KLİNİK ÇALIŞMA / CLINICAL TRIAL
Ege Klin Tıp Derg 2022;60 (1):49-54

Triple Negatif Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Nrf2 Yolağı İnhibitörü ML385 ve İmidazol Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkileri

Effects of Combination of Nrf2 Pathway Inhibitor ML385 and Imidazole on Cell Viability in Triple Negative Breast Cancer Cell Lines

Erkan KAHRAMAN*0000-0003-0051-416X
Erdem GÖKER 0000-0001-6180-713X**

* Ege Üniversitesi, Atatürk Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İzmir, Türkiye,

** Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye,

Yazışma Adresi: Erkan KAHRAMAN
Atatürk Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Ege Üniversitesi, İzmir
e-mail: erkan.kahraman@ege.edu.tr

Geliş Tarihi: 15/02/2022
Kabul Tarihi: 16/03/2022

Öz

Amaç: Meme kanseri türleri içerisinde triple negatif meme kanseri en agresif türlerdendir. Günümüzde hala etkili bir sistemik tedavi seçeneği bulunmamaktadır. Son yıllarda antifungal ajan olarak olarak kullanılan imidazol'ün kanser tedavisinde etkili olabileceği gösterilmiştir. Ancak imidazol'ün antioksidan yolları baskılayan bir ajanla kombine edilmesinin triple negatif hücre dizilerindeki antikanser etkinliğini etkileyip etkilemediği bilinmemektedir. Çalışmamızda, antioksidan savunmada rol alan kritik bir molekül olan Nrf2'nin inhibitörü ML385 ile imidazol kombinasyonunun triple negatif meme kanseri hücre dizilerindeki antikanser etkinliğini araştırmayı amaçladık.

Yöntem: Çalışmamızda MDA-MB-231 (ER-/PR-/HER2-) triple negatif meme kanseri hücre dizileri kullanıldı. Kombinasyonel uygulama için ML385 1, 2 ve 4 µM, imidazol 1, 5, 10 ve 20 mM dozlarında hücrelere uygulandı. İmidazol ve ML385'in tek başına ve kombine bir şekilde uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi 72. saatte MTT analizi ile belirlendi. Kombinasyonel uygulamanın hücre morfolojisi üzerine etkileri ışık mikroskobu kullanılarak incelendi

Bulgular: MDA-MB-231 hücre dizilerinde tek başına 5 mM ve üzerindeki dozlarda imidazol uygulaması 72. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde hücre canlılığını azalttı($p<0.05$). Benzer bir şekilde ML385'de 1 µM ve üzerindeki dozlarda doz bağımlı bir şekilde hücre canlılığını istatistiksel olarak azalttı ($p<0.05$). Tek başına ML385 ve tek başına imidazol uygulanan gruplarla kıyaslandığında, 1 µM ML385 ile 5 mM ve üzeri dozlarda imidazol kombinasyonların uygulandığı gruplarda hücre canlılığının daha fazla azaldığı görüldü ($p<0.05$). Benzer etki 2 µM ML385 ile 5 mM ve üzeri dozlarda imidazol kombinasyonların uygulandığı gruplarda da görüldü ($p<0.05$). Tek başına uygulamalarda hücre morfolojisi 20 mM gibi yüksek dozlarda etkilenirken, kombinasyonel uygulamada hücre morfolojisinin 5 mM'lık dozdan itibaren değiştiği gözlendi.

Sonuç: Bulgularımız ML385'in imidazol ile kombinasyonunun, triple negatif meme kanseri hücre dizilerinde imidazol'ün antikanser etkisini güçlendirdiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: İmidazol, ML385, Nrf2

Abstract

Aim: Triple negative breast cancer is one of the most aggressive types of breast cancer and there is still no effective systemic treatment option. Recently years, it has been shown that imidazole, which was initially developed as an antifungal antibiotic, might be effective for cancer treatment. However, it is unknown whether the combination of imidazole with an agent, which suppresses antioxidant pathways, affects the anticancer activity in triple negative cell lines. In this study, we aimed to investigate of anticancer effect of combination of imidazole with ML385, which an inhibitor of Nrf2 that have critical role in antioxidant defence, in triple negative breast cancer cell lines.

Methods: MDA-MB-231 (ER-/PR-/HER2-) triple negative breast cancer cell lines were used in our study. For combinational treatment, ML385 and imidazole were treated to cells at doses 1, 2, 4 µM and 1, 5, 10, 20 mM, respectively. Effect of imidazole alone or in combination with ML385 on cell viability was determined using MTT analysis at 72 hours. Effects of combinational treatment on cellular morphology were examined under bright field microscope.

Results: Alone treatment of imidazole significantly decreased cell viability at 5 mM and above doses at 72 hours($p<0.05$). When compared to the groups treated with ML385 alone and imidazole alone, it was observed that cell viability decreased more in the groups which 1 µM ML385 with 5 mM and above doses of imidazole combinations were treated ($p<0.05$). Similar effect was observed in combinational treatment of ML385 (2 µM) with imidazole (5mM and above doses) ($p<0.05$). While cell morphology was affected at high doses such as 20 mM in alone treatments, it was observed that cell morphology changed at 5mM and above doses in combination treatments.

Conclusion: Our results indicate that combination of ML385 with imidazole enhances anticancer effect of imidazole in triple negative breast cancer cell lines.

Keywords: Imidazole, ML385, Nrf2

Giriş

Kadınlarda en çok görülen kanser türü olan meme kanseri, son yıllarda akciğer kanserini de geride bırakarak tüm kanser türleri içerisinde en fazla görülen kanser türü olmuştur. Dünya genelinde her yıl 2.3 milyon yeni olgu teşhis edilmekte ve kanser nedenli ölümler içerisinde ise 5. sırada yer almaktadır (1). Metastatik bir kanser türüdür ve sıklıkla kemik, karaciğer, akciğer ve beyin gibi uzak organlara yayılır (2). Hormon reseptörlerinin (HR) varlığı ya da insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 proteininin (HER2) aşırı ekspresyonuna göre meme kanseri dört majör moleküler alt tipe sınıflandırılır. Bunlar; ER+/PR+/HER2–, ER+/HER2+, ER–/HER2+ ve ER–/PR–/HER2– alt tipleridir. Bu alt tiplerin her biri insidans, terapötik yanıt, prognoz, tercihli organ metastazı açısından farklı risk faktörüne sahiptirler(3).

Meme kanseri alt tipleri içerisinde iyi tanımlanmış moleküler hedefler olmaması nedeniyle triple negatif meme kanseri (ER–/PR–/HER2–) en az terapötik seçeneğe sahiptir. Diğer alt tiplerle kıyaslandığında ise daha agresif ve daha fazla nüks yapma eğilimindedir (4). Son on yılda meme kanserinin önlenmesinde büyük ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen hala triple negatif meme kanserine karşı etkili tedaviler bulunmamaktadır. Bu nedenle yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi ve etkili, hedefli ajanların geliştirilmesine acilen ihtiyaç duyulmaktadır (5).

İmidazol 3 karbon ve 2 tane nitrojen atomundan oluşan beş üyeli heterosiklik bir halka sistemidir ve imidazol ailesinin en basit üyesi $C_3H_4N_2$ formülüyle ifade edilen imidazol çekirdeğinin kendisidir (6). Son yıllarda, başlangıçta bir anti-fungal ajan olarak keşfedilen imidazol türevlerinin antikanser etkileri gösterilmiş ve kanser tedavisi için umut verici sonuçlar ortaya koyduğu bildirilmiştir (7). imidazol'ün bu halkası kullanılarak birçok yeni bileşik sentezlenmiştir ancak imidazol çekirdeğinin triple negatif meme kanseri hücrelerindeki antikanser etkinliği bilinmemektedir.

Oksidatif stres birçok kanser türünde olduğu gibi meme kanseri progresyonunda da önemli bir rol oynamaktadır (8). Meme kanseri gelişiminde yüksek düzeyde serbest oksijen radikali yapımının arttığı ve katalaz aktivitesinin azaldığı bu durumun meme kanseri progresyonunda oksidatif stres hipotezini desteklediği ileri sürülmektedir (9). Kanser progresyonu başlama, gelişme ve ilerleme olmak üzere temelde üç aşamaya ayrılmaktadır ve oksidatif stres bu aşamaların hepsinin altında yatan moleküler mekanizmalarla ilişkili olabilir (10). Hücresel oksidatif stres ile mücadele de en önemli yolaklardan biri Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) yolağıdır (11). Bu yolağın çeşitli inhibitörlerle baskılanması kanser hücrelerini oksidan hasara karşı duyarlı hale getirebilmektedir (12). Bununla birlikte selektif bir Nrf2 inhibitörü olan ML385'in antikanser özellikte olan ilaçlarla birlikte kombine uygulamasının kanser hücrelerinde sinerjistik etki gösterdiği böylece uygulanan inhibitör ile birlikte verilen antikanser ajanında etkinliğinin arttığı belirlenmiştir(13). Bu nedenle antioksidan moleküller ile konvansiyonel terapilerin kombinasyonu meme kanserinde direnç gelişiminin üstesinden gelinmesi ve tedavi etkinliğini arttırılması için yararlı olabilir (14). Ancak ML385 ve kanser tedavisinde umut vadeden bir ajan olarak tanımlanan imidazol çekirdeğinin kombinasyonunun triple negatif hücre dizilerinde nasıl bir etki gösterdiği bilinmemektedir. Tüm bu verilerin ışığı altında, yapmış olduğumuz çalışma ile imidazol ve ML385 kombinasyonlarının triple negatif meme kanseri hücre dizilerinde antikanser etkinliklerini değerlendirmeyi amaçladık.

Materyal Metod

Hücre kültürü

Çalışmamızda kullanılan triple negatif meme kanseri hücre dizileri olan MDA-MB-231 (ER-/PR-/HER2-) hücre dizileri Amerikan Tip Hücre Kültür Koleksiyonundan (ATCC) ticari olarak satın alındı. MDA-MB-231 hücre dizileri %10 Fetal bovine serum (Biol. Ind. Kat.No: 01-121-1A), %1 L-glutamin (Biol. Ind. Kat.No: 03-020-1B), %1 100 µg/ml Penisilin/Streptomisin (Biol. Ind. Kat.No: 03-031-1B), içeren L-15 (Leibovitz's, Wisent Bio. Kat. No:323-050-CL) medyumu içerisinde 37°C'de, CO_2'siz inkübatörde kültüre edildi. İki günde bir besiyeri, taze besiyeri ile değiştirildi. Hücreler %80-90 konfluense ulaştığında pasajlanarak kültür sürdürüldü.

ML385 ve imidazol uygulaması

Imidazol (AppliChem, Kat. No: A1378) distile su içerisinde çözdürüldü. 0,22'lik membran filtreden geçirilerek sterilize edildi ve 1, 5, 10 ve 20 µM dozlarında uygulandı. ML385 (Selleckchem, Kat. No: S8790) 20 mM stok solüsyon olacak şekilde DMSO (Applichem, Kat No: A3672) içerisinde çözdürüldü. Hücrelere 1, 2 ve 4 µM dozlarında uygulandı. Kombinasyon analizi için, 24 saatliğine ML385 uygulamasını takiben hücrelere imidazol ile ML385 kombine bir şekilde uygulandı ve 72 saat süresince inkübe edildi.

Hücre canlılığı analizi

Hücre canlılığının tayini için MTT analizi gerçekleştirildi. MDA-MB-231 hücre dizileri 96 kuyulu mikroplakalara 2000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Hücreler imidazol ve ML385 ile hedeflenen süre boyunca kültüre edildikten sonra her bir kuyuya 15 µl MTT (Sigma, Kat. No: M5655) solüsyonu (5 mg/ml) eklendi ve 96 kuyulu hücre kültürü plakaları 4 saatliğine kültüre edildi. İnkübasyon sonunda her bir kuyu içerisindeki içerik çekilerek atıldı. Her bir kuyu içerisine 100 µl DMSO eklendi. Mikroplakalar 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak mikroplaka okuyucuda (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter Inc.) okutuldu. Hücre canlılıkları aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$Hücre\ canlılığı\ (\%) = \frac{\text{Uygulama yapılmış örnek absorbans değeri} - \text{blank}}{\text{Uygulama yapılmamış örnek absorbans değeri} - \text{blank}} x100$$

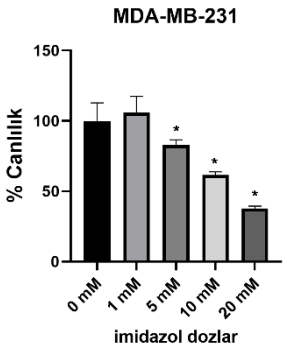
İstatistik

Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 8.4 istatistik yazılımında gerçekleştirildi. İki grup arasındaki farkın anlamlılık analizi için Student's t testi yapıldı. Üç ya da daha fazla grup arasındaki farkın anlamlılık analizi için One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) analizi kullanıldı. Post hoc testi olarak Tukey analizi gerçekleştirildi. Tüm veriler üç test ortalaması ± Standart sapma olarak verilmiştir.

Bulgular

İmidazol çekirdeği doz bağımlı bir şekilde MDA-MB-231 hücre dizilerinde hücre canlılığını azaltır.

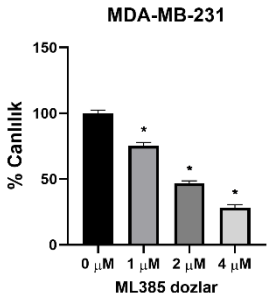
MDA-MB-231 hücre dizilerinde imidazol çekirdeğinin 72. saatte 5 mM dozdan itibaren hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı belirlendi ($p<0.05$) (Figür 1). Hücre canlılığı 5, 10 ve 20 mM imidazol dozunda sırasıyla %82,99±3,58, %61,39±2,43 ve %37,87±1,55'lere kadar düştüğü, diğer taraftan 1 mM'lık dozun hücreler üzerine mitojenik etkisi olduğu, ancak bu etki istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$). Sonuç olarak imidazol çekirdeğinin triple negatif meme kanseri hücre dizilerinde doz bağımlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı belirlendi.



Figür 1. *İmidazol'ün MDA-MB-231 hücre dizilerinde hücre canlılığına olan etkileri.* İmidazol meme kanseri hücrelerine 72 saat süresince uygulandı. MDA-MB-231 hücre dizilerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri MTT analizi ile değerlendirildi. Hata Barları: ± SD. *p<0.05

ML385 ***doz bağımlı bir şekilde MDA-MB-231 hücre dizilerinde hücre canlılığını azaltır.***

72 saatlik inkübasyon süresince, MDA-MB-231 hücre dizilerinde, Nrf2 sinyal yolağı inhibitörü olan ML385'in doz bağımlı olarak hücre canlılığını istatistiksel anlamlı bir şekilde azalttığı belirlendi ($p<0.05$). Hücre canlılığı 1, 2 ve 4 µM ML385 dozunda sırasıyla %75,15±2,69, %46,65±2,05 ve %28,15±2,47'lere kadar indiği görüldü (Figür 2).

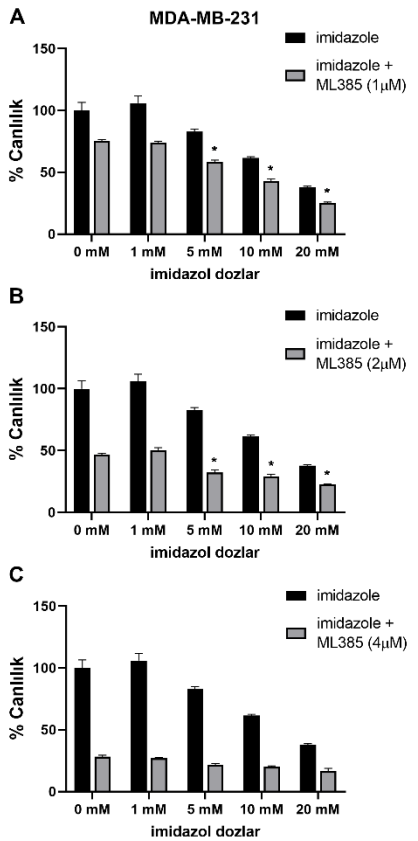


Figür 2. ML385'in meme kanseri hücre dizilerinde hücre canlılığına olan etkileri. ML385 meme kanseri hücrelerine 72 saat süresince uygulandı. MTT analizi ile MDA-MB-231 hücre dizilerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri belirlendi. Hata Barları: ± SD. *p<0.05

ML385 doz bağımlı bir şekilde imidazol çekirdeğinin antikanser etkisini arttırır.

24 saatlik ML385 inkübasyonu sonrası imidazol ve ML385 kombine bir şekilde hücrelere 72 saatliğine uygulandı. Kombinasyon dozları tek başına imidazol ve tek başına ML385 dozları ile karşılaştırıldı. Kombinasyon dozları ile karşılaştırmada tek başına hem ML385 hem de imidazol'ün ikisinin birden anlamlı bir şekilde hücre canlılığını etkilediği dozlar değerlendirildi.

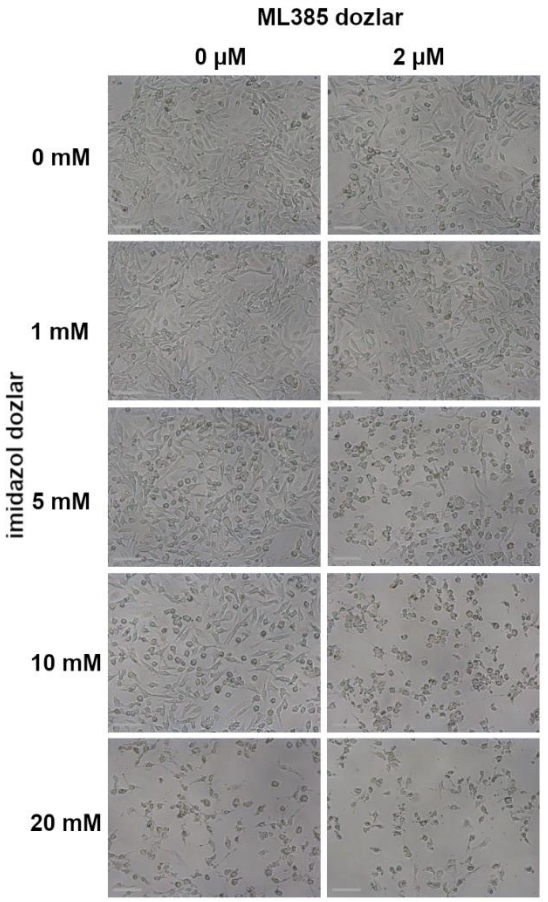
1 µM ML385 + 1 mM imidazol kombinasyonu ile tek başına ML385'in hücre canlılığının azalması üzerine etkileri kıyaslandığında, hücre canlılığındaki azalma değerleri ortalamaları arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$). Ancak 1 µM ML385 ile 5, 10 ve 20 mM imidazol kombinasyonunun, tek başına hem ML385 hem de tek başına imidazol uygulamasından istatistiksel olarak daha anlamlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı belirlendi ($p<0.05$) (Figür3A). Benzer etkinin 2 µM ML385 ile 5, 10 ve 20 mM imidazol dozlarının kombinasyonlarında da meydana geldiği görüldü (Figür3B). Diğer taraftan 4 µM ML385'in tek başına uygulamasının hücre canlılığını %28'lere kadar indirmesi nedeniyle, ML385'in imidazol dozları ile olan kombinasyonlarının hücre canlılığına olan etkileri değerlendirilemedi (Figür3C). Sonuç olarak ML385'in MDA-MB-231 hücre dizilerinde doz bağımlı bir şekilde imidazol'ün hücre canlılığı üzerine toksik etkisini güçlendirdiği belirlenmiştir.



Figür 3*. İmidazol ve ML385'in kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerine olana etkileri.* MDA-MB-231 hücre dizilerinde imidazol dozları ve ML385'in 1 µM (A), 2 µM (B) ve 4 µM (C) dozlarında kombine bir şekilde 72 saat uygulamasıyla hücre canlılıklarında meydana gelen değişimler MTT analizi ile değerlendirildi. Hata Barları: ± SD. *$p<0.05$

ML385, imidazol'ün hücre morfolojik değişimler üzerine olan etkisini güçlendirir.

MDA-MB-231 hücre dizileri imidazol ve ML385 (2 µM) uygulaması sonrasında ışık mikroskobu altında incelenerek meydana gelen morfolojik değişiklikler değerlendirildi. Buna göre tek başına 1, 5 ve 10 µM imidazol uygulanan gruplarda hücre morfolojisinin kontrol grubu ile benzer olduğu görüldü. Diğer taraftan 20 µM imidazol uygulanan gruptaki hücrelerin hücresel morfolojilerinin etkilenerek atasal morfolojiden uzaklaştığı, hücre-hücre kontaklarının yok olduğu, sitoplazmik volümlerinin azaldığı ve doz bağımlı bir şekilde sağlıksız bir görünüm aldığı belirlendi. Ancak imidazol ile kombine bir şekilde 2 µM dozunda ML385 uygulamasında ise bu etki 5 µM gibi çok daha düşük dozlardan itibaren görülmeye başlandı. Diğer taraftan ise tek başına ML385 uygulamasının hücre morfolojisini etkilemediği görüldü. Sonuç olarak ML385'in imidazol'ün hücre morfolojik değişimler üzerine olan etkilerini güçlendirdiği belirlenmiştir.



Figür 3*. İmidazol ve ML385'in kombine uygulamasının hücre morfolojisi üzerine olan etkileri.* MDA-MB-231 hücre dizilerinde tek başına imidazol (A) ve ML385 (2 µM) kombinasyonunun (B) hücre morfolojisine olan etkileri ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

Tartışma

Günümüzde triple negatif meme kanseri tedavisi için önerilen spesifik bir sistemik tedavi rejimi yoktur ve tedavi seçeneklerini belirlemek için çok az veri bulunmaktadır. Sekansiyel ya da kombine tedavi rejimlerinin uygulanması daha mantıklı bir seçenek olarak görünmektedir (15). Bu çalışma kombine bir şekilde de ML385 ve imidazol uygulamasının triple negatif meme kanseri hücre dizilerinde hücre canlılığı üzerine olan etkilerini gösterdik.

Antikanser etkileri sergilemesi ve terapötik bir ajan olması nedeniyle imidazol içeren antikanser ilaçların geliştirilmesi büyük ilgi görmektedir (16). Çeşitli çalışmalarda imidazol nükleusu içeren bileşiklerin antikanser etkileri belirlenmiş ve umut vadeden bir molekül olabileceği ileri sürülmüştür(17). Ayrıca *in vitro'*da imidazol nükleusunun HEC-1B hücre dizilerinde 50mM dozun 12 saatten sonra hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir (18). Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizilerinde ise doz ve zaman bağımlı bir şekilde hücre canlılığını baskıladığı belirlenmiştir (19). Çalışmamızda da benzer bir şekilde doz bağımlı olarak imidazol'ün MDA-MB-231 hücre dizisinde hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir.

Meme kanseri gelişimi ve progresyonunda oksidatif stres önemli bir yer almaktadır. Kanser progresyonunda oksidatif koşullarda sağ kalmayı başaran hücrelerin tümörojenik potansiyeli ve antikanser ilaçlara karşı direnç geliştirme kabiliyeti de artmaktadır (20). Oksidan miktarlarının eliminasyounda görev alan en önemli yolaklardan biri Nrf2 yolağıdır ve bu yolağın inhibitörü olan ML385'in kanser hücre dizilerine uygulanması antioksidan yolu baskılayarak hücresel oksidan miktarını arttırmaktadır. Çeşitli kanser hücre dizilerinde ML385'in doz bağımlı bir şekilde hücre canlığını azalttığı bildirilmiştir(21). Çalışmamızda da benzer bir şekilde triple negatif meme kanseri hücre dizilerinde ML385'in doz bağımlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. Hücresel oksidatif yolakların baskılanması antikanser ilaçların etkinliklerini arttırabilir (22).

Meme kanseri tedavisinde dikkatli bir şekilde seçilen ve uygulanan kombinasyonel tedaviler hastalara nüks, ilaç direnci ve toksik etkileri en aza indirirken veya ortadan kaldırırken aynı zamanda hastaların iyi bir yaşam kalitesine sahip olarak tedaviden maksimum fayda elde etme fırsatı sunar (23). Bununla birlikte imidazol'ün sekansiyel bir şekilde tamoksifenle kombinasyonunun östrojen ve progesteron reseptör pozitif meme kanseri hücre dizilerinde tamoksifenin antikanser etkisini güçlendirdiği bildirilmiştir (24). Ayrıca küçük hücre dışı akciğer kanseri hücrelerinde ML385'in paklitaksel ve karboplatinin sitotoksik etkisini arttırdığı da gösterilmiştir (25).

Çalışmamızda MDA-MB-231 hücre dizilerinde ML385 ile birlikte kombine bir şekilde imidazol uygulamasının etkilerini gösterdik. İmidazol ve ML385'in kombine bir şekilde uygulamasının, her iki ajanında tek başına uygulamasından daha etkili bir şekilde hücre canlılığını azalttığını belirledik. Ayrıca ML385 uygulanan hücrelerde imidazol'ün daha düşük dozlardan itibaren hücre morfolojisini etkilediğini ortaya koyduk.

Sonuç olarak çalışmamızda ML385'in imidazol ile birlikte uygulanmasının imidazol nükleusunun antikanser etkilerini güçlendirdiği belirlenmiştir. Verilerimiz ML385 ve imidazol kombinasyonunun tedavi seçenekleri sınırlı olan triple negatif meme kanserinde umut verici sonuçlar ortaya koyabileceğini göstermektedir.

Kaynaklar

1.*Sung H, Ferlay J, Siegel RL ve ark. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin 2021;71:209-249.*

2.*Lee YT. Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy. J Surg Oncol 1983;23:175-180.*

3.*Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? Journal of clinical oncology 2005;23:7350-7360.*

4.*Dent R, Trudeau M, Pritchard KI ve ark. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. Clinical cancer research 2007;13:4429-4434.*

5.*Tong CWS, Wu M, Cho WCS, To KKW. Recent Advances in the Treatment of Breast Cancer. Frontiers in Oncology 2018;8:*

6.Hofmann K Imidazole and its derivatives, Part 1 John Wiley & Sons, 2009

7.*Refaat HM. Synthesis and anticancer activity of some novel 2-substituted benzimidazole derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry 2010;45:2949-2956.*

8.Devi GR, Allensworth JL, Evans MK, Sauer SJ Chapter 1 - The Role of Oxidative Stress in Breast Cancer San Diego:Academic Press, 2014

9.*Tas F, Hansel H, Belce A ve ark. Oxidative stress in breast cancer. Medical Oncology 2005;22:11-15.*

10.*Weitzman S, Gordon L. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. Blood 1990;76:655-663.*

11.*Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. Annual review of pharmacology and toxicology 2013;53:401-426.*

12.*Cai SJ, Liu Y, Han S, Yang C. Brusatol, an NRF2 inhibitor for future cancer therapeutic. Cell & Bioscience 2019;9:45.*

13.*Hill KS, McDowell A, McCorkle JR ve ark. KEAP1 Is Required for Artesunate Anticancer Activity in Non-Small-Cell Lung Cancer. Cancers 2021;13:1885.*

14.*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;37:4281-4291.*

15.*Cleator S, Heller W, Coombes RC. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. The Lancet Oncology 2007;8:235-244.*

16.*Ali I, Lone MN, Aboul-Enein HY. Imidazoles as potential anticancer agents. MedChemComm 2017;8:1742-1773.*

17.*Ferri N, Cazzaniga S, Mazzarella L ve ark. Cytotoxic effect of (1-methyl-1H-imidazol-2-yl)-methanamine and its derivatives in PtII complexes on human carcinoma cell lines: A comparative study with cisplatin. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2013;21:2379-2386.*

18.*Liu Z, Wang Y, Zhao S, Zhang J, Wu Y, Zeng S. Imidazole inhibits autophagy flux by blocking autophagic degradation and triggers apoptosis via increasing FoxO3a-Bim expression. International journal of oncology 2015;46:721-731.*

19.*Kahraman E, Goker E. Antifungal imidazole: Potential new antineoplastic agent-cytotoxic effects on non-small cell lung cancer cell lines (A549). Journal of clinical oncology 2021;39:e21037-e21037.*

20.*Mahalingaiah PKS, Singh KP. Chronic Oxidative Stress Increases Growth and Tumorigenic Potential of MCF-7 Breast Cancer Cells. PLOS ONE 2014;9:e87371.*

21.*Singh A, Venkannagari S, Oh KH ve ark. Small Molecule Inhibitor of NRF2 Selectively Intervenes Therapeutic Resistance in KEAP1-Deficient NSCLC Tumors. ACS Chemical Biology 2016;11:3214-3225.*

22.Radharani NNV, Kundu IG, Yadav AS, Kundu GC Oxidative Stress Singapore:Springer Singapore, 2020

23.*Fisusi FA, Akala EO. Drug combinations in breast cancer therapy. Pharmaceutical nanotechnology 2019;7:3-23.*

24.*Inci T, Kahraman E, Goker E. Sequential usage of imidazole followed by tamoxifen to enhance the anticancer effect of tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer cell lines. Journal of clinical oncology 2021;39:e15057-e15057.*

25.*Singh A, Venkannagari S, Oh KH ve ark. Small molecule inhibitor of NRF2 selectively intervenes therapeutic resistance in KEAP1-deficient NSCLC tumors. ACS Chemical Biology 2016;11:3214-3225*

.