Derleme / Araştırma Makalesi Review / Research Article

Türk Doğa ve Fen Dergisi
Turkish Journal of Nature and Science
www.dergipark.gov.tr/tdfd

5-Fluorourasil (5-FU) ve C_{60} Nanopartikülünün Meme Kanseri (MCF-7) Hücre Hattı Üzerine Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması

Havva AYBEK[1], Can Ali AĞCA[2], Mehmet ÇİFTCİ[3*]

[1] Bingöl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri MYO, Eczane Hizmetleri Bölümü, Türkiye
[2] Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Türkiye
[3] Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Türkiye
Havva AYBEK ORCID No: 0000-0002-3831-4780
Can Ali AĞCA ORCID No: 0000-0002-0244-3767
Mehmet ÇİFTCİ ORCID No: 0000-0002-1748-3729

**Sorumlu Yazar: mciftci@bingol.edu.tr*

(Alınış: 17.09.2020, Kabul: 02.12.2020, Online Yayınlanma: 30.12.2020)

Anahtar Kelimeler
Meme kanseri, 5-FU, C_{60}, ROS, apoptosis

Öz: Meme kanseri dünyanın hemen her bölgesinde kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. Kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. 5-Fluorourasil (5-FU) urasil ile aynı taşıma mekanizmasını kullanarak hücrelere girmeyi hedefleyen, hidrojenin yerine C-5 pozisyonunda bir flor atomu olan bir pirimidin analoğudur. C_{60} fulleren, antioksidan ve antitümör potansiyeli olan bir nanopartiküldür ve 5-FU'ya hücre tepkilerini modüle etmede faydalı olabilir. p53 proteini tümör gelişimini baskılayan bir transkripsiyon faktörü, TIGAR esas olarak glukoz metabolizmasının düzenleyicisi olarak işlev görür. Bu çalışmada 5-FU, C_{60} ve 5-FU+C_{60} kombinasyonunun MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri WST-1 analizi ile gerçekleştirildi. Ek olarak, DCFDA kullanılarak reaktif oksijen türleri düzeylerinin tespiti araştırıldı. Çalışmamızda zamana ve konsantrasyona bağlı olarak 5-FU'nun MCF-7 hücre canlılığını inhibe ettiği, C_{60} nanopartikülünün MCF-7 hücreleri üzerine tek başına uygulanması sonucunda anlamlı bir etkinin olmadığı görüldü. 5-FU+C_{60}'ın birlikte kullanımının ise hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin olduğu gösterildi. Öte yandan hücreler üzerine 5-FU, C_{60} ve 5-FU+C_{60} uygulamalarının ROS düzeylerinde anlamlı bir fark (artma ya da azalma) oluşturmadıkları belirlendi. İlaveten p53 ve TIGAR proteinlerinin ekspresyon düzeyleri Western Blot yöntemi ile incelenerek hücreler üzerindeki apoptotik etkileri araştırıldı. 5-FU ve 5-FU+C_{60} gruplarında p53 gen ekspresyonunun arttığı görüldü. 5-FU+C_{60} kombinasyonunun TIGAR ifadesini indükleyerek hücrelerin apoptoza gitmesine yardımcı olduğu gözlendi.

Investigation of Cytotoxic and Apoptotic Effects of 5-Fluorouracil (5-FU) and C_{60} Nanoparticle on Breast Cancer (MCF-7) Cell Line

Keywords
Breast cancer, 5-FU, C_{60}, ROS, apoptosis

Abstract: Breast cancer is the most common cancer among women in almost every part of the world. It ranks second after lung cancer in cancer-related deaths. 5-Fluorouracil (5-FU) is a pyrimidine analogue with a fluorine atom instead of hydrogen at the C-5 position, aiming to enter cells using the same transport mechanism as that of uracil. C_{60} fullerene is a nanoparticle with antioxidant and antitumor potential and can be useful in modulating cell responses to 5-FU. p53 proteins are a transcription factor suppressing tumor growth and TIGAR acts primarily as a regulator of glucose metabolism. In this study, cytotoxic effects of 5-FU, C_{60} and 5-FU+C_{60} combination on MCF-7 human breast cancer cells were analyzed using WST-1 analysis. Moreover, detection of reactive oxygen species levels was investigated using DCFDA. In our study, it was observed that 5-FU inhibited MCF-7 cell viability depending on time and concentration, and no significant effect was observed through application of C_{60} nanoparticle alone on MCF-7 cells. 5-FU + C_{60} combination had a cytotoxic effect on cells. However, 5-FU, C_{60} and 5-FU + C_{60} applications on the cells did not cause a significant difference (increase or decrease) in ROS levels. Additionally, p53 and TIGAR protein expression levels were examined by Western Blot method and apoptotic effects on cells were investigated. p53 gene expression increased in 5-FU and 5-FU+C_{60} groups. It was observed that the combination of 5-FU+C_{60} induced TIGAR expression and helped cells to go to apoptosis.

1. GİRİŞ

Kanser hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünerek normal hücre döngüsünde değişimlere neden olan bir hastalık olarak tanımlanabilir. Sağlıklı hücreler sürekli olarak düzenli bir şekilde bölünmeleri, bulundukları bölgeden ayrılmaları ya da ölmeleri gerektiğini belirten sinyaller alırlar. Anormal hücreler hücre döngüsünden bağımsız hareket ederek düzensiz bölünüp çoğalmaya, büyümeye ve ileriki evrelerde metastaz yapmaya neden olurlar [1]. Dünyada tanımlanmış kanser vakalarının %25'ini meme kanseri teşkil etmekte ve kadınlarda buna bağlı ölümlerin %15'ini yaygın ölümcül tümörler oluşturmaktadır. Son yıllarda bu tür kanserlerin (malignadeno karsinom) görülme sıklığı çeşitli faktörlerin etkisiyle giderek artmaktadır [2]. Meme kanserine neden olan çok sayıda faktör belirtilmiştir. Bunlar arasında; yaş, aile öyküsü, genetik faktörler, erken yaşta menarş-geç menopoz gibi durumlardan kaynaklı östrojen hormonu etkisinde kalma süresi, hamilelik, beslenme, alkol alımı, sigara, radyasyona maruz malignadeno karsinom epitel hücrelerinden kalma gibi etkenler sayılabilir [3]. Meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) 1970 yılında beyaz ırk bir bayanın meme dokusundaki epitel hücrelerinden elde edilmiştir. MCF-7 yapışkan ve tek katmanlı büyüyen bir hücre hattıdır.

5-FU ise urasil analoğu olan bir antimetabolittir [4]. 5-FU hücrelere urasilin taşıma sistemi aracılığıyla girer. 5-FU hücre içerisinde çeşitli, aktif metabolitlerine dönüştürülerek ((Floro deoksi üridin monofosfat (FdUMP), floro deoksi üridin trifosfat (FdUTP) ve floro ürüdin trifosfat (FdUTP)) RNA sentezi fonksiyonunun inhibisyonuna, timidilat sentaz aktivitesinin inhibisyonuna ve hücre döngüsünde S fazına etki ederek DNA hasarına neden olup antikanser özelliğini göstermektedir [5]. 1985 yılında keşfedilen C_{60}fullerene, küresel bir yapı içinde düzenlenmiş 60 karbon atomuna sahip bir nanopartiküldür. Küçük boyutlarından ve hidrofobik özelliklerden dolayı fullerenler tıbbi ilaçların tasarımı için bir baz olarak veya öncü bileşik olarak kullanılır [6]. C_{60}fullerene son zamanlarda antikanser tedavisinde kullanım için umut verici bir ajan olarak kabul edilmiştir. C_{60}fullerene ve türevleri biyouyumlu, düşük konsantrasyonlarda normal dokular üzerinde toksik etki göstermeyen, güçlü serbest radikal tutucu ve antioksidan özelliğe sahiptir [7]. p53 tümör baskılayıcı yolu, genomik stabiliteyi korumak ve tümör oluşumunu önlemek için DNA onarımı, hücre döngüsünün oluşmasını, apoptoz ve yaşlanmayı koordine eder. p53, DNA hasarı çok ciddi olduğunda ve onarımı imkânsız olduğunda apoptozu tetikler [8]. Hücre döngüsü durması ve apoptozis p53 aktivasyonunun en sık görülen sonuçlarından olup ayrıca, p53 metabolizma ve antioksidan cevap gibi hücresel işlemleri düzenler [9]. Apoptozis, hücrenin programlanmış hücre ölümü için doğal mekanizmasıdır. Özellikle uzun ömürlü memelilerde, homeostazın yanı sıra gelişiminde kritik bir rol oynadığı için çok önemlidir. Apoptozis gereksiz veya istenmeyen hücrelerin yok edilmesine hizmet eder ve oldukça düzenli bir işlemdir. DNA hasarı veya kontrolsüz çoğalma dahil olmak üzere apoptotik yolun aktive olmasına neden olacak çok çeşitli koşullar vardır. Apoptotik yol hem hücre içi hem de hücre dışı sinyallerle aktive edilir. Apoptoziye yol açan iki farklı yol vardır: sinyal tipi ile ilişkili olan içsel ve dışsal yollar. Bu yolaklar ayrıca mitokondriyal ve ölüm reseptörü yolları olarak da adlandırılabilirler. Hücre içi sinyaller, DNA hasarı, büyüme faktörü yoksunluğu ve sitokin yoksunluğunu içerirken, en yaygın hücre dışı sinyaller, bağışıklık sisteminden sitotoksik T hücreleri tarafından zarar görmüş veya enfekte olmuş hücrelere yanıt olarak üretilen ölüme neden olan sinyallerdir [10].

Reaktif oksijen türleri (ROS), moleküler oksijenden türetilen (O_2) yüksek oranda reaktif iyon ve moleküllerin heterojen bir grubudur. Önemli ROS'lardan bazıları şunlardır; hidroksil radikali (.OH), süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) gibi serbest radikalleri, ayrıca hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi radikal olmayan molekülleri içerir [11]. Alternatif olarak ROS hücre ölümü ve sinyalleşmede önemli rol oynar. ROS, DNA hasarını tetikleyerek kendine özgü apoptozu tetikler [12]. TIGAR, (TP53 ile indüklenen glikoliz ve apoptoz düzenleyicisi) glikolizi düzenleyen ve oksidatif strese karşı koruma sağlayan p53 ile indüklenebilir bir proteindir [13]. TIGAR, GSH seviyelerini koruyarak ROS ve apoptoz düzenleyicisi olarak kurulan metabolik bir enzimdir. TIGAR, hücresel fruktoz 2,6-bisfosfat seviyesini düşürerek glikolizi bloke eder ve buda fosfofruktokinaz (PFK) aktivitesinin inhibisyonuna yol açar. TIGAR ayrıca, besin ve metabolik strese cevap olarak hücre içi ROS'u modüle eder [14]. Bu çalışmada 5-fluorourasil ve C_{60} nanopartikülünün meme kanseri hücre hattı üzerine sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Kimyasallar

5-FU (5-florourasil), C_{60} (fullerene), insan MCF-7 meme kanseri hücreleri, Bingöl Üniversitesi Kanser Araştırma Merkezi (BUCR) tarafından sağlandı. Roswell Park Memorial Institute besi yeri (RPMI 1640), penisilin/streptomisin, fetal sığır serumu (FBS) ve fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) Lonza firmasından; tripan mavisi, Tris HCI, tripsin-EDTA, dimetilsülfoksit (DMSO), tetra metilen diamin (TEMED), sodyum azit (NaN_3), luminol, yağsız süt tozu, ponceau S, fosforik asit (H_3PO_4), p-kumarik asit, fenil metil sülfonil florür (PMSF), sodyum dodesil sülfat, bovin serum albümin (BSA) Sigma Aldrich firmasından; hidrojen peroksit (H_2O_2), sodyum hidroksit (NaOH), glisin, tween-20, β-merkapto etanol, etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), primer ve sekonder antikorlar, hücre canlılığı kiti WST1 (Boster, USA), DCFDA kiti (Abcam, USA) kitlerle yapılan analizler, üreticilerin protokollerine göre gerçekleştirildi.

2.2. Hücre Kültürü ve Hücrelerin Tedavi Edilmesi

Bu araştırmada insan meme kanseri (MCF-7) hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler, %10 fetal sığır serumu (Fetal

Bovine Serum; FBS), 64 µg/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin ile desteklenen RPMI 1640 (Roswell Park MemorialInstitute) besiyerinde %5 CO_2 içeren nemli ve 37°C'lik hücre kültür inkübatöründe çoğaltıldı. Hücreler 75cm^2'lik hücre kültür flasklarında yeterli sayıda çoğaltıldıktan sonra hücre canlılığının değerlendirilmesi için, tripan blue ile boyanarak sayım yapıldı. Hücreler 96'lık well platette 3.000 hücre olacak şekilde besiyeri ortamında ekildi. Tedavi için 5-FU ve C_{60}'ın stok solüsyonları hazırlandı. Bu stok solüsyonlar RPMI ortamında seyreltildi. 5-FU'nun ; 25, 50, 100, 250 ve 500 µM konsantrasyonları, C_{60}'ın ; 100, 250, 500 ve 1000 nM ve 5-FU+C_{60} kombinasyonları hazırlanarak hücreler 24 saat boyunca tedavi edildi.

2.3. Hücre Canlılığı

MCF-7 meme kanser hücrelerinin canlılığı WST-1(4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) tahlil kiti (Boster, USA) ile değerlendirildi. Bunun için inkübasyon sonrası hücrelerin bulunduğu kuyulara 10µl WST-1 eklendi. 4 saat 37ºC'de %5 CO_2'li inkübatörde inkübe edildi. Dört saat sonra ELISA mikroplaka okuyucusu (Spectra Max 384 Plus) kullanılarak 420-480 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü

2.4. *In Vitro* ROS/RNS Deneyi

Bu deney, hücre kültüründe oksidatif stres parametreleri olarak bilinen hidrojen peroksit, nitrik oksit, peroksil radikali ve peroksinitrit anyonlarını da içeren toplam reaktif oksijen ve nitrojen türlerini *in vitro* olarak ölçmemize imkân sağladı. Hücre kültürü örneklerinin hazırlanması ve hücre kültüründe oksidatif strese bağlı ROS ve RNS oluşumu *in vitro* ROS/RNS deney kiti kullanılarak ve kit protokolüne göre florometrik yöntemle belirlendi. Bu deneyde 96'lık well plate içerisine 25x10^3 hücre olacak şekilde ekildi ve bu işlem üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Hücre ekiminden sonra 24 saat beklendi. 5-FU (25, 50, 100, 250 ve 500 µM) ve C_{60} (100, 250, 500 ve 1000 nM) için belirlenen konsantrasyonlar uygulandı. 24 saat sonrasında besiyeri çekilerek her kuyucuğa 100 µl seyreltme tamponu çözeltisinden eklendi. Ardından 1X seyreltme tamponu çektirildi ve 100 µl DCFDA çözeltisinden eklendi. 45 dakika boyunda 37°C'de karanlıkta inkübe edildi. Sonra DCFDA çözeltisi çektirilip her bir kuyucuk 100 µl 1X tampon ile yıkanır. ELISA-reader'da 485/535 nm'de sonuçlar alındı.

2.5. Protein İzolasyonu ve Western Blot Analizi

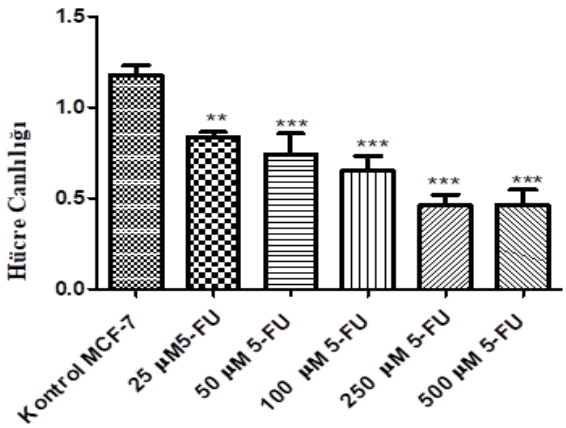
Hücreler, 24 saatlik tedaviden sonra soğuk PBS ile üç kez yıkanarak plastik kazıyıcıyla toplanıp numaralandırılmış mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. 6600 rpm'de 10 dakika santrifüj işleminden sonra lizis (RIPA) tamponunda eritildikten sonra buz üzerinde 60 dakika inkübe edildi. Bütün hücre lizatları, 15 dakika boyunca 15.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantlardaki protein içeriği, standart olarak BSA kullanılarak spektrofotometrede 595 nm'de absorbansları ölçüldü. (Biomethod-GBC (Bradford)). Eşit miktarda toplam protein ekstraktları %12'lik SDS-PAGE ve PVDF membranlarına transfer edildi. Membrandaki gözeneklerin kapanması için BSA ile blokaj yapıldı. Daha sonra membran primer antikorlar ile inkübasyon edildi (B-aktin: 1:500), (p53: 1:500), (TIGAR:1:1000). Membranlar daha sonra horseradish peroksidaz ile konguje olan sekonder antikor ile inkkübe edildi. Ardından 5 kez 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı. Membranlar X-Ray cihazı ile görüntülenmek üzere sonuçlar kemilüminisans yöntemi ile tespit edildi.

2.6. İstatiksel Analiz

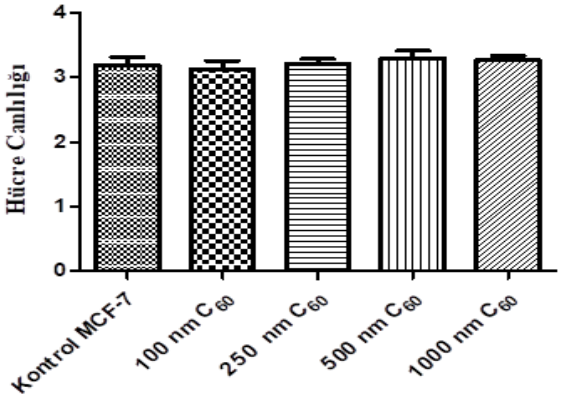
Tüm veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. Verilerin istatiksel değerlendirilmeler Anova Tukey (tek yönlü= one-way) ile analiz edildi. Sonuçlar n= 3 için ortalama ± SEM'dir. Önemli farklılıklar (* p <0.05, ** p <0.01 ve *** p <0.001) ile gösterildi.

4. BULGULAR

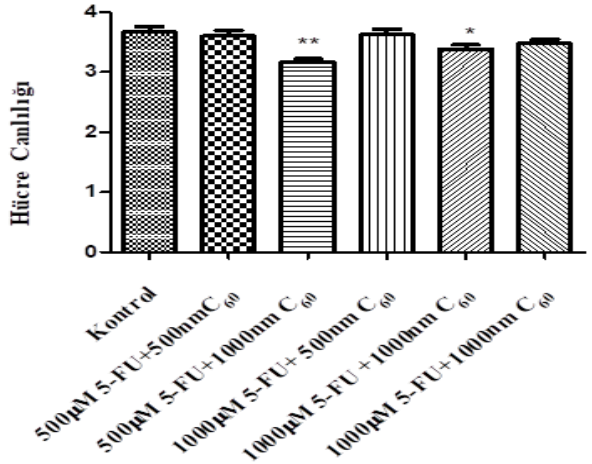
Öncelikle hücreler, %10 FBS ve %1 streptomisin/penisilin ile takviye edilmiş RPMI-1640 ortamında, 37°C sıcaklık ve %5 CO_2 içeren bir hücre kültürü inkübatöründe çoğaltıldı. Bu iş için hücreler 24 saat boyunca (25, 50, 100, 250 ve 500 µM)'lık dozlarda 5-FU ile tedavi edildi (Şekil 1). Daha sonra 24 saat boyunca 100, 250, 500 ve 1000 nM'lik dozlarda C_{60} fulleren ile muamele edildi (Şekil 2). Ayrıca MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine çeşitli dozlarda 5-FU+C_{60} kombinasyonları uygulandı. Uygulanan bu tedaviden sonra hücre canlılığı WST-1 metodu ile değerlendirildi (Şekil 3). Ayrıca MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin 5-FU, C_{60} ve 5-FU + C_{60}'a verdikleri ROS tepkileri Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 6'da verildi. İlaveten hücre ölümlerinin apoptozis olup olmadığı Şekil 7 ve Şekil 8'de gösterildi.



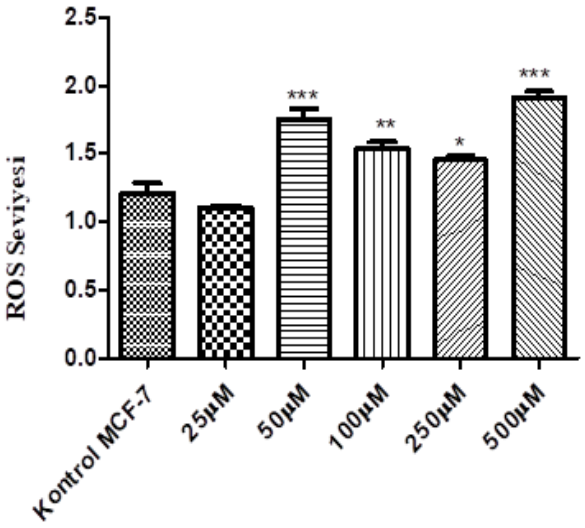
Şekil 1. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin 5-FU ile muamelesi sonucu elde edilen hücre canlılığı grafiği. (İlaç doz değerleri: 25, 50, 100, 250 ve 500 µM)



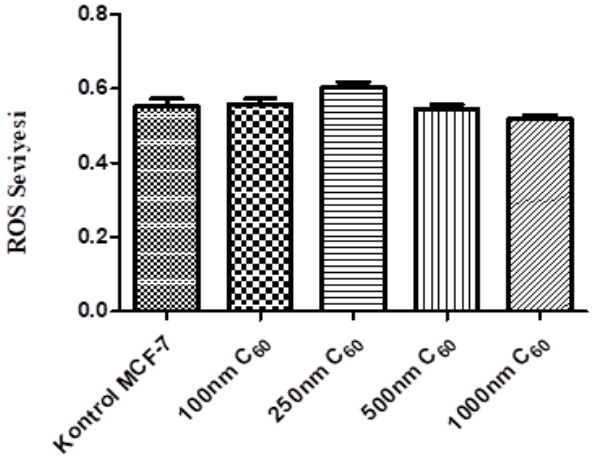
Şekil 2. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin C_{60} ile muamelesi sonucu elde edilen hücre canlılığı grafiği. İlaç doz değerleri (C_{60}): 100, 250, 500 VE 1000 nM.



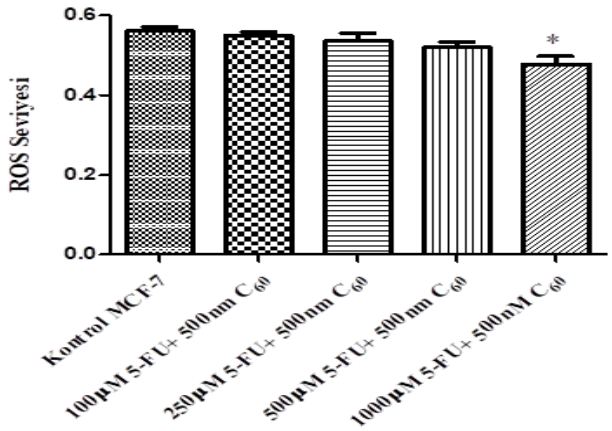
Şekil 3. MCF-7 meme kanseri hücreleri 5-FU+C_{60} ile muamelesi sonucu elde edilen hücre canlılığı grafiği. İlaç doz değerleri 5-FU: 500 µgmL^{-1},1000 µg.mL^{-1} ve C_{60}: (500 nM) kombinasyonları ile 5-FU: 500 µg.mL^{-1}, 1000 µg.mL^{-1} ve C_{60}: (1000 nM) kombinasyonları uygulandı.



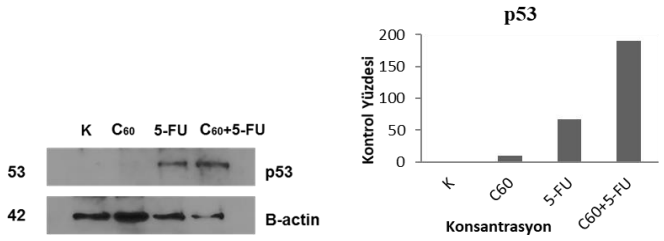
Şekil 4. 5-FU'in MCF-7 hücre hattında ROS düzeyi sonuçları grafiği.



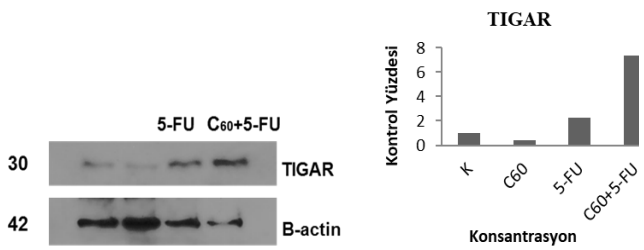
Şekil 5. C_{60} fullerenin MCF-7 hücre hattında ROS düzeyi sonuçları grafiği.



Şekil 6. 5-FU + C_{60} kombinasyonunun MCF-7 hücre hattında ROS düzeyi sonuçları grafiği.



Şekil 7. 24 saatlik ilaç uygulaması sonrası Western Blot yöntemiyle p53, B-Aktin tayini grafiği. **1**-Kontrol, **2**-C_{60}, **3**- 5-FU, **4**- 5FU + C_{60}. (B-Aktin 42 kDa, p53 53 kDa).



Şekil 8. 24 saatlik ilaç uygulaması sonrası Western Blot yöntemiyle, TIGAR, B-Aktin tayini. **1**- Kontrol, **2**- C_{60}, **3**- 5-FU, **4**- 5-FU + C_{60} (B-Aktin 42 kDa, TIGAR 30 kDa).

4. TARTIŞMA

5-FU (5-Fluorourasil) kemoterapide kanser tedavisinde kullanılan bir urasil analoğu olup, tümör hücrelerinde sitotoksik etkisini metabolitler aracılığıyla hem DNA hem de RNA sentezini etkileyerek gösteren bir bileşiktir [13]. 5-FU'nun kanser hücrelerinde proliferasyonunu inhibe ettiğini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Örneğin J. Cai ve ark. 5-FU ile tedavi edilmiş insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinde farklı şekilde eksprese edilen proteinlerin analizi üzerine yaptıkları çalışmada doza bağlı olarak 5-FU'nun tedavisinin hücre büyümesini inhibe ettiğini gösterilmiştir [14]. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada 5-FU'nun anti tümör etkilerini gösterip MCF-7 meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği tespit edilmiştir [15].

Çalışmamızda anti-proliferatif ve anti kanserojenik özellikleri bilinen 5-FU, C_{60} ve 5-FU+C_{60} kombinasyonunun MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri WST-1 analizi ile gösterilmesi amaçlandı. Ek olarak, DCFDA kullanılarak reaktif oksijen türleri düzeylerinin tespiti de araştırıldı. Çalışma neticesinde 24 saat süreyle 5-FU ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerine uyguladığımız WST-1 analizi sonuçlarından, hücre yoğunluğunun kontrol grubuna göre azaldığı, C_{60} ve 5-FU+C_{60} kombinasyonunun hücre yoğunluğuna kontrol grubuna göre önemli bir etkiye sahip olmadığı tarafımızdan tespit edildi ve elde edilen sonuçların önceki çalışmalarla uyumlu olduğu gözlendi (Şekil 1, 2 ve 3) [14, 15]. Üç boyutlu şekilleri, doymamış bağları ve elektronik yapıları nedeniyle, C_{60} ve NP'ler biyokimya ve tıbbın çeşitli alanlarında kullanılabilecek benzersiz kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptir [16]. C_{60} fullerene, özellikle nanoteknolojideki geniş potansiyel uygulamaları yelpazesi nedeniyle son yıllarda yoğun bir şekilde araştırılmıştır [17]. Bu çalışmada C_{60}'ın sitotoksik etkileri MCF-7 hücre hattında WST-1 yöntemi ile araştırıldı (Şekil 2). Elde edilen bulgulara göre C_{60} nanopartikülünün tek başına uygulanması ile dikkate değer bir etki gözlenmedi. Çalışmamız diğer bulgularla karşılaştırıldığında çalışmamızı destekleyen sonuçların olduğu belirlendi. Fude Wang ve ark. yaptıkları çalışmada C_{60}'ın A549 hücrelerine kolayca girebildiğini ve A549 hücreleri üzerinde çok az doğrudan önemli toksisite gösterdiğini bildirmişlerdir [16]. Öte yandan Kaisar Raza ve ark. tarafından yapılan çalışmada MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde Naive C_{60}Fullerene'nin (Naive CF) 1mg/mL ve 10mg/mL konsantrasyonlarında önemli bir sitotoksisitenin bulunmadığı tespit edilmiştir [18].

Reaktif oksijen türleri (ROS) dış orbitallerinde eşleşmemiş elektronları bulunduran, radikal ve radikal olmayan türleri içeren reaktif moleküllerdir [19].Yüksek konsantrasyonlarda ROS; lipidler, membranlar, proteinler ve nükleik asitler gibi hücresel yapılara hasar verebilen bir faktördür [20]. ROS, genellikle kemoterapotik ilaçlara cevap olarak hücreler tarafından salınır ve sitotoksik olup DNA hasarına yol açabilmektedir [21]. Kanser hücreleri genellikle yüksek seviyelerde reaktif oksijen türlerine maruz kalır. Çalışmamızda 24 saat süreyle doza bağlı 5-FU, Fullerene C_{60} ve 5-FU+C_{60} grupları ile inkübe ettiğimiz MCF-7 hücrelerinin ROS seviyeleri incelendi (Şekil 4, 5 ve 6). Buna göre 5-FU ile işleme tutulan hücrede, konsantrasyona bağlı olarak ROS seviyelerinin arttığı tespit edildi. Chiara Focacetti ve ark. yaptıkları çalışmada HCMs ve endotel hücrelerinde doza ve zamana bağlı bağlı hücre içi ROS üretimini araştırmış ve 5-FU'nun ROS oluşumunu indüklediğini ve ROS üretiminde anlamlı bir artış olduğunu göstermişlerdir [21]. Suzuki ve ark. yaptıkları bir çalışmada ise insan pankreas kanseri kök hücrelerinin 5-FU ile tedavisinin hücre içi ROS üretimini arttırdığını bulmuşlardır [22]. Benzer şekilde Darsingry ve ark. 5-FU tedavisinin koleraktal kanser hücrelerinde hücre içi ROS'un verimli üretimine yol açtığını bulmuştur [23]. Fullerene C_{60} ve 5-FU+C_{60} ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinin ROS yoğunluğunda anlamlı bir değişikliğin olmadığı gözlemlendi.

Apoptoz, normal hücre devri, immün sistemin düzgün gelişimi ve işleyişi, hormona bağlı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü gibi çeşitli işlemlerin hayati bir bileşeni olarak kabul edilir [24]. p53, DNA hasarı, onkojen aktivasyonu ve besin yoksunluğu gibi birçok stres sinyali tarafından yüksek oranda indüklenebilir bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre döngüsü durması ve apoptozis p53 aktivasyonunun en belirgin sonuçlarıdır [25]. Çalışmamızda C_{60} (500 nM), 5-FU (500µM), 5-FU+C_{60} (500 nM+500µM) kombinasyonu ile muamele edilmiş insan meme kanseri MCF-7 hücre hattında p53 proteini 24 saat sonrasında Western Blotlama yöntemiyle analiz edildi. Elde edilen sonuçlara göre kontrol ve C_{60} gruplarında DNA'nın hasar görmediği gözlendiği için p53 ifadesinin az miktarda olduğu belirlendi. Fakat 5-FU ve 5-FU+C_{60} gruplarında DNA hasarı ve stresle karşılaşan hücreler olduğu gözlendiği için bu gruplar p53 protein ekspresyonunu arttırarak indüklendiği belirlendi (Şekil 7). TIGAR, hücresel fruktoz 2,6-bisfosfat seviyesini düşürerek glikolizini bloke eder ve bu da fosfofruktokinaz (PFK) aktivitesinin inhibisyonuna yol açar. TIGAR ayrıca besin ve metabolik strese cevap olarak hücre içi ROS'u modüle eder ve böylece ROS kaynaklı otofajiyi önler [26]. Aynı şekilde C_{60} (500 nM), 5-FU (500 µM), 5-FU + C_{60} (500 nM+500 µM) ile TIGAR proteini üzerine yapılan tedaviden 24 saat sonra sonuçlar Western Blotlama yöntemiyle analiz edildi. Elde edilen bu sonuçlara göre; MCF-7 meme kanseri hücre hattında 5-FU + C_{60} kombinasyonunda kontrole

oranla kayda değer oranda artış olduğu TIGAR ifadesini indükleyerek hücrelerin apoptoza gitmesine yardımcı olduğu düşünüldü (Şekil 8).

Sonuç olarak; MCF-7 meme kanseri hücre hattında 5-FU, C_{60} fulleren ve 5-FU+C_{60} kombinasyonunun etki mekanizmaları hücre canlılığı (WST-1), ROS seviyeleri ve Western blot ile TIGAR/p53 proteinlerinin ekspresyonları incelendiğinde TIGAR ve p53 protein seviyelerinde etkin bir artış olduğu gözlendi. TIGAR ve p53' ün apoptozu indükleme kabiliyeti kanser tedavisi için kullanılabilecek önemli bir antitümör potansiyeline sahiptir. P53 ve TIGAR hedefli tedavilerin gelecekteki başarısı, apoptoz ve hücre döngüsü işlevlerinin nasıl düzenlendiğini daha iyi anlamayı gerektirecektir.

Teşekkür

Bu çalışma Bingöl Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Bingöl Üniversitesi Projeler Koordinasyon Birimi (Proje numarası: BAP-FEF.2017.00.017).

KAYNAKLAR

[1] Majumder R, Parida P, Paul S, Basak P. *In vitro* and in silico study of aloe vera leaf extract against human breast cancer. Natural Product Research. 2020;34(16):2363-2366.

[2] Bozorgi A, Khazaei M, Khazaei MR. New findings on breast cancer stem cells: A review. Journal of Breast Cancer. 2015;18(4):303-312.

[3] Kutluk T, Kars A. Kanser Konusunda Genel Bilgiler. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser ve Savaş Daire Başkanlığı Yayınları (http://sbv.saglik.gov.tr/Ekutuphaane/kitaplar/kanser.pdf). 1. Baskı: Ankara; 2001.

[4] Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. Nature Reviews Cancer. 2003;3(5):330-338.

[5] Correia A, Silva D, Correia A, Vilanova M, Gärtner F, Vale N. Study of New Therapeutic Strategies to Combat Breast Cancer Using Drug Combinations. Biomolecules. 2018; 8(4):175.

[6] Li Z, Pan LL, Zhang FL, Wang Z, Shen YY, Zhang ZZ. Preparation and characterization of fullerene (C_{60}) amino acid nanoparticles for liver cancer cell treatment. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 2014;14 (6):4513-4518.

[7] Harhaji L, Isakovic A, Raicevic N, Markovic Z, Todorovic-Markovic B, Nikolic N, et al. Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nanocrystalline fullerene. European Journal of Pharmacology. 2007;568(1-3):89-98.

[8] Green DR, Chipuk JE. p53 and metabolism: Inside the TIGAR. Cell. 2006;126(1): 30-32.

[9] Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MNC, Nakano K, Bartrons R, et al. TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. Cell. 2006;126(1):107-120.

[10] Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A Target for anticancer therapy. International Journal of Molecular Sciences. 2018;19(2): 448.

[11] Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. Free Radical Research. 2010;44 (5):479-496.

[12] Yip NC, Fombon IS, Liu P, Brown S, Kannappan V, Armesilla AL, et al. Disulfiram modulated ROS–MAPK and NFκB pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties. British Journal of Cancer. 2011;104(10):1564-1574.

[13] Schilsky RL. Biochemical and Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil. Oncolgy. 1998;12(10):13-18.

[14] Cai J, Chen S, Zhang W, Wei Y, Lu J, Xing J, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in 5-fluorouracil-treated human breast cancer MCF-7 cells. Clinical and Translational Oncology. 2014;16 (7):650-659.

[15] Ge ZH, Wang ZX, Yu TL, Yang N, Sun Y, Hao CL, et al. Morphine improved the antitumor effects on Mcf-7 cells in combination with 5-fluorouracil. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2014;68(3):299-305.

[16] Wang F, Jin C, Liang H, Tang Y, Zhang H, Yang Y. Effects of Fullerene C_{60} Nanoparticles on A549 Cells. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2014;37(2):656-661.

[17] Lynchak OV, Prylutskyy YI, Rybalchenko VK, Kyzyma OA, Soloviov D, Kostjukov VV, et al. Comparative analysis of the antineoplastic activity of C_{60} fullerene with 5-fluorouracil and pyrrole derivative *in vivo*. Nanoscale Research Letters. 2017;12(1):1-6.

[18] Raza K, Thotakura N, Kumar P, Joshi M, Bhushan S, Bhatia A, et al. C_{60}-Fullerenes for delivery of docetaxel to breast cancer cells: A promising approach for enhanced efficacy and better pharmacokinetic profile. International Journal of Pharmaceutics. 2015;495(1):551-559.

[19] Hecht F, Pessoa CF, Gentile LB, Rosenthal D, Carvalho DP, Fortunato RS. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. Tumor Biology. 2016;37(4):4281-4291.

[20] Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic MM, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions. 2006;160(1):1-40.

[21] Focaccetti C, Bruno A, Magnani E, Bartolini D, Principi E, Dallaglio K, et al. Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. PLoS One. 2015;10(2):e0115686.

[22] Suzuki S, Okada M, Shibuya K, Seino M, Sato A, Takeda H, et al. JNK suppression of chemotherapeutic agents-ınduced ROS confers chemoresistance on pancreatic cancer stem cells. Oncotarget. 2015;6(1):458-470.

[23] Darsigny M, Babeu JP, Seidman EG, Gendron FP, Levy E, Carrier J, et al. Hepatocyte nuclear factor-4α promotes gut neoplasia in mice and protects

against the production of reactive oxygen species. Cancer Research. 2010;70(22):9423-9433.
[24] Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. Toxicologic Pathology. 2007;3 (4):495-516.
[25] Chen J. The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2016;6 (3):a026104.
[26] Kumar B, Iqbal MA, Singh RK, Bamezai RNK. Resveratrol inhibits TIGAR to promote ROS induced apoptosis and autophagy. Biochimie. 2015;118:26-35.