ve dolayısıyla çeşitli tümör hücrelerinde kemorezistansa katkıda bulunduğu doğrulanmıştır¹³. Verapamil bir çeşit kalsiyum kanal blokeridir. Verapamil ayrıca bir dizi ilacın taşınması ve metabolizması ile yakından ilişkili olan P-gp'nin spesifik bir inhibitörüdür¹⁴. Verapamil klasik bir kemosenstizandır¹⁵.

Bu çalışmada MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanser hücre hatlarında Verapamili, tedavide kullanılan ajanların değişik dozları ile kombine ederek, ilaç

etkinliğini artırıp arttırmadığı araştırıldı. Böylece meme kanseri için yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi amaçlandı. Bu doğrultuda Dosetaksel, Gemsitabin ve Karboplatin kanser ilaçları seçildi. Bu ilaçlar hem tek başlarına hem de Verapamil ile kombinasyon halinde kullanıldı.

Gereç ve Yöntem

Hücre Kültürü

MDA-MB-231 ve MCF-7 İnsan meme kanseri hücre hatları kullanıldı. Meme kanseri hücre hatları Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC, Manassas, VA, ABD) temin edildi. RPMI 1640 besiyeri (Hyclone USA) kullanıldı. %1 Penisilin-Streptomisin (Hyclone, USA) eklendi. MCF-7 hücre hattı için besiyeri İçerisine %10 Fetal sıgır serumu (Biochrom AG Berlin), MDA-MB-231 hücreleri için %5 Yenidoğan buzağı serumu (Hyclone USA), %1 L-glutamin (EuroClone Europe) ilave edilerek, %5'lik CO₂'li inkübatörde 37°C'de hücreler büyümeye bırakıldı.

MTT Testi İle Kemoterapötik İlaçlar ve Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

MTT (Metiltiazoltetrazolium) yönteminin esası, hücre kültüründe yetiştirilen hücre hatlarında dehidrogenaz enzim aktivitesinin ölçülmesine dayanır (16). Kullanılan konsantrasyonlar (µM cinsinden), klinik doza uygun dozların kullanılması amacıyla seçilmiştir. Her iki hücre tipindeki hücrelere, çeşitli konsantrasyonlarda Verapamil (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 µM) tek başına uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık, MTT metodu ile değerlendirildi. IC₅₀ (Hücrelerin %50'sini inhibe eden konsantrasyon), subletal doz ve subletal doza en yakın nontoksik dozlar tespit edildi. Çalışmanın bundan sonraki deneylerinde MDA-MB-231 hücreleri için subletal doz olan 50 µM Verapamil ve nontoksik doz olan 25 µM Verapamil, meme kanseri tedavisinde verilen Dosetaksel, Gemsitabin ve Karboplatin ile kombine edilerek kullanıldı. MCF-7 hücreleri için ise subletal doz olan 100 µM Verapamil ve nontoksik doz olan 25 µM Verapamil, Dosetaksel, Gemsitabin ve Karboplatin ile kombine edildi. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. 24 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Çeşitli dozlarda kemoterapötikler ve Verapamil 100 µl olacak şekilde uygulandı. İlaç tedavisini takiben hücreler 72 saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında tüm kuyucuklara MTT solüsyonu, fosfat tuzlu tampon (PBS) içerisinde (5mg/ml, pH:7.2) 25 µl olacak şekilde ilave edilerek karanlıkta 37°C, %5 CO₂'li etüvde 4 saat inkübe edildi. Oluşan formazan bileşiklerini çözünür hale getirebilmek için bütün kuyucukların üzerine Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

Verapamil İle Kemoterapötik Etkinin Arttırılması

solüsyonundan (0,01 N HCl'li %10'luk SDS tamponu) 100 µl olacak şekilde ilave edildi. Oluşturdukları renk şiddeti spektrofotometre (FLASHScan S12) ile 570 nm dalga boyunda ölçülerek belirlendi¹⁷.

Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi (M30 Antijen Testi)

Sadece apoptotik hücrelerde aktive olan bir enzim grubu olan kaspazlar, apoptoz sırasında önemli bir sitoskeletal protein olan CK18'i keserek CK18 (CK18-Asp396) üretir. CK18'in (M30-antijeni) Asp396 parçası, M30 monoklonal antikoru tarafından tanınır ve bu da CK18'in bir apoptotik belirteç olduğunu gösterir (18). Kaspazla kırılmış sitokeratin 18'in (M30 Antijen), ELISA yöntemiyle saptanması için 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Sonraki gün hücrelere kemoterapötikler ve Verapamil tedavisi uygulandı. Yöntemden dolayı tedaviden 48 saat sonra tüm kuyucuklara Triton X 100 (%10 distilesuda) 10 µl ilave edildi. 15 dakika oda sıcaklığında 600 rpm'de inkübasyona bırakıldı. 2000 rpm'de 30 sn santrifuj edildi. M30 Apoptosense ELISA (PEVİVA, Bromma, İsveç) kit prospektüsüne uygun olarak çalışma gerçekleştirildi. Oluşan renk şiddeti spektrofotometrik olarak 450 nm'de (FLASHScanS12) ölçüldü¹⁹.

Apoptozun Hücre Membranında Gösterimi: Anneksin V Testi ve Nekrozun Belirlenmesi: Propidyum İyodür Testi

Anneksin-V floresan konjugatları, apoptoz sırasında ortaya çıkan açığa kalan fosfatidilserine spesifik olarak bağlandıkları için apoptozun tespiti için kullanılabilir. Propidyum iyodür (PI), membran geçirimsiz olan ve yalnızca birincil nekroz veya geç apoptoz (ikincil nekroz) nedeniyle zarar görmüş membranlara sahip hücrelerin DNA'sına bağlanan ikinci bir boya olarak kullanılır²⁰. Hücreler altı hücre kültür kaplarına 500.000 hücre/2 ml olacak şekilde ekildi. 48 saat sonra Anneksin V boyama prosedürü tatbik edildi. Bunun için Anneksin-V-FLUOS Roche Mannheim Almanya kiti kullanıldı. Üzerlerine 80 µl hazırlanan boyama çözeltisinden konuldu ve karıştırıldı. Karanlıkta 15-20 dakika 37°C'de inkübe edildi. (Boyama çözeltisi: Az ışıklı ortamda 1.1 ml İnkübasyon buffer, 22 µl Anneksin 5-Fluorescein, 22 µl PI karıştırılarak hazırlandı). Hücreler daha sonra floresan mikroskopu ile analiz edildi²¹.

İstatistiksel Analiz

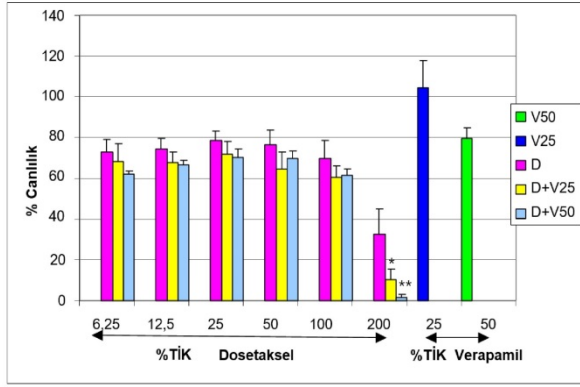
Çalışmanın analizleri SPSS 13.0 paket programında yapıldı. Sürekli değişkenler ortalama ve standart sapma ile verildi. Çoklu karşılaştırma testi olarak Tukey testi kullanıldı. % canlılık değerlerinin ilaç ve doz gruplarına göre karşılaştırmaları ve ilaç-doz etkileşiminin önemliliği iki yönlü varyant analizi kullanılarak yapıldı. Kategorik değişkenler arasındaki

karşılaştırmalar Ki-kare testiyle yapıldı. Çalışmada $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

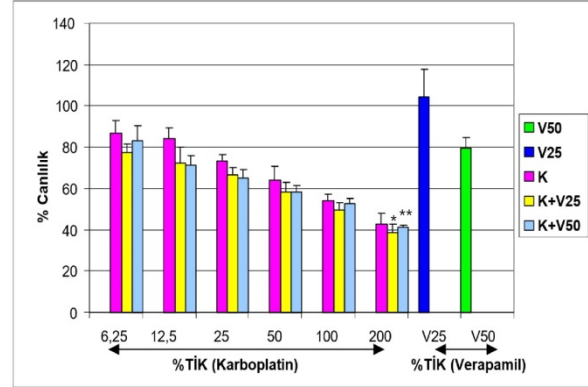
İlaçların Canlılık Üzerine Etkilerinin Gösterilmesi

MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerine, çeşitli konsantrasyonlarda Verapamil (200,100, 50, 25, 12.5, 6.25 µM) tek başına uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık, MTT metodu ile değerlendirme yapıldı. IC₅₀ (Hücrelerin %50'sini inhibe eden konsantrasyon), subletal doz ve subletal doza en yakın nontoksik dozlar tespit edildi. Bundan sonrasında subletal doz olan 50 µM Verapamil ve nontoksik doz olan 25 µM Verapamil, meme kanseri tedavisinde kullanılan Dosetaksel, Gemsitabin ve Karboplatin ile kombine edilerek uygulandı. Sonuçlar Dosetaksel, Gemsitabin ve Karboplatinin tek başlarına uygulanan etkileriyle karşılaştırıldı. Bu kombinasyonların kanser hücreleri üzerindeki % canlılık etkisini değerlendirmek için MTT testi yapıldı. Yapılan MTT testine göre; Tek başına Dosetaksel ile Verapamil 25 µM ile kombinasyonu uygulanması karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Dosetaksel tek başına ile Verapamil 50 µM kombinasyonu uygulanması karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Fakat Dosetaksel + Verapamil 25 µM ve Dosetaksel + Verapamil 50 µM kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi. Verapamilin her iki dozu da (25µM, 50µM) Dosetakselin tek başına olan kanser hücresi öldürme etkisini anlamlı oranda arttırdı (Şekil 1-A). Aynı sonuçlara Gemsitabin ve Verapamil kombinasyonlarında ulaşamadı. Gemsitabin tek başına kullanılmasına göre Verapamilin her iki dozunun (25 µM ve 50 µM) Gemsitabin ile kombine kullanılması anlamlı olmadığı gibi, Gemsitabin + Verapamil 25 µM ve Gemsitabin + Verapamil 50 µM kombinasyonlarının birbiriyle karşılaştırmaları da istatistiksel olarak anlamlı değildi. Verapamilin Gemsitabin üzerinde etkisi gösterilemedi (Şekil 1-B). Dosetakselde olduğu gibi Karboplatin tek başına ile Verapamil 25 µM kombinasyonu uygulanması karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Karboplatin tek başına uygulanması ile Verapamil 50 µM kombinasyonu karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Fakat Karboplatin + Verapamil 25 µM ve Karboplatin + Verapamil 50 µM kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi. Verapamilin her iki dozu da Karboplatinle kombine edildiğinde % canlılık üzerine etkiliydi (Şekil 1-C).



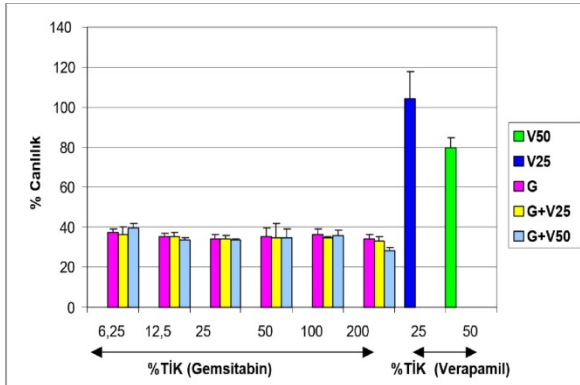
Şekil 1-A.

MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde Dozetaksel ve kombinasyon uygulaması sonrası MTT metoduna göre % canlılık düzeyleri. V25: 25 μ M Verapamil, V50: 50 μ M Verapamil. Dozetaksel Test İlaç Konsantrasyon (TİK) değerleri; 200 TİK: 22.6 μ g/ml, 100 TİK: 11.3 μ g/ml, 50 TİK: 5.65 μ g/ml, 25 TİK: 2.82 μ g/ml, 12.5 TİK: 1.41 μ g/ml, 6.25 TİK: 0.70 μ g/ml. *V25 ile kombine tedavi, tek başına Dozetaksele göre anlamlıdır. **V50 ile kombine tedavi, tek başına Dozetaksele göre anlamlıdır.



Şekil 1-C.

MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde Karboplatin ve kombinasyon uygulaması sonrası MTT metoduna göre % canlılık düzeyleri. V25: 25 μ M Verapamil, V50: 50 μ M Verapamil. TİK değerleri Karboplatin: 200 TİK: 31.6 μ g/mL, 100 TİK: 15.8 μ g/mL, 50 TİK: 7.9 μ g/mL, 25 TİK: 3.95 μ g/mL, 12.5 TİK: 1.97 μ g/mL, 6.25 TİK: 0.98 μ g/mL *V25 ile kombine tedavi, tek başına Karboplatine göre anlamlıdır. **V50 ile kombine tedavi, tek başına Karboplatine göre anlamlıdır.



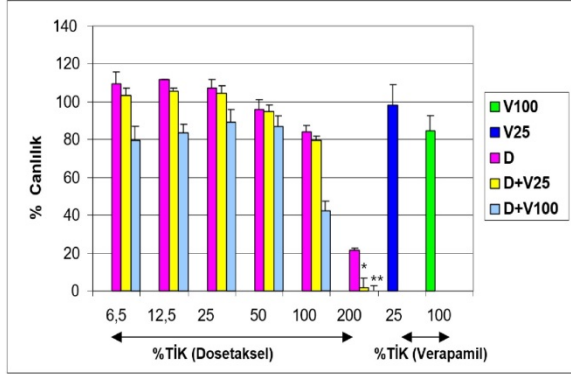
Şekil 1-B.

MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde Gemcitabin ve kombinasyon uygulaması sonrası MTT metoduna göre % canlılık düzeyleri. V25: 25 μ M Verapamil, V50: 50 μ M Verapamil, Gemcitabin: 200 TİK: 50 μ g/mL, 100 TİK: 25 μ g/mL, 50 TİK: 12.5 μ g/mL, 25 TİK: 6.25 μ g/mL, 12.5 TİK: 3.125 μ g/mL, 6.25 TİK: 1.56 μ g/mL.

MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine, çeşitli konsantrasyonlarda Verapamil (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 μ M) tek başına uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık, MTT metodu ile değerlendirildi. Subletal doz ve subletal doza en yakın nontoksik dozlar belirlendi. Çalışmanın bundan sonrasında subletal doz olan 100 μ M Verapamil ve nontoksik doz olan 25 μ M Verapamil; Dozetaksel, Gemcitabin ve Karboplatin ile kombine edilerek kullanıldı. Sonuçlar Dozetaksel, Gemcitabin ve Karboplatinin tek başlarına uygulanan etkileriyle karşılaştırıldı. Bu kombinasyonların kanser hücreleri üzerindeki % canlılık etkilerini değerlendirmek için MTT testi yapıldı. Dozetaksel tek başına uygulanması ile Verapamil 25 μ M kombinasyonu karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Dozetaksel tek başına uygulanmasıyla Verapamil 100 μ M kombinasyon uygulaması karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık anlamlıydı ($p < 0.05$). Dozetaksel + Verapamil 25 μ M ve Dozetaksel + Verapamil 100 μ M kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 2-A). Gemcitabin tek başına uygulanması ile Verapamil 25 μ M kombinasyonu karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı. Gemcitabin tek başına uygulanması ile Verapamil 100 μ M kombinasyonu karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p < 0.05$). Bununla birlikte Gemcitabin + Verapamil 25 μ M ve Gemcitabin + Verapamil 50 μ M kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 2-B).

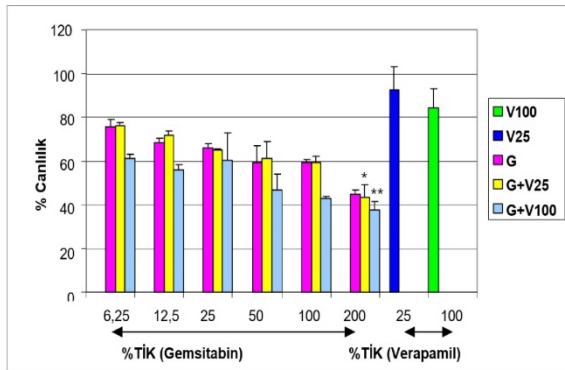
Verapamil İle Kemoterapötik Etkinin Arttırılması

Karboplatin tek başına uygulanması ile Verapamil 25µM kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Karboplatin tek başına uygulanması ile Verapamil 100µM kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarında farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$). Karboplatin + Verapamil 25 µM ve Karboplatin + Verapamil 100 µM kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarında farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$) (Şekil 2-C).



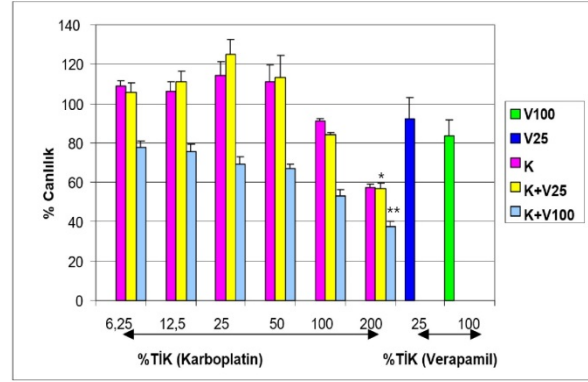
Şekil 2-A.

MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde Dosetaksel ve kombinasyon uygulaması sonrası MTT metoduna göre % canlılık düzeyleri. V25: 25 µM Verapamil, V100: 100 µM Verapamil. TİK değerleri Dosetaksel: 200 TİK: 22.6 µg/ml, 100 TİK: 11.3 µg/ml, 50 TİK: 5.65 µg/ml, 25 TİK: 2.82 µg/ml, 12.5 TİK: 1.41 µg/ml, 6.25 TİK: 0.70 µg/ml. *V25 ile kombine tedavi, V100 ile kombine tedaviye göre anlamlıdır. **V100 ile kombine tedavi, tek başına Dosetaksele göre anlamlıdır.



Şekil 2-B.

MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde Gemcitabin ve kombinasyon uygulaması sonrası MTT metoduna göre % canlılık düzeyleri. V25: 25 µM Verapamil, V100: 100 µM Verapamil. TİK değerleri Gemcitabin: 200 TİK: 50 µg/mL, 100 TİK: 25 µg/mL, 50 TİK: 12.5 µg/mL, 25 TİK: 6.25 µg/mL, 12.5 TİK: 3.125 µg/mL, 6.25 TİK: 1.56 µg/mL. *V25 ile kombine tedavi, V100 ile kombine tedaviye göre anlamlıdır. **V100 ile kombine tedavi, tek başına Gemcitabine göre anlamlıdır.



Şekil 2-C.

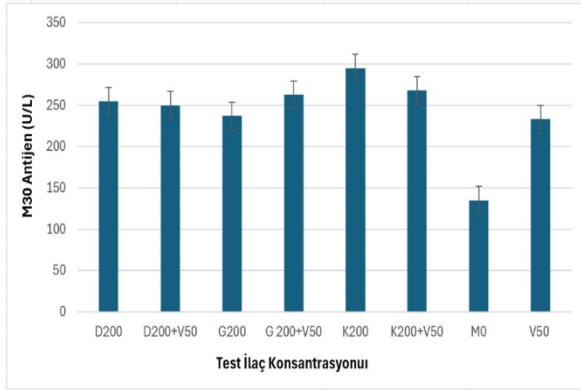
MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde Karboplatin ve kombinasyon uygulaması sonrası MTT metoduna göre % canlılık düzeyleri. V25: 25 µM Verapamil, V100: 100 µM Verapamil. TİK değerleri (Karboplatin): 200 TİK: 31.6 µg/mL, 100 TİK: 15.8 µg/mL, 50 TİK: 7.9 µg/mL, 25 TİK: 3.95 µg/mL, 12.5 TİK: 1.97 µg/mL, 6.25 TİK: 0.98 µg/mL. *V25 ile kombine tedavi, V100 ile kombine tedaviye göre anlamlıdır. **V100 ile kombine tedavi, tek başına Karboplatine göre anlamlıdır.

Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi

M30 Antijen Testi, hücrelerin apoptoz yoluyla ölmesini tespit etmeye yarayan bir yöntemdir¹⁸. Apoptoz sürecine giren hücrelerde meydana gelen kaspaz aracılı sitokeratin 18 parçalanmasını (M30 Antijen) belirlemek için ELISA yöntemi kullanıldı. Her iki hücre tipine Dosetaksel, Gemcitabin, Karboplatin ve Verapamil tedavi uygulaması yapıldıktan sonra çalışıldı. Şekil 3-A'da görüldüğü gibi MDA-MB-231 hücre hatlarında; Dosetaksel 200 TİK'in Verapamil 50 µM ile beraber (%4,8) kullanımı tek başına Dosetaksel 200 TİK (%4,9) göre kaspazla kırılmış sitokeratin 18'i (M30 antijen) anlamlı derecede değiştirmemiştir ($p=0.828$). Gemcitabin 200 TİK ile Verapamil 50 µM'in birlikte kullanımı (%5,0), tek başına Gemcitabin 200 TİK (%4,5) kullanımına göre kaspazla kırılmış sitokeratin 18'i (M30 antijen) anlamlı derecede değiştirmemiştir ($p=0.256$). Verapamil 50 µM'in Karboplatin 200 TİK ile birlikte kullanımı (%5,1) tek başına Karboplatin 200 TİK'e (%5,6) göre kaspazla kırılmış sitokeratin 18'i (M30 antijen) anlamlı derecede değiştirmemiştir ($p=0.268$). Verapamil kombinasyonlarına ilişkin apoptoz, MDA-MB-231 hücre hatlarında her üç ilaç grubunda da gösterilememiştir.

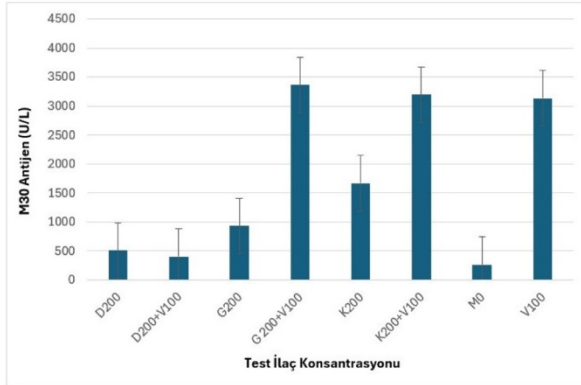
Şekil 3-B'de görüldüğü gibi MCF-7 hücrelerinde; Dosetaksel 200 TİK ile Verapamil 100 µM'in birlikte kullanılması (%7,4), tek başına Dosetaksel 200 TİK'e (%9,2) göre kaspazla kırılmış sitokeratin 18'i (M30 antijeni) anlamlı derecede azaltmıştır ($p=0.001$). Gemcitabin 200 TİK ile Verapamil 100 µM'in birlikte kullanılması (%40,2), tek başına Gemcitabin 200 TİK'e göre (%15,7), kaspazla kırılmış sitokeratin 18'i

(M30 antijeni) anlamlı derecede arttırmıştır ($p<0.001$). Karboplatin 200 TİK ile Verapamil 100 μ M'in birlikte kullanılması (%39,0) tek başına Karboplatin 200 TİK'e (%25,0) göre kaspazla kırılmış sitokeratin 18'i (M30 antijeni) anlamlı derecede arttırmıştır ($p<0.001$). Verapamil kombinasyonlarına ilişkin apopitoz MCF-7 hücre hatlarında Gemsitabin ve Karboplatin ilaç gruplarında gösterilmiştir.



Şekil 3-A.

MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde Dosetaksel, Gemsitabin, Karboplatin ve Verapamil tedavisinden sonra kaspazla parçalanmış sitokeratin 18 (M30 Antijeni) düzeyleri. D200: Dosetaksel 200 TİK: 22,6 μ g/mL, G200: Gemsitabin 200 TİK: 50 μ g/mL, Karboplatin 200 TİK: 31,6 μ g/mL, V50: Verapamil 50 μ M, MO: Tedavi edilmemiş kontrol grubu.



Şekil 3-B.

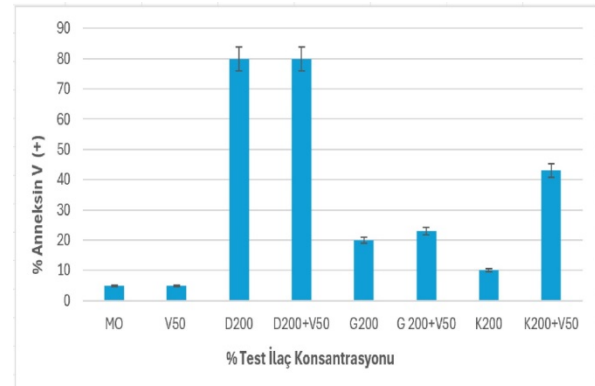
MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde Dosetaksel, Gemsitabin, Karboplatin ve Verapamil tedavisinden sonra kaspazla parçalanmış sitokeratin 18 (M30 Antijeni) düzeyleri. D200: Dosetaksel 200 TİK: 22.6 μ g/mL, G200: Gemsitabin 200 TİK: 50 μ g/mL, Karboplatin 200: 31.6 μ g/mL, V100: Verapamil 100 μ M, MO: Tedavi edilmemiş kontrol grubu.

Apopitozun Hücre Membranında Gösterilmesi (Anneksin V Testi)

Şekil 4-A da görüldüğü üzere MDA-MB-231 hücrelerinde; Kontrol hücrelerinde %5 oranında anneksin V pozitifliği tespit edildi ($p=1.000$).

Dosetaksel kombinasyonu (%80 anneksin V pozitif), tek başına Dosetaksele göre (%80 anneksin V pozitif) göre anneksin V pozitifliğini anlamlı derecede arttırmadı ($p=1.000$). Gemsitabin kombinasyonu (%23 anneksin V pozitif) tek başına Gemsitabine göre (%20 anneksin V pozitif) göre anneksin V pozitifliğini anlamlı derecede arttırmadı ($p=0.286$). Ancak Karboplatin kombinasyonu (%43 anneksin V pozitif) tek başına Karboplatine (%10 anneksin V pozitif) göre anneksin V pozitifliğini anlamlı derecede arttırdı ($p<0.001$). MDA-MB-231 hücre hatlarında Verapamilin Dosetaksel ya da Gemsitabin ile kombinasyonunda apopitotik etki gösterilemedi. Ancak Karboplatinin Verapamil ile kombinasyon uygulamasında, tek başına Karboplatine göre apopitotik etki gösterildi.

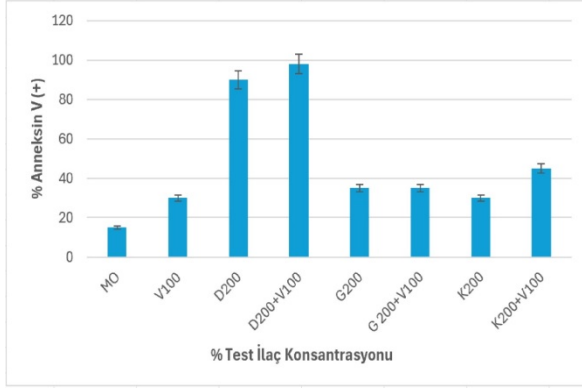
Şekil 4-B'de görüldüğü üzere MCF-7 hücrelerinde; Kontrol hücrelerinde %15 oranında anneksin V pozitifliği saptandı ($p<0.001$). Dosetaksel kombinasyonu (%98 anneksin V pozitifliği), tek başına Dosetaksele (%90 anneksin V pozitifliği) göre anneksin V pozitifliğini anlamlı derecede arttırdı ($p<0.001$). Gemsitabin kombinasyonu (%35 anneksin V pozitifliği) tek başına Gemsitabine (%35 anneksin V pozitifliği) göre anneksin V pozitifliğini değiştirmede ($p=1.000$). Karboplatin kombinasyonu (%45 anneksin V pozitifliği) tek başına Karboplatine (%30 anneksin V pozitifliği) göre anneksin V pozitifliğini anlamlı derecede arttırdı ($p<0.001$). MCF-7 Hücre Hatlarında; Verapamilin Gemsitabin ile kombinasyonunda apopitotik etki gösterilemedi. Ancak Dosetaksel ve Karboplatinin Verapamil ile kombinasyonlarının, tek başlarına ilaç kullanımlarına göre apopitotik etkileri gösterildi.



Şekil 4-A.

Dosetaksel, Gemsitabin, Karboplatin ve Verapamil ile tedaviden sonra MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde Anneksin V pozitif boyanan hücrelerin yüzdesi. MO: Tedavi edilmemiş kontrol grubu, D200: Dosetaksel 200 TİK: 22.6 μ g/mL, G200: Gemsitabin 200 TİK: 50 μ g/mL, Karboplatin 200 TİK: 31.6 μ g/mL, V50: Verapamil 50 μ M, % Anneksin V (+): Anneksin V pozitif boyama yüzdesi

Verapamil İle Kemoterapötik Etkinin Arttırılması



Şekil 4-B.

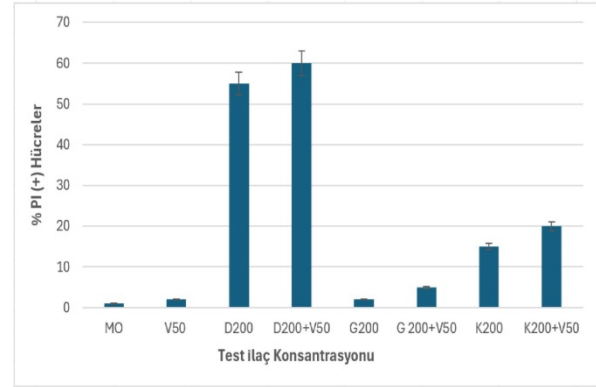
Dosetaksel, Gemsitabin, Karboplatin ve Verapamil ile tedaviden sonra MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde Annexin V pozitif boyanan hücrelerin yüzdesi. MO: Tedavi edilmeyen kontrol hücre grubu, D200: Dosetaksel 200 TİK: 22,6 µg/mL, G200: Gemsitabin 200 TİK: 50 µg/mL, Karboplatin 200 TİK: 31,6 µg/mL, V100: Verapamil 100 µM, % Annexin V (+): Annexin V pozitif boyanma yüzdesi.

Nekrozun Gösterilmesi (Propidyum İyodür Testi)

PI, yalnızca membran bütünlüğü bozulmuş, yani ölü hücreleri boyayabilen bir boyadır. Membran bütünlüğü sağlam olan (intakt) hücreler ise PI tarafından boyanmazlar. PI, membran geçirimsiz olan ve yalnızca birincil nekroz veya geç apoptoz (ikincil nekroz) nedeniyle zarar görmüş membranlara sahip hücrelerin DNA'sına bağlanan ikinci bir boya olarak kullanılır²⁰. Dosetaksel, Gemsitabin, Karboplatin ve Verapamil uygulandıktan sonra PI pozitifliği araştırıldı. Şekil 5-A da görüldüğü üzere MDA-MB-231 hücre hatlarında; Kontrol hücrelerinde %1 oranında PI pozitifliği saptandı (p=0.281). Dosetaksel kombinasyonu (%60 PI pozitif) tek başına Dosetaksele (%55 PI pozitif) göre PI pozitifliğini anlamlı derecede arttırmadı (p=0.134). Gemsitabin kombinasyonu (%5 PI pozitif) tek başına Gemsitabine (%2 PI pozitif) göre PI pozitiflik oranını anlamlı derecede arttırdı (p=0.017). Karboplatin kombinasyonu (%20 PI pozitif) ise tek başına Karboplatine (%15 PI pozitif) göre PI pozitifliği, istatistik anlamlılık sınırının biraz üzerinde kaldı (p=0.051). MDA-MB-231 Hücre hatlarında Verapamilin her üç ilaçla olan kombinasyonlarında değişik oranlarda birincil nekroz veya geç apoptoz (ikincil nekroz) saptanmasına rağmen, yalnızca Gemsitabin kombinasyon uygulamasındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

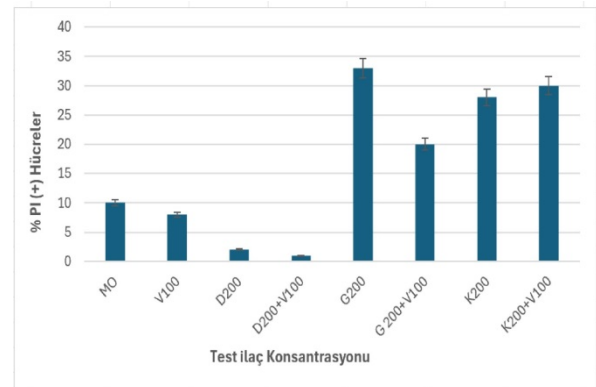
Şekil 5-B de görüldüğü üzere MCF-7 hücre hatlarında; Kontrol hücrelerinde %10 PI pozitifliği saptandı (p=0.289). Dosetaksel kombinasyonu (%0 PI pozitif) tek başına Dosetaksele (%2 PI pozitif) göre PI pozitifliğini anlamlı derecede azalttı (p=0.004). Gemsitabin kombinasyonu (%20 PI pozitif) tek başına Gemsitabine (%32 PI pozitif) göre PI pozitifliğini

anlamlı derecede azalttı (p<0.001). Karboplatin kombinasyonu (%27 PI pozitif) tek başına Karboplatine (%27 PI pozitif) göre PI pozitifliğini anlamlı derecede değiştirmede (p=1.000). MCF-7 Hücre hatlarında; Dosetaksel ve Gemsitabin kombinasyonları tek başlarına ilaç kullanımlarına göre PI pozitiflik oranlarını anlamlı derecede azaltıyor iken, Karboplatin kombinasyonunda tek başına ilaç kullanımına göre PI pozitiflik oranında anlamlı değişiklik görülmedi.



Şekil 5-A.

MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattında Dosetaksel, Gemsitabin, Karboplatin ve Verapamil ile tedaviden sonra PI pozitif boyanan hücrelerin yüzdesi. MO: Tedavi edilmeyen kontrol hücre grubu, D200: Dosetaksel 200 TİK: 22,6 µg/mL, G200: Gemsitabin 200 TİK: 50 µg/mL, Karboplatin 200 TİK: 31,6 µg/mL, V50: Verapamil 50 µM, % PI (+): PI pozitif boyanma yüzdesi.



Şekil 5-B.

Dosetaksel, Gemsitabin, Karboplatin ve Verapamil ile tedaviden sonra MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde PI pozitif boyanan hücrelerin yüzdesi. MO: Tedavi edilmeyen kontrol hücre grubu, D200: Dosetaksel 200 TİK: 22,6 µg/mL, G200: Gemsitabin 200 TİK: 50 µg/mL, Karboplatin 200 TİK: 31,6 µg/mL, V100: Verapamil 100 µM, % PI (+): PI pozitif boyanma yüzdesi.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre hatlarında, seçilen kemoterapötik ilaçların sitotoksik etkileri incelendi. Ayrıca, çoklu ilaç direnç proteini P-gp'yi inhibe eden Verapamilin bu ilaçlarla olan kombinasyonları değerlendirildi. Literatür taramasında elde edilen sonuçlara dayanarak, meme kanseri tedavisinde kullanılan ve daha önce Verapamil ile birlikte kombine edilerek kullanımı ya hiç çalışılmamış ya da çok az araştırılmış olan kemoterapötik ilaçlar; Dosetaksel, Gemsitabin, Karboplatin tercih edildi. Seçilen ilaçların kanser hücrelerine yönelik sitotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla yaygın olarak kullanılan MTT yöntemi uygulandı ve hücrelerin % canlılık oranları hesaplandı. Oluşan hücre ölümlerinin apopitozdan mı yoksa nekrozdan mı kaynaklandığı araştırıldı.

Daha önceki çalışmalarda Verapamil çeşitli tümör tiplerinde denenmiştir ve bunlardan bazıları şöyledir; Cadagan ve ark. Hücre hatları L929 (fare fibrosarkomu) ve MCF-7 (insan meme adenokarsinomu) hücrelerinde, sitotoksik ilaçlar Doksorubisin, Vinkristin ve Paklitaksel'e karşı doğuştan veya kazanılmış direnci ortadan kaldırmak için üç modüle edici ajanın (Kinin, Verapamil ve Sinarizin) etkilerini araştırmışlar. En etkili kombinasyonun Kinin-Verapamil ile sitotoksik ilaç olan Doksorubisin olduğunu belirtmişlerdir²². Bu iki sonuç, Verapamilin yalnızca epiteliyal tümörlerde değil, aynı zamanda stromal tümörlerde de etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Diğer yapılan çalışmalar şöyledir: Guo ve ark. Adriamisin (ADR) dirençli meme kanseri (MCF 7/ADR) hücrelerinde Dosetaksel ve Verapamilin birlikte uygulamasının p-gp'nin akış aktivitesini belirgin şekilde inhibe ettiğini ve hücre apopitozunu hızlandırdığını, bunun da antitümör aktivitesinde iyileşme ve MDR'nin tersine çevrilmesiyle sonuçlandığını rapor etmişlerdir²³. Uematsu ve ark. yaptıkları çalışmada insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinin iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) sferoidlerinin kemo-duyarlılığını araştırmış ve bir p-gp inhibitörü olan Verapamilin, Daunorubisin, Dosetaksel ve Arsenik Disülfid'in antiproliferatif etkilerini kısmen arttırdığını bulmuşlardır²⁴. Kars ve ark. da dirençli MCF-7 hücre hatlarında, Paklitaksel, Dosetaksel, Vinkristin ve Doksorubisinin Verapamil ile birlikte kullanılmasının çoklu ilaç direncini engellemeye yardımcı olduğu tespit etmişlerdir²⁵. Bu çalışmada MCF-7 hücrelerinde Verapamilin Dosetaksel ile kombinasyon uygulamasında, tek başına kullanımına göre kaspazla kırılmış sitokeratin 18 miktarında anlamlı artış görülmüyorken, Verapamilin Gemsitabin ve Karboplatinin ile kombinasyonları tek başlarına ilaç kullanımlarına göre kaspazla kırılmış sitokeratin 18

miktarını, apopitozu (M30 antijen) istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırmıştır (Şekil 3-B). Anneksin V boyama uygulamasına göre de Karboplatin kombinasyonlarında Anneksin V pozitifliği anlamlı derecede artmıştır (Şekil 4-B). Mohseni ve ark. H1299 Akciğer kanseri hücrelerinin kemo duyarlılığının Verapamil ile düzeltilip düzeltilemeyeceğini araştırmak için, Dosetaksel/Verapamil ve Vinblastin/Verapamilin hücresel proliferasyon ve apopitotik yanıt üzerindeki birleşik etkilerini incelemişlerdir. Her iki ajanın kombine konsantrasyonlarına Verapamil eklenmesi, hücre canlılığında önemli ölçüde azalmaya neden olmuştur. Ayrıca Verapamilin, Dosetaksel ile birlikte, apopitotik hücre yüzdesini arttırdığını ortaya koymuşlardır²⁶. Bu çalışmada ise her iki hücre hattında Dosetakselin Verapamil ile kombinasyonu apopitotik hücre oranını anlamlı derecede arttırmıyorken, MCF-7 hücre hatlarında Verapamilin Gemsitabin ve Karboplatin ile kombinasyonları, tek başına uygulamalarına göre apopitotik hücre oranını anlamlı derecede arttırmıştır (Şekil 3-B). Jaferian ve ark. yine H1299 Akciğer kanseri hücrelerinde Verapamilin, Dosetaksel ve Vinblastinin sitotoksik etkilerini arttırdığını buldular. P-gp aktivitesinin Verapamil tarafından inhibisyonunun, her bir ajanın tek başına tedavisinden daha düşük hücre canlılığı ile sonuçlandığını gösterdiler²⁷. Li ve ark. Paklitaksel ve Verapamilin, MCF-7/ADR hücreleri üzerindeki sinerjistik etkisini araştırdılar. MCF-7/ADR hücrelerinin apopitoz oranının, Paklitakselin tek başına tedavisine kıyasla kombinasyon tedavisinde 6 kat arttığını gösterdiler. Bu veriler, Paklitaksel ve Verapamil kombinasyon terapisinin, hücre apopitozunu teşvik etmede sinerjistik etki sağladığını aydınlatmıştır. Paklitaksel ve Verapamil kombinasyonu, hücre döngüsünün ilerlemesini durdurarak hücre çoğalmasını önleyebilir ve hücre apopitozunu teşvik edebilir (28). Yan ve ark. termokimyasal ısının Verapamil ile birlikte kullanımının, hücre içi ADR oranını ve MCF-7/ADM (ADM-resistant line MCF) hücre hatlarının apopitoz hızını arttırdığını bulmuşlardır²⁹. Zhao ve ark. Verapamil ve Gemsitabinin İnsan pankreatik adenokarsinom hücre hatlarında (L3.6pl) kombine pro-apopitotik etkileri olduğunu belirlemişlerdir³⁰. Nandi ve ark. ise meme kanseri kök hücreleri (BCSC) ve MDA-MB-231 hücrelerinde Kaempferol'ün Verapamil ile kombinasyonunun tek başına Kaempferol'den daha güçlü etkinliğe sahip olduğunu ve G2/M'ye bağlı hücre döngüsü durmasını indüklediğini gösterdiler³¹. Kayouka ve ark. İnsan karaciğer kanseri hücreleri (HepG2) hücrelerinde Oleanolik Asitin Verapamil ile kombinasyonunun sitotoksitesiyi büyük ölçüde arttırdığını, 72 saat sonra hücre canlılığının %63,7 den %25'e düştüğünü gösterdiler. Bu sonuçları ise, P-gp'nin inhibe edilmesinin Oleanolik Asitin kemoterapötik

Verapamil İle Kemoterapötik Etkinin Arttırılması

aktivitesini arttığını göstermiştir şeklinde yorumladılar³².

Bu çalışmada ise Verapamil, MDA-MB-231 hücrelerinde Doseetakselin ve Karboplatinin sitotoksitesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmıştır ve Doseetaksel + Verapamil 25 µM kombinasyonu ile Doseetaksel + Verapamil 50 µM kombinasyonu arasında sitotoksitate açısından anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 1-A). Aynı sitotoksik etki, daha düşük dozlarda görülebilmektedir. Bu nedenle de MDA-MB-231 hücre hattında daha düşük Verapamil dozu kullanılarak yüksek sitotoksik etki elde edilebilmektedir. Bu durum kemoterapötik ilaçların istenmeyen yan etkilerinden korunmada önemli olabilir. Özellikle MDA-MB-231 hücre hattının invaziv karakterli olduğu göz önüne alındığında bu önem daha da artmaktadır.

Bu çalışmada Verapamil; Gemsitabin ve Karboplatin ilaç gruplarında, MCF-7 hücre hatlarında M30 antijenini arttırmaktadır (Şekil 3-B). Dolayısıyla apoptozu arttırmıştır. Ancak MDA-MB-231 hücre hatlarında aynı etki bulunmamıştır (Şekil 3-A). MDA-MB-231 hücrelerinde M30 antijeni yaklaşık 220 U/L düzeylerindeyken, MCF-7 hücrelerinde 2000 U/L düzeylerine kadar çıkabilmiştir. Bu bulgular, MCF-7 hücrelerinin esas olarak apoptozla öldüğünü göstermektedir. Nitekim Ari ve ark. yaptıkları çalışmada MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerine klasik meme kanseri tedavisi olan 5-Flourourasil-Epirubisin-Siklofosamid (FEC) tedavisini uygulanmışlar ve MDA-MB-231 hücrelerinin nekrozisla ölürlen, MCF-7 hücrelerinin tipik olarak apoptozla öldüğünü bulmuşlardır³³.

Bu çalışmada hem MDA-MB-231 hücre hatlarında hemde MCF-7 hücre hatlarında Verapamil, Doseetakselin ve Karboplatinin sitotoksitesini (MTT metodu ile) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırdığı bulunmuştur. Fakat Verapamil, MDA-MB-231 hücrelerinde Gemsitabinin sitotoksik etkisini arttırmıyorken (Şekil 1-B), MCF-7 hücrelerinde anlamlı olarak arttırmaktadır (Şekil 2-B). Bundan ötürü bu çalışmada ilginç olarak, Verapamilin Gemsitabinin etkinliğini hücre tipine bağlı olarak modifiye ettiği bulunmuştur. MDA-MB-231 insan meme kanser hücre hatlarında ilaç gruplarına, doz gruplarına ve ilaç-doz etkileşimlerine göre % canlılık ortalamaları farklılık gösterdiği bulunmuştur.

Sonuç olarak, bu çalışmada her iki hücre tipinde (MDA-MB-231, MCF-7) Doseetaksel ve Karboplatinin, Verapamil ile kombinasyonunun, sitotoksik etkiyi arttırdığı gösterilmiş oldu. Gemsitabinin enzimlerle hızlı metabolizma, böbrek yoluyla hızlı atılım nedeniyle etkinliği azalmaktadır. Bu nedenle etkinliğini arttırmak için, gastrointestinal toksisiteye neden olan yüksek dozlarda Gemsitabin alınması tavsiye edilir. Birçok kanser türü Gemsitabine direnç geliştirmektedir⁸. Bu durum göz

önünde bulundurulduğunda MCF-7 hücrelerinde, Gemsitabin-Verapamil kombinasyonunun kullanılmasının, sitotoksik etkiyi artırması açısından etkili bir strateji olabileceği düşünülmüştür. Ancak daha fazla, farklı deneyler ile bu sonuçların doğrulanması gerekmektedir.

Çalışmanın Sınırlılıkları

Verapamilin apoptoz ve nekroz mekanizmalarına yönelik olarak, protein seviyesinde detaylı analizlerin yapılması ve daha fazla kanser hücre hattında deneylerin uygulanması.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Onaylayan Kurul: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu

Onay Tarihi: 27 Mart 2007

Karar No: 29

Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: E.U.; Veri toplama ve işleme: D.Y.; Analiz ve verilerin yorumlanması: D.Y., E.U.; Makalenin yazılması: D.Y., E.U.

Destek ve Teşekkür Beyanı:

Bu makalenin yazımında sağladığı destek için Uzm. Dr. Şeniz Korkmaz'a teşekkür ederim.

Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kısaltmalar

MI	: Minimum yaşam
MO	: İlaç uygulanmamış kontrol hücre grubu
MTT	: Metiltiazoltetrazolium
P-gp	: P-glikoprotein
TİK	: Test İlaç Konsantrasyon
MDR	: Çoklu İlaç Direnci
MDR1	: Çoklu ilaç direnci proteini 1
PI	: Propidyum iyodür

Kaynaklar

1. Makhoul I, Atiq M, Alwbari A, et al. Breast Cancer Immunotherapy: An Update. Breast Cancer (Auckl). 2018;12:1178223418774802. Published 2018 May 30. doi:10.1177/1178223418774802
2. Sachdev JC, Jahanzeb M. Use of Cytotoxic Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer: Putting Taxanes in Perspective. Clin Breast Cancer. 2016;16(2):73-81. doi:10.1016/j.clbc.2015.09.007
3. Gradishar WJ, Anderson BO, Abraham J, et al. Breast Cancer, Version 3.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2020;18(4):452-478. doi:10.6004/jnccn.2020.0016
4. Saloustros E, Mavroudis D, Georgoulas V. Paclitaxel and docetaxel in the treatment of breast cancer. Expert Opin Pharmacother. 2008;9(15):2603-2616. doi:10.1517/14656566.9.15.2603
5. Pandit B, Royzen M. Recent Development of Prodrugs of Gemcitabine. Genes (Basel). 2022;13(3):466. Published 2022 Mar 5. doi:10.3390/genes13030466

6. Lynce F, Nunes R. Role of Platinums in Triple-Negative Breast Cancer. *Curr Oncol Rep.* 2021;23(5):50. Published 2021 Mar 22. doi:10.1007/s11912-021-01041-x
7. Tang Y, Wang Y, Kiani MF, et al. Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2016;16(5):335-343. doi:10.1016/j.clbc.2016.05.012
8. Majidinia M, Yousefi B. Breast tumor stroma: A driving force in the development of resistance to therapies. *Chem Biol Drug Des.* 2017;89(3):309-318. doi:10.1111/cbdd.12893
9. Thomas C, Tampé R. Structural and Mechanistic Principles of ABC Transporters. *Annu Rev Biochem.* 2020;89:605-636. doi:10.1146/annurev-biochem-011520-105201
10. Karthika C, Sureshkumar R. P-Glycoprotein Efflux Transporters and Its Resistance Its Inhibitors and Therapeutic Aspects [Internet]. *Biomarkers and Bioanalysis Overview.* Intech Open; 2021. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.90430>
11. Waghay D, Zhang Q. Inhibit or Evade Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Cancer Treatment. *J Med Chem.* 2018;61(12):5108-5121. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01457
12. He C, Sun Z, Hoffman RM, et al. P-Glycoprotein Overexpression Is Associated With Cisplatin Resistance in Human Osteosarcoma. *Anticancer Res.* 2019;39(4):1711-1718. doi:10.21873/anticancerres.13277
13. Dong J, Yuan L, Hu C, et al. Strategies to overcome cancer multidrug resistance (MDR) through targeting P-glycoprotein (ABCB1): An updated review. *Pharmacol Ther.* 2023;249:108488. doi:10.1016/j.pharmthera.2023.108488
14. Xing H, Luo X, Li Y, et al. Effect of verapamil on the pharmacokinetics of hydroxycamptothecin and its potential mechanism. *Pharm Biol.* 2020;58(1):152-156. doi:10.1080/13880209.2020.1717550
15. Karwatsky J, Lincoln MC, Georges E. A mechanism for P-glycoprotein-mediated apoptosis as revealed by verapamil hypersensitivity. *Biochemistry.* 2003;42(42):12163-12173. doi:10.1021/bi034149+
16. Alper P, Salomatina OV, Salakhutdinov NF et al. Soloxolone methyl, as a 18βH-glycyrrhetic acid derivate, may result in endoplasmic reticulum stress to induce apoptosis in breast cancer cells. *Bioorg Med Chem.* 2021;30:115963. doi:10.1016/j.bmc.2020.115963
17. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(6):10.1101/pdb.prot095505. Published 2018 Jun 1. doi:10.1101/pdb.prot095505
18. Erturk E, Ari F, Akgün O, et al. (2021). Investigation of the efficacy of paclitaxel on some miRNAs profiles in breast cancer stem cells. *Turkish Journal of Biology* 45 (5): 613-623. <https://doi.org/10.3906/biy-2103-46>
19. Genel ME, Adacan K, Selvi S, et al. Apoptosis-inducing, anti-angiogenic and anti-migratory effects of a dinuclear Pd(II) complex on breast cancer: A promising novel compound. *Microvasc Res.* 2024;151:104619. doi:10.1016/j.mvr.2023.104619
20. Erturk E, Onur OE, Aydin I, Akgun O, Coskun D, Ari F. Targeting the epithelial-mesenchymal transition (EMT) pathway with combination of Wnt inhibitor and chalcone complexes in lung cancer cells. *J Cell Biochem.* 2023;124(8):1203-1219. doi:10.1002/jcb.30442
21. O. Akgun, M. Erkisa, F. Ari, Effective and new potent drug combination: histone deacetylase and Wnt/b-catenin pathway inhibitors in lung carcinoma cells, *J. Cell. Biochem.* 120 (2019) 15467e15482.
22. Cadagan D, Merry S. Circumvention of inherent or acquired cytotoxic drug resistance in vitro using combinations of modulating agents. *Anticancer Res.* 2013;33(10):4381-4387.
23. Guo Y, He W, Yang S, et al. Co-delivery of docetaxel and verapamil by reduction-sensitive PEG-PLGA-SS-DTX conjugate micelles to reverse the multi-drug resistance of breast cancer. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017;151:119-127. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.12.012
24. Uematsu N, Zhao Y, Kiyomi A, et al. Chemo-sensitivity of Two-dimensional Monolayer and Three-dimensional Spheroid of Breast Cancer MCF-7 Cells to Daunorubicin, Docetaxel, and Arsenic Disulfide. *Anticancer Res.* 2018;38(4):2101-2108. doi:10.21873/anticancerres.12450
25. Kars MD, Işeri OD, Gunduz U, et al. Reversal of multidrug resistance by synthetic and natural compounds in drug-resistant MCF-7 cell lines. *Chemotherapy.* 2008;54(3):194-200. doi:10.1159/000140462
26. Mohseni M, Samadi N, Ghanbari P, et al. Co-treatment by docetaxel and vinblastine breaks down P-glycoprotein mediated chemo-resistance. *Iran J Basic Med Sci.* 2016;19(3):300-309.
27. Jaferian S, Soleymaninejad M, Daraee H. Verapamil (VER) Enhances the Cytotoxic Effects of Docetaxel and Vinblastine Combined Therapy Against Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *Drug Res (Stuttg).* 2018;68(3):146-152. doi:10.1055/s-0043-117895
28. Li P, Zhong D, Gong PY. Synergistic effect of paclitaxel and verapamil to overcome multi-drug resistance in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;516(1):183-188. doi:10.1016/j.bbrc.2019.05.189
29. Yan X, Hou M, Li SF, et al. Experimental study on thermochemotherapy combined with Verapamil for reversing the multidrug resistance responsible to breast cancer cell. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2008 May;39(3):391-3.
30. Zhao L, Zhao Y, Schwarz B, et al. Verapamil inhibits tumor progression of chemotherapy-resistant pancreatic cancer side population cells. *Int J Oncol.* 2016;49(1):99-110. doi:10.3892/ijo.2016.3512
31. Nandi SK, Roychowdhury T, Chattopadhyay S, et al. Dereglulation of the CD44-NANOG-MDR1 associated chemoresistance pathways of breast cancer stem cells potentiates the anti-cancer effect of Kaempferol in synergism with Verapamil. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2022;437:115887. doi:10.1016/j.taap.2022.115887
32. Kayouka M, Hamade A, Saliba E, et al. P-glycoprotein modulates oleonic acid effects in hepatocytes cancer cells and zebrafish embryos. *Chem Biol Interact.* 2020;315:108892. doi:10.1016/j.cbi.2019.108892
33. Ari F, Napieralski R, Ulukaya E, et al. Modulation of protein expression levels and DNA methylation status of breast cancer metastasis genes by anthracycline-based chemotherapy and the demethylating agent decitabine. *Cell Biochem Funct.* 2011;29(8):651-659. doi:10.1002/cbf.1801