

Deneysel Araştırma

EF24'ün Doksetaksel ile Sıralı Uygulamasının Metastatik Meme Kanseri Hücre Hattına Etkisi

Atiye Seda YAR SAĞLAM^{1,a}, Zübeyir ELMAZOĞLU², Handan KAYHAN³, Hacer İlke ÖNEN¹, Akın YILMAZ⁴, Emine Sevda MENEVŞE¹

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

³Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

⁴Hittit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Çorum, Türkiye

ÖZET

Amaç: Taksan sınıfı antineoplastik bir ajan olan doksetaksel, son yılların en önemli kemoterapötik ajanlarından biridir. Günümüzde, meme kanseri tedavisi için klasik kemoterapi ajanlarının yeni moleküller ile birlikte kullanılması sonucu daha etkili tedavi seçenekleri belirlenmeye çalışılmaktadır. Bu moleküllerin bir tanesi de sentetik kurkumin analogu olan EF24'tür. Çalışmamızda, doksetaksel'in tek başına ve EF24 ön uygulamasının ardından doksetaksel uygulamasının, meme kanseri MCF-7 hücrelerindeki hücre çoğalması ve apoptoz üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: EF24 ve doksetaksel'in hücre canlılığı ve sitotoksik etki/etkilerini belirlemek amacıyla sırasıyla 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromür (MTT) ve laktat dehidrojenaz (LDH) testleri uygulandı. Hücre canlılığı ve sitotoksikite testinin sonucunda seçilen uygun dozlar hücrelere uygulandıktan sonra akım sitometri yöntemi ile hücre ölüm analizi yapıldı. Bunun yanı sıra kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizi (qRT-PCR) ile cMYC ve cFOS genlerinin mRNA düzeyindeki ifadeleri belirlendi.

Bulgular: MCF-7 hücrelerine EF24 ön uygulamasının ardından doksetaksel uygulamasının, doksetakselin tek başına uygulamasına kıyasla hücre canlılığını anlamlı ölçüde düşürdüğü belirlendi. Apoptotik ve nekrotik hücre oranları akım sitometri yöntemi ile belirlendi. Buna ilaveten, EF24 ön uygulamasının, tek başına doksetaksel uygulamasına kıyasla cMYC ve cFOS genlerinin mRNA düzeylerini anlamlı derecede azalttığı belirlendi.

Sonuç: MCF-7 hücrelerine EF24 ön uygulamasının, doksetaksel'in tek başına uygulamasına kıyasla hücreyi daha dayanıklı hale getirmesi bu uygulamanın meme kanser tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ancak ilacın meme kanser tedavisinde daha etkin kullanımı için deneysel in vitro ve in vivo modellere gereksinim duyulmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Doksetaksel, EF24, Metastatik Meme Kanseri Hücre Hattı, MCF-7, Apoptoz.

ABSTRACT

The Effects of Sequential Administration of EF24 with Docetaxel Apoptotic Response in Metastatic Breast Cancer Cell Line

Objective: Docetaxel, a taxane class agent, has become one of the most important chemotherapeutic agents in the past several years. Currently, more effective treatment options have been investigated by combining new molecules with the classic chemotherapy agents for breast cancer. One of these molecules is EF24, which is a synthetic curcumin analog. We aimed to investigate possible antiproliferative and apoptotic effects of EF24 and docetaxel alone as well as with their sequential administration on MCF-7 breast cancer cells.

Material and Method: 3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and Lactate dehydrogenase (LDH) tests were performed to determine the effect of EF24 and docetaxel on cell viability and cytotoxicity. Apoptotic cell death methods were performed using Flow cytometry assay, with selected appropriate doses of the cells. Besides, relative mRNA levels of cMYC and cFOS genes were determined by quantitative Real-time PCR method (qRT-PCR).

Results: The viability of MCF-7 cells decreased significantly after treatment with sequential administration of docetaxel followed by EF24 treatments, compared to docetaxel alone. Compared to docetaxel alone treatment, EF24 pretreatment overwhelmingly increased apoptosis level in MCF-7 cells. The percentage of apoptotic and necrotic cells were determined by the flow cytometer analysis. Moreover, real-time PCR analyses showed that cMYC and cFOS mRNA levels changed markedly after sequential treatment.

Conclusion: These data suggest that sequential administration of EF24 with docetaxel could be useful as a potential chemotherapeutic agents in the management of breast cancer. Further analyses using in vitro and in vivo models are needed to confirm these findings.

Keywords: Docetaxel, EF24, Metastatic Breast Cancer Cell Line, MCF-7, Apoptosis.

Kadınlarda yaygın görülen meme kanseri, kanser nedenli ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır (1). Hastalığın yaygın olarak görülmesi ve farklı tümör sınıflarının mevcut olması nedeniyle, tedaviye yönelik araştırmalar halen güncelliğini korumakta ve giderek artmaktadır (2). Hastalığın tedavi protokolünde cerrahi müdahale, radyasyon tedavisi ve kemoterapi uygulanmaktadır. Kemoterapi, günümüzde meme kanseri tedavisinde uygulanan en yaygın ve etkili bir yöntemdir

(3). Ancak, kemoterapi süresince, hastaların tedaviye cevap vermemesi veya tedavi sonrası kanserin tekrarlaması sıklıkla görülen bir durumdur. Meme kanseri semptom göstermeden metastaz yapabildiğinden, hastalığın tedavisinde ve önlenmesinde yeni alternatif ajanların araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (4-6). Kanser tedavisinde başarıya ulaşmak için genellikle birden fazla kanser karşıtı ilaç uygulanmaktadır. Ancak, sonradan kazanılan ya da tedavi öncesi kişide var

olan ilaç dirençliliği, kanser kemoterapisinde başarıya ulaşmayı büyük ölçüde engellemektedir. Bu duruma “çoklu ilaç dirençliliği” (ÇİD) denilmektedir (7-10). Kemoterapiye karşı gelişen direnç pek çok kanser karşıtı ilacın hastalar üzerinde beklenen etkisini göstere-memesine ve hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır (5, 7).

Protoonkogenler, hücrelerin büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptozu kontrol eden pozitif düzenleyici genlerdir. Büyüme faktörleri ve reseptörleri, sinyal iletimini sağlayan proteinler, transkripsiyon faktörleri ve apoptoz düzenleyicileri protoonkogenlere örnek olarak verilebilir (11, 12). cMyc ve cFos gibi transkripsiyon faktörleri de diğer protoonkogenler gibi herhangi bir nedenle mutasyona uğrarlarsa onkogenlere dönüşürler. Bu genlerde gerçekleşen değişiklikler sonucunda oluşan onkogenik yapılar, anormal hücre proliferasyonuna, apoptozun gerçekleşmemesi nedeniyle neoplastik hücre birikimine ve tümör gelişimine yol açar. Ayrıca, bu genlerin meme, kolon, akciğer ve burkitt lenfoma gibi kanserlerde sürekli ve/veya artmış ekspresyonu görülmektedir (11-13).

Meme kanseri olgularında da gözlenen ÇİD, öncelikli olarak antrasiklin ve taksan grubu kemoterapötik ilaçların kombinasyonları kullanılarak giderilmeye çalışıl-sa da yetersiz kalmıştır (14). Fakat, altın standart olarak nitelendirilen bu tedavi protokolünde, tekli tak-san veya antrasiklin uygulanmasıyla oluşturulan tedavi rejimlerine kıyasla tedaviye cevap ve sağ kalım oranlarında artışın olduğu gözlenmiştir (15-17).

Taksan grubu antineoplastik bir ajan olan dosetaksel, β -tübülün alt ünitelerine yüksek afinite ile bağlanarak, mitozun metafaz aşamasında mikrotübüllerin depolimerizasyonunu engelleyerek etkisini gösterir (18-20). Dosetaksel, metastatik meme kanserinde tek başına da kullanılabilen aktif maddelerden biri olma özelliğindedir. Dosetaksel ile yapılan çalışmalarda meme kanserinde % 50-68 oranında başarı sağlanmış olmasına rağmen, dosetakselin meme kanserindeki optimum dozu henüz saptanmamıştır. Her in vitro, hem de in vivo çalışmalarda, hücre içine alınımın hızlı olmasına bağlı olarak dosetakselin birçok hücre grubunda anti-neoplastik aktivite gösterdiği görülmüştür (20, 21). Öte yandan güncel çalışmalar, meme kanseri tedavisinde altın standart olan taksanların farklı anti-neoplastik ajanlarla yapılan kombinasyonlarının, MDR-1 ve Pgp aracılı dışa atım mekanizmaları başta olmak üzere direnç mekanizmalarını uyardığı ve sağ kalıma aracılık eden gen ve proteinlerin transkripsiyon ve translasyonlarını artırarak apoptotik cevabın oluşmasını engellediği gösterilmiştir (22-25). Bu nedenle özellikle metastatik ve erken evre meme kanseri olgularında etkinliği kanıtlanmış olan taksanlar ile kombine edilerek kemoduyarlılığı artıracak yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır (26-28).

Sentetik kurkumin analogu olan difenil difloroketon (EF24) molekülü ovaryum, kolon, prostat, meme, pankreas, mezotelyoma ve akciğer kanseri gibi farklı kanser hücre hatlarına tek başına ve/veya diğer kanser karşıtı ajanlar ile birlikte uygulandığı zaman kanser

karşıtı aktiviteyi potansiyelize ettiği gösterilmiştir (29-37).

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda taksan grubu anti-neoplastik bir ajan olan dosetaksel bileşiği ile EF24'ün farklı konsantrasyonlarda tek başlarına ve/veya sıralı uygulamalarının, MCF-7 meme kanseri hücre hattında hücre canlılığı, sitotoksikite, apoptoz ve proliferasyon üzerindeki olası etki ve/veya etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasallar

Deneysel prelinik çalışmamızda Dosetaksel (R&D Systems, ABD), EF24 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 besiyeri, L-Glutamin, fetal sıgır serumu (FBS), penisilin-streptomisin ve dimetil sülfoksit (DMSO) (Gibco, Grand Island, NY, ABD), Cytotoxicity Detection Kit Plus, High Pure RNA Isolation Kit, Transcript First Strand cDNA Synthesis Kit ve LightCycle® 480 Probes Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ve CycleTEST Plus DNA Reagent Kit ile FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (Becton Dickinson, ABD) satın alınmıştır. Kullanılan diğer kimyasallar Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) sağlanmıştır.

Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarında, MCF-7 (ATCC® No: HTB-22™-Human breast cancer) insan meme kanseri hücreleri kullanılmıştır. Hücreler standart kültür koşullarında ve %10 FBS, 2 μ M L-glutamin ve 100U/ml penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 besiyeri içerisinde 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatörde (Hanau, Almanya) kültüre edilmiştir. Hücre kültür kabının %70-80'ini kapladığında %0.025 tripsin-EDTA çözeltisi ile kültür kaplarından pasaj veya ekim yapmak üzere ayrılması sağlanmıştır. Yeterli sayıya ulaşan hücreler, 96'lık kültür kaplarına, her bir kuyucağa 4x10⁴ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Çalışmada hiçbir ajan (EF24 ve dosetaksel) verilmeyen MCF-7 hücreleri kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Buna ilaveten çalışmada çözücü kontrolü olarak % 0.1 DMSO kullanılmıştır. Hücreler, kademeli olarak dose-taksel (0.1-50 μ M) ve EF24 (0.25-50 μ M) doz aralığında, tek tek ve/veya sıralı olarak birlikte 24 ve/veya 48 saat inkübe edilmiştir.

Dosetaksel ve EF24 Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Dosetaksel ve EF24, %0.1'lik DMSO'da çözdürülerek stok solüsyon hazırlanmış ve bu stok solüsyonlar deney süresince -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Dosetaksel (0.1-50 μ M) ve EF24'ün (0.25-50 μ M) değişen konsantrasyonları deneyde kullanılmak üzere, kullanımlarından hemen önce kültür besiyerinde seyreltilerek hazırlanmıştır. Deneyler birbirinden bağımsız 3 tekrar ve her grupta 6 örnek olacak şekilde çalışılmıştır.

Hücre Canlılığı Analizi

Dosetaksel ve EF24'ün tek başlarına ve sıralı uygulamalarının hücre canlılığı üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) yöntemi kullanılmıştır (38, 39). Kısaca, 96'lık kültür kaplarına, her bir kuyucukta 4×10^4 olacak şekilde ekilerek bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ardından, hücelere artan dozlarda dosetaksel ve EF24 tek tek ve/veya sıralı bir şekilde uygulanmıştır. Dosetaksel ve EF24'ün farklı konsantrasyonlarının uygulandığı kuyucukların inkübasyon süreleri sonunda, kuyucuklardaki 100 µl taze besiyeri ile değiştirilerek her bir kuyucuğa MTT çalışma solüsyonundan 10 µl/kuyucuk (5 mg/ml) olacak şekilde ilave edilmiştir. 4 saat 37 °C ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyon sonunda oluşan formazan kristalleri 100 µl DMSO ile çözülmüştür. Çözünen kristallerin absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda ELISA mikropilaka okuyucuda (Spectramax M3 plate reader, Molecular Devices, Silicon Valley, California, ABD) okutulmuştur. Kontrol gruplarının absorbans değerlerinin ortalaması alınarak, bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edilmiştir. Dosetaksel ve/veya EF24 uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri, kontrol absorbans değerine oranlanarak, yüzde canlılık olarak belirlenmiş ve her ilaç için IC₅₀ değeri hesaplanmıştır. Her deney 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Besiyerine Salınan Laktat Dehidrojenaz (LDH) Tayini

MCF-7 hücrelerinde EF24 ve dosetaksel'in etkilerine bakılmak üzere apoptotik/nekrotik hücrelerin geç fazında görülen plazma membran bütünlüğünün bozulması sonucunda besiyerine salınan LDH miktarının ölçülmesi amacıyla Cytotoxicity Detection kit plus (LDH) kiti kullanılarak aşağıdaki protokole göre ölçülmüştür (39). MCF-7 hücreleri 96'lık kültür kaplarına her bir kuyucuğa 4×10^4 hücre gelecek şekilde ekilmiştir. Dosetaksel ve/veya EF24'ün belirlenen dozlarının inkübasyon süreleri dolduktan sonra kültür ortamından 100 µl besiyeri alınıp 96'lık kültür kaplarına aktarılmıştır. Kuyulara kit içerisinde bulunan 100 µl taze hazırlanmış reaksiyon karışımı eklenerek, ışıktan uzak bir ortamda, oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiş ve ardından mikropilaka okuyucu cihazı ile 490 nm dalga boyundaki absorbans değerleri okunmuştur. Deney protokolünde kullanılan kontroller: Kör kontrol: Besiyeri, Düşük kontrol: Besiyeri+Hücre, Yüksek kontrol: Triton X-100 solüsyonu+Besiyeri+Hücre. Elde edilen absorbans değerlerinden kör kontrolün absorbansı çıkartıldıktan sonra, ilaçların sitotoksitesite değerinin yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. Sitotoksitesite (%) = (örnek abs. – düşük kontrol abs. / yüksek kontrol abs. – düşük kontrol abs.) x 100

Hücre Ölümü Analizi

Hücre ölümünü test etmek amacıyla "FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I" (katalog no:556547) kullanılmıştır. Buna göre, hücreler PBS ile yıkandıktan

sonra 100 µl 1x tampon çözelti içinde çözülmüştür. 1×10^5 hücre için 5 µl Annexin V ve 5 µl PI eklenmiş ve 15 dk. karanlıkta oda sıcaklığında bekletilmiştir. Yıkamadan 300 µl tampon çözelti eklenmiş ve akım sitometri (Beckton Dickinson, FACS Canto) cihazında analiz edilmiştir.

RNA İzolasyonu ve Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Yöntemi

MCF-7 hücre hattından High Pure RNA Isolation Kiti (Roche, Almanya) kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'ların miktarları ve saflıkları spektrofotometrik olarak NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, İngiltere) (260/280 nm) cihazında ölçülerek RT-PCR'da kullanılana kadar -80 °C'de dondurucuda saklanmıştır. Hedef genlere ait mRNA ifade düzeylerinin belirlenmesi amacıyla, hücre hattından elde edilmiş RNA örneklerinden 1 µg total RNA, Random heksamer primerleri ve cDNA sentez kiti (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche, Almanya) kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir.

Kantitatif Real Time PCR Yöntemi

Gen ifade düzeyi çalışmaları kantitatif Real-time PCR (qRT-PCR) yöntemi ile Light Cycler-480™ (Roche, Almanya) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Amplifikasyonlar 10 µl toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA, bölgeye özgü primerler, UPL probu ve LC Probe Master mix kullanılarak gerçekleştirilmiştir. cMYC ve cFOS gen ifadelerini normalize etmek için, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) geni referans olarak alınmış ve tüm cDNA örnekleri her bir gen için üçer tekrarlı çalışılmıştır. Seçilen genler ile ilgili özgün primer ve UPL prob listesi tablo 1'de verilmiştir. Reaksiyonda, 95 °C'de 10 dakikalık denatürasyon, 50 °C'de 10 saniye primer bağlanması ve 72 °C'de 10 saniyelik zincir uzaması basamaklarını oluşturacak şekilde 45 döngüden oluşan PCR tepkimesi uygulanmıştır. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH housekeeping geni referans alınarak REST 2009 (Relative expression software tool) yazılımı (Qiagen, Almanya) kullanılarak hesaplanmıştır.

İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Hücre canlılığı, LDH salınması, hücre döngüsü analiz sonuçları ve apoptotik/nekrotik hücre oranlarının istatistiksel açıdan değerlendirilmesi bağımsız Student's t-testi ile SigmaStat v3.5 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilerek, p<0.05, p<0.01 ve p<0.001 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. cMYC ve cFOS mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar "Pair-wise Fixed Reallocation Randomization" istatistiksel analiz testi kullanılarak "REST (2009 V2.0.13)" programı ile karşılaştırılmıştır (40).

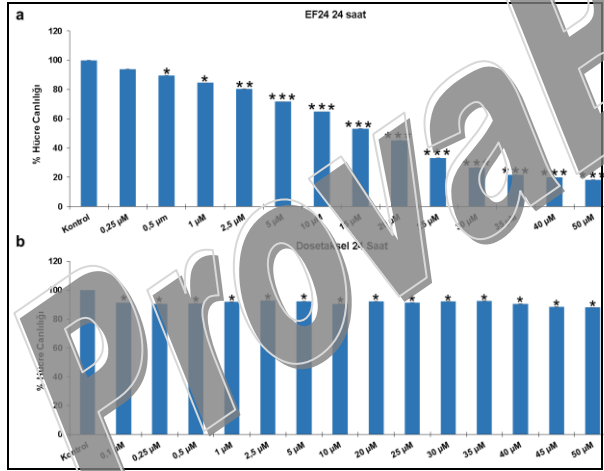
Tablo 1. Gene özgü primer dizileri ve prob numaraları.

Gen	İleri primer	Geri primer	UPL prob no
cFOS	5'-ACTACCACTCACCCGCAGAC-3'	5'-CCAGGTCCGTGCAGAAGT-3'	67
cMYC	5'-GCTGCTTAGACGCTGGATTT-3'	5'-TAACGTTGAGGGGCATCG-3'	75
GAPDH	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	5'-GCCCAATACGACCAATCC-3'	60

BULGULAR

EF24 ve Dosetaksel'in Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

MCF-7 hücreleri EF24 ile 24 saat inkübe edildiğinde hücre canlılığının doza bağımlı bir şekilde azaldığı belirlendi. Uygulanan en düşük EF24 konsantrasyonu olan 0.25 μ M'da hücre canlılığının %93 olduğu gözlemlendi ($p=0.06$). Buna karşın 0.5-1 μ M ($p < 0.05$), 2.5 μ M ($p < 0.01$) ve üzeri konsantrasyonlarda (5-50 μ M) ($p < 0.001$) hücre canlılık oranlarının kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi (Şekil 1a). MCF-7 hücrelerine 0.1-50 μ M arası değişen dozlarda 24 saat süre ile dosetaksel uygulandığında, hücre canlılık oranlarında doza bağlı bir azalmanın olmadığı ve uygulanan tüm dosetaksel konsantrasyonları için canlılık değerlerinin yaklaşık %90 olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$) (Şekil 1b).

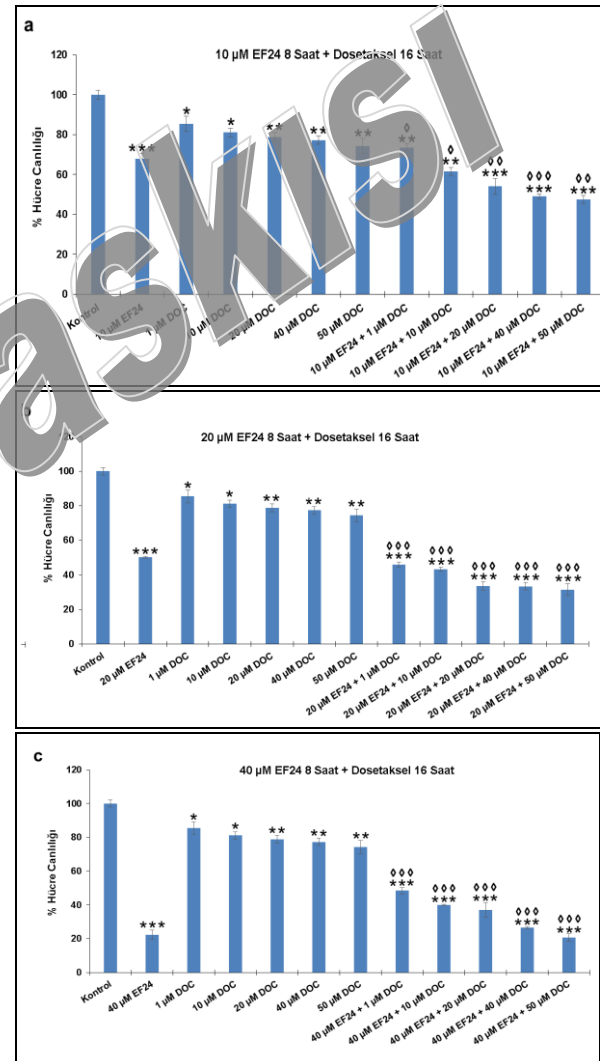


Şekil 1. MCF-7 hücrelerinin EF24 (a) ile Dosetaksel (b)'in 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. Kontrol grubu hücreler.

EF24 ve Dosetakselin Sıralı Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

MCF-7 hücrelerinin EF24 ile 24 saat süren inkübasyonu sonucunda, kontrol grubuna kıyasla doza bağımlı bir şekilde görülen anlamlı düşüş ve dosetaksel'in artan dozlarında kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında belirgin bir farklılık görülmemesi nedeniyle, EF24'ün hücrelere daha kısa süreli uygulanmasının hücreleri dosetaksele duyarlı hale getirme potansiyeli araştırılmak istenmiştir. Bu doğrultuda, MCF-7 hücrelerine 8 saat süre ile EF24 uygulanmasının ardından EF24 ortamdan uzaklaştırılmış ve dosetaksel 16 saat süre ile uygulanmıştır. Bu amaçla 10, 20 ve 40 μ M EF24 kon-

santrasyonları ile 1, 10, 20, 40 ve 50 μ M dosetaksel konsantrasyonları hücre canlılık durumları dikkate alınarak sıralı uygulamadaki konsantrasyonlar belirlenmiştir.



Şekil 2. MCF-7 hücrelerine EF24 ile 8 saat değişen konsantrasyonlarda [10 μ M EF24 (a)], [20 μ M EF24 (b)] ve [40 μ M EF24 (c)] inkübasyonu sonrası 16 saat değişen konsantrasyonlarda (1, 10, 20, 40 ve 50 μ M) Dosetaksel uygulaması sonunda belirlenen hücre canlılık oranları, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. Kontrol grubu hücreler. $^{\circ}$ $p < 0.05$; $^{\circ\circ}$ $p < 0.01$; $^{\circ\circ\circ}$ $p < 0.001$ vs. Tek başına Dosetaksel uygulanan hücreler. DOC: Dosetaksel

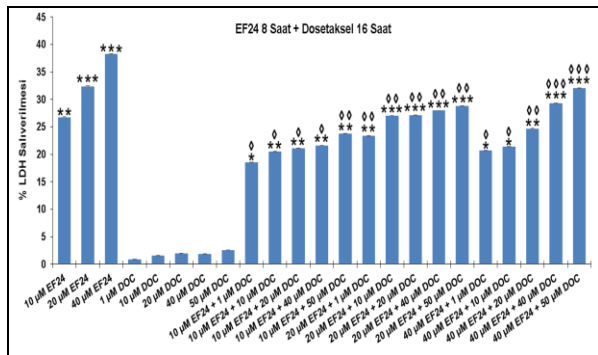
MCF-7 hücrelerine 8 saat süre ile tek başına EF24 uygulandığında, EF24'ün 10, 20 ve 40 μ M dozlarında etkili olduğu ve hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. Buna göre 10, 20 ve 40 μ M konsantrasyonlarda EF24 uygulaması sonrasında hücre canlılığı sırasıyla

%67.88 ($p=0.009$), %50.04 ($p<0.001$) ve %22.25 ($p<0.001$) olarak belirlenmiştir (Şekil 2a-c). Hücre canlılığı dosetaksel'in 16 saat tek başına 1, 10, 20, 40 ve 50 μM konsantrasyonlarda uygulanmasıyla, kontrol gruplarına kıyasla, sırasıyla %85.43 ($p=0.032$), %81.11 ($p=0.021$), %78.87 ($p=0.007$), %77.32 ($p=0.005$) ve %74.33 ($p=0.003$) olarak belirlenmiştir (Şekil 2a-c). 8 saat EF24 + 16 saat dosetaksel uygulanan gruplarda, dosetaksel'in 16 saat tek başına uygulandığı gruplara kıyasla, hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 2a-c). Bununla birlikte, EF24 ve dosetakselin sıralı uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık değerlerinin, 16 saat dosetaksel uygulanan örneklere oranla daha düşük oranda bulunması, EF24 ön uygulamasının hücrelerin dosetaksele karşı olan duyarlılığını arttırdığını göstermektedir.

EF24 ve Dosetaksel'in Besiyerine Salınan LDH Miktarları

Son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalarda meme (MDA-MB-231), prostat (DU-145) ve osteosarkom (Saos2) hücrelerine uygulanan 10 μM EF24'ün hücreler üzerindeki apoptotik etkisinin kontrol gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir (41, 42). Çalışmamızda hücre canlılığı ve besiyerine salınan LDH düzeyleri değerlendirildiğinde, EF24 için en uygun konsantrasyonun 10 μM olduğu belirlenmiş seçilen konsantrasyonun literatür ile uyumlu olduğu göz önüne alınarak, takip eden tüm deneysel analizler bu konsantrasyon üzerinden devam etmiştir.

MCF-7 hücrelerine 8 saat tek başına EF24'ün değişen konsantrasyonlarda (10, 20 ve 40 μM) uygulamasının, besiyerine salınan LDH enzim miktarını kontrol hücrelerine kıyasla, doza bağımlı olarak arttırdığı belirlenmiştir. Dosetaksel'in tek başına 16 saat uygulanması ise araştırılan tüm konsantrasyon değerleri (1, 10, 20, 40 ve 50 μM) için %2.5'in altında LDH salınmasına neden olmuştur. Buna karşın, 8 saat EF24 ile 16 saat dosetaksel'in sıralı bir şekilde uygulanmasının dosetaksel'in tek başına uygulanmasına ve kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı miktarda LDH enziminin salınmasına yol açtığı belirlenmiştir (Şekil 3).



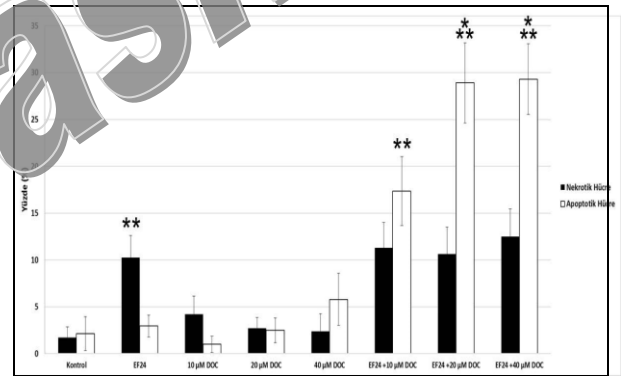
Şekil 3. MCF-7 hücre dizilerinin 10 μM EF24 ile 8 saat uygulamasından sonra 16 saat değişen konsantrasyonlarda Dosetaksel'in inkübasyonu sonunda görülen besiyerine LDH salınımı. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. Kontrol grubu hücreler; $\circ p < 0.05$; $\circ\circ p < 0.01$; $\circ\circ\circ p < 0.001$ vs. Tekli Dosetaksel uygulanmış hücreler. DOC: Dosetaksel; LDH: Laktat dehidrogenaz.

EF24 ve Dosetaksel'in Apoptoz ve Nekroz Üzerine Etkisi

EF24 ile dosetakselin sıralı uygulamalarında nekrotik etkinin yaklaşık %10 civarında olduğu belirlenmesine rağmen, bu değerlerin EF24'ün tek başına uygulanmasına oranla istatistiksel açıdan anlamlı bir fark oluşturmadığı bulundu ($p > 0.05$) (Şekil 4).

EF24 ve dosetaksel tek başına uygulandığında gözlenen apoptotik hücre oranının kontrol hücrelerine göre anlamlı bir farklılık oluşturmadığı ve apoptoz oranlarının %5.8 ve altında olduğu belirlendi ($p > 0.05$). Buna karşın, sıralı uygulama sonrasında apoptoz oranlarının anlamlı derecede yükseldiği ve 10, 20 ve 40 μM dosetakselin kullanıldığı ardışık uygulamada apoptoz oranlarının sırasıyla %17.4 ($p=0.004$), %28.9 ($p < 0.001$) ve %29.3 ($p < 0.001$) olduğu görüldü (Şekil 4).

EF24 ile dosetakselin sıralı bir şekilde uygulanması nekrotik hücre oranlarında istatistiksel açıdan anlamlı bir artışa neden olmazken, apoptotik hücre oranlarında anlamlı bir artışa neden olarak etkin bir hücre ölümüne yol açtığı anlaşılmıştır (Şekil 4).



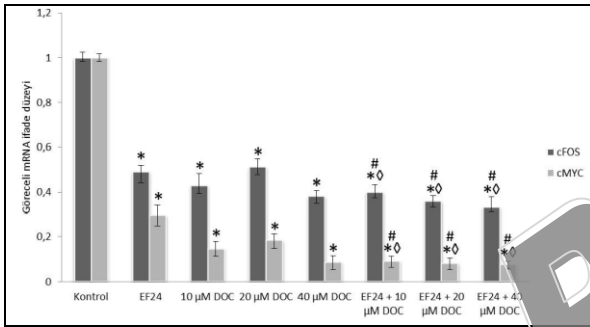
Şekil 4. MCF-7 hücrelerine EF24'ün 8 saat uygulamasından sonra 16 saat değişen konsantrasyonlarda (1, 10, 20, 40 ve 50 μM) Dosetaksel'in inkübasyonu sonunda apoptoz ve nekrozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. Kontrol grubu hücreler. DOC: Dosetaksel.

EF24 ve Dosetakselin cFOS ile cMYC mRNA İfade Edilmesine Etkileri

EF24 tek başına uygulandığında, kontrol hücrelerine kıyasla cFOS ifadesini 2 kat, cMYC ifadesini ise 3.4 kat azalttığı gözlenmiştir ($p < 0.001$). Benzer şekilde tek başına dosetaksel uygulamasının da cFOS ve cMYC mRNA ifade düzeylerinin de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir ($p < 0.001$). Bunun yanı sıra, EF24 ile belirlenen dozlarda dosetaksel'in sıralı bir şekilde uygulanması ise cFOS mRNA ifade düzeyini 2.5-3 kat aralığında azaltırken, cMYC mRNA ifadesini ise 10 kattan daha fazla azalttığı gözlenmiştir ($p < 0.001$) (Şekil 5).

EF24 ve 10 μM dosetaksel ile EF24 ve 20 μM dosetaksel'in sıralı uygulamasının tek başına verilen EF24 grubuna kıyasla cFOS ifade düzeylerini sırasıyla 4 ve 4,5 kat azalttığı gözlenmiştir ($p < 0.001$). Benzer şekilde, EF24 ile 10 μM dosetaksel ile EF24 ile 20 μM dosetaksel'in sıralı uygulamasının tek başına verilen EF24 grubuna kıyasla cMYC ifade düzeylerini sırası-

la 5.5 ve 6 kat azalttığı belirlenmiştir ($p < 0.001$). Bunun yanı sıra, EF24 ile 10 μM dosetaksel'in sıralı uygulamasının tek başına verilen 10 μM dosetaksel grubuna kıyasla cFOS ve cMYC mRNA düzeylerinde azalma gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak bir anlam görülmemiştir ($p > 0.05$). Buna ilaveten, EF24 ile 20 μM dosetaksel'in sıralı uygulamasının tek başına verilen 20 μM dosetaksel grubuna kıyasla cFOS mRNA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmemiş ($p > 0.05$), ancak cMYC mRNA düzeyinin ise yaklaşık 2.3 kat azaldığı belirlenmiştir ($p = 0.006$) (Şekil 5).



Şekil 5. EF24 ve Dosetaksel'in değişen konsantrasyonlarda (10, 20 ve 40 μM) tek başlarına ve sıralı uygulamaları sonrasında cMYC ve cFOS genlerinin mRNA düzeylerindeki değişimlik. Hedef genin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. Kontrol grubu hücreler; $^{\circ}p < 0.05$; $^{\circ\circ}p < 0.01$; $^{\circ\circ\circ}p < 0.001$ vs. Tekli Dosetaksel uygulanmış hücreler; $^{\#}p < 0.05$; $^{\#\#}p < 0.01$; $^{\#\#\#}p < 0.001$ vs. Tekli EF24 uygulanan hücreler. DOC: Dosetaksel.

TARTIŞMA

Çoklu ilaçlarla kombinasyon terapisi, toksisiteyi azaltmak ve sinerjik etkiyi arttırmak için kanser tedavisinde yaygın olarak uygulanmaktadır (43-45). Bu amaç doğrultusunda çalışmamızda, kurkumin analogu olan EF24 ile mikrotübüllerin oluşumunu stabilize ederek hücre çoğalmasını durduran dosetaksel'in tek başına ve sıralı uygulamalarının MCF-7 meme kanser hücreleri üzerindeki etkilerini inceledik.

Taksan grubunda yer alan ve sistemik etkili bir ilaç olan dosetaksel özellikle meme, over, prostat, mesane, mide ve akciğer kanserinde yaygın olarak kullanılmaktadır (20, 21, 46-48). Bununla birlikte, yapılan in vitro çalışmalarda dosetakselin meme ve serviks kanseri hücrelerinde bifazik cevap oluşturduğu gösterilmiştir. Buna göre, düşük konsantrasyonlarda (nM) uygulanan dosetaksel meme kanseri hücrelerinde mitotik katastrofu takip eden apoptoza neden olurken, yüksek konsantrasyonlarda (μM) uygulandığında ise terminal mitotik duraklamaya ve ilerleyen maruziyete bağlı olarak nekroza neden olmaktadır (49, 50). Wang ve ark. (51) tarafından MCF-7 hücrelerine 24 saat süreyle dosetaksel uygulaması sonucunda artan doza bağımlı olarak hücre canlılığının azaldığı gözlenmiş ve IC_{50} değerinin 80 nM olduğu belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada apoptotik hücre oranında meydana gelen azalmanın

mikromolar konsantrasyonlara çıktığında yavaşladığı da gösterilmiştir (51). Öte yandan çalışmamızda dosetaksel'in artan dozuna bağlı olarak hücre proliferasyonunda belirgin düşüşe neden olmadığı ve mikromolar dozlarda dahi hücre canlılığının %80 üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu durum Hernández-Vargas ve ark. (52) tarafından MCF-7 hücrelerine yüksek konsantrasyonlarda dosetaksel uygulaması ile gecikmiş mitotik duraksama ile açıklanmaktadır. Benzer şekilde Trebunova ve ark. (53) dosetaksel'in nanomolar konsantrasyonlardan mikromolar konsantrasyonlara kadar artan dozlarda MCF-7 hücrelerine uygulanmasını takiben direnç mekanizmalarının aktifleşerek yabancıl tip hücrelerin iki katına çıkması için gereken süreçte meydana gelen oransal artışın dosetakselin yüksek konsantrasyonlarında yavaşladığı bildirilmiştir.

Ovaryum, prostat, kolon, meme, gastrik, pankreatik, mezotelyoma, küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve hepatoselüler kanser gibi farklı hücre serileri ile yapılan ve EF24'ün tek başına veya farklı ajanlar ile birlikte uygulandığı çalışmalar bulunmaktadır (29-36, 54, 55). 10 μM EF24, 24 saat sonunda MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu %100, DU-145 prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasını ise %70-80 oranında baskılamıştır (56). Çalışmamızda, EF24'ün tek başına 24 saat süre ile MCF-7 hücrelerine uygulanmasının, hücre canlılığını doza bağımlı olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü ve hücrelerin %50'sini öldüren letal konsantrasyonunun 15 μM olduğu belirledik. EF24, kombine uygulamalarda, birlikte kullanılan ajanların etkisini arttıran bir molekül olarak karşımıza çıkmaktadır (37, 54, 57). Bu çalışmalardan biri olan, Chen ve ark.'nın (54) yaptığı gastrik kanser modelinde in vitro ve in vivo olarak gerçekleştirilen bir araştırmada, EF24'ün tek başına ve rapamisin ile birlikte uygulanmasının ardından, kombinasyon tedavisinin hücreler üzerindeki doza ve zamana bağlı bir şekilde antiproliferatif ve apoptotik etkisinin olduğunu göstermişlerdir. EF24'ün rapamisinin kanser karşıtı özelliğini sinerjik bir etki yaratarak arttırdığını, etkisini ise, mitokondriyal fonksiyon kaybı ve apoptoz gibi farklı moleküler yollar üzerinden gösterdiğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde çalışmamızda, EF24 ile dosetakselin sıralı bir şekilde uygulanmasının da dosetakselin tek başına uygulamalarına kıyasla, hücre canlılığını anlamlı düzeyde düşürdüğü gözlenmiştir (Şekil 2a-c ve Şekil 4). Hücre canlılığında meydana gelen bu azalma, hücre metabolik aktivitedeki değişimine dayanan ve proliferasyonun değerlendirilmesinde kullanılan MTT yönteminin yanı sıra, apoptotik/nekrotik hücrelerin geç fazında görülen plazma membran bütünlüğünün bozulması sonucunda besiyerine salınan LDH miktarının ölçülmesi ile de desteklenmiştir (39). Çalışmamızda, kısa süreli yüksek konsantrasyonda dosetaksel uygulamasının belirgin bir sitotoksik etki oluşturmadığı, buna karşın EF24 ile ön muamele edilen dosetakselin sıralı bir şekilde uygulandığı hücrelerde ise hücre canlılığının belirgin bir şekilde azaldığı ve apoptotik hücre ölümünün de 24 saatin sonunda %30

seviyelerine kadar yükseldiği, nekrotik hücre ölümünün ise %10 seviyelerine çıktığı gözlenmiştir.

Protoonkogen olan cFos ve cMyc gen ürününü proteinler, nükleer transkripsiyon faktörleri olup, hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması ve apoptoz sırasında gen ifadesinin aşamalı düzenlenmesi ile ilişkilidir (50, 58, 59). Kanser gelişiminde Fos ve Myc proteinlerinin katkısı olduğu bilinmektedir (60). Bazı tümör tiplerinde cFos ve cMyc düzeyinin arttığı gösterilmiş ve bu artışın artan hücre çoğalmasının bir kanıtı olacağı için tümör oluşumunda önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (58, 59). Çalışmamızda, MCF-7 meme kanser hücre hattında proliferasyonda etkili olan cMYC ve cFOS genlerinin, tek başına EF24 ve dosetaksel uygulaması sonrası ifade edilme oranlarının azaldığını belirledik. Bununla birlikte, EF24 ve dosetakselin sıralı uygulanmasını takiben cMYC ve cFOS genlerinin mRNA düzeylerinde görülen azalmanın EF24'ün tek başına verildiği gruba kıyasla daha belirgin olduğunu gözledik.

EF24'ün MCF-7 ve farklı kanser hücre hatlarında cMYC ve cFOS genlerinin mRNA düzeylerine olan etkisi ile ilgili bir çalışmaya literatürde rastlanılmakla birlikte, Adams ve ark. (41) tarafından yapılan bir çalışmada meme ve prostat kanser hücrelerine EF24 uygulanması sonucu cMyc ve cFos protein düzeylerindeki değişim ELISA yöntemi ile gösterilmiştir. Bu çalışmada, 10 µM EF24'ü meme (MDA-MB-231) ve prostat (DU-145) kanser hücre hatlarına uygulandığında, cMyc ve cFos protein düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (41). Bu nedenle, çalışmamızda 10 µM EF24 sabit doz olarak seçilmiştir. Bunun yanı sıra dosetaksel'in farklı kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etkilerinin olduğu, yapılan birkaç çalışmada gözlenmiştir (61-63). Örneğin, el Khyari ve ark. (61) HT29-D4

kolon kanser hücrelerinde yaptığı çalışmada, dosetaksel uygulaması sonrasında cMYC geninin mRNA düzeylerinde anlamlı bir azalış olduğunu göstermişlerdir. Li ve ark. (62) ise A549 akciğer kanser hücre hattında dosetaksel'in cMYC mRNA düzeyine herhangi bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Buna ilaveten SW620 and HCT116 kolon kanser hücre hatları ile yapılan bir başka çalışmada ise dosetaksel'in Ginsenoside Rg3 ile birlikte uygulanmasının cFOS geninin mRNA düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (63). Dose-takselin uygulandığı farklı kanser hücrelerinden elde edilen yanıtlardaki bu farklılıklar sadece ajanların uygulama konsantrasyonuna, ya da etki mekanizmasına değil, aynı zamanda kanser hücrelerinin yapısal ve genetik özelliklerine de bağlıdır (49).

Dosetaksel tedavisi uygulanan meme kanseri hastalarında ve pakitaksel tedavisi uygulanan metastatik meme kanseri hastalarında tedaviye ek olarak kurkumin uygulanması ile ilgili Faz II çalışmaları devam etmektedir. Bu çalışmaların sonuçlarının olumlu olması, kurkumin ve analoglarının kanser tedavisinde kullanılabileceği açısından umut vaat etmektedir (64, 65).

Genel olarak sonuçlarımız, EF24 ön uygulaması MCF-7 hücrelerinin yüksek konsantrasyonda dosetaksele karşı verdiği cevabın belirgin bir şekilde değişmesine yol açmış ve 24 saatlik sürede konvansiyonel kemoterapi ilacının etkinliği hücre canlılığının azalması ve apoptotik etkinin ortaya çıkarılması yoluyla in vitro koşullarda arttığını göstermiştir. Sonuçlarımızı destekleyecek nitelikte, meme kanseri tedavisinde daha etkili olabilecek yeni moleküllerin bulunması ve bu ajanların etkilediği moleküler yolların belirlenmesi için in vitro ve in vivo modeller ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Zhao X, Gurumurthy CB, Malhotra G, et al. Breast cancer subtypes: two decades of journey from cell culture to patients. *Adv Exp Med Biol* 2011; 720: 135-44.
2. Aziz MY, Abu N, Yeap SK, et al. Combinatorial Cytotoxic Effects of Damnacanthal and Doxorubicin against Human Breast Cancer MCF-7 Cells in Vitro. *Molecules* 2016; 21: 1-15.
3. Xie ZZ, Li MM, Deng PF, et al. Paris saponin-induced autophagy promotes breast cancer cell apoptosis via the Akt/mTOR signaling pathway. *Chem Biol Interact* 2017; 12: 1-9.
4. Salih AK, Fentiman IS. Breast cancer prevention: present and future. *Cancer Threatment Rewievs* 2001; 27: 261-73.
5. Somunoğlu S. Meme kanseri: belirtileri ve erken tanıda kullanılan tarama yöntemleri. *Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi* 2009; 4: 103-22.
6. Sasco AJ. Epidemiology of breast cancer: an environmental disease? *Epidemiology of breast cancer: an environmental disease? APMIS* 2001; 109: 80-92.
7. Krishan A, Fitz CM, Andritsch I. Drug retention, efflux, and resistance in tumor cells. *Cytometry* 1997; 29: 279-85.
8. Baguley BC. Classical and targeted anticancer drugs: an appraisal of mechanisms of multidrug resistance. *Methods Mol Biol* 2016; 1395: 19-37.

9. Fruci D, Cho WC, Nobili V, Locatelli F, Alisi A. Drug transporters and multiple drug resistance in pediatric solid tumors. *Curr Drug Metab* 2016; 17: 308-16.
10. Wu C, Gong MQ, Liu BY, Zhuo RX, Cheng SX. Co-delivery of multiple drug resistance inhibitors by polymer/inorganic hybrid nanoparticles to effectively reverse cancer drug resistance. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2017; 149: 250-9.
11. Strobl JS, Wonderlin WF, Flynn DC. Mitogenic signal transduction in human breast cancer cells. *Gen Pharmacol* 1995; 26: 1643-9.
12. Torry DS, Cooper GM. Proto-oncogenes in development and cancer. *Am J Reprod Immunol* 1991; 25: 129-32.
13. Anderson MW, Reynolds SH, You M, Maronpot RM. Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1992; 98: 13-24.
14. Nestal de Moraes G, Delbue D, Silva KL, et al. FOXM1 targets XIAP and Survivin to modulate breast cancer survival and chemoresistance. *Cell Signal* 2015; 27: 2496-505.
15. Maeda S, Saimura M, Minami S, et al. Efficacy and safety of eribulin as first- to third-line treatment in patients with advanced or metastatic breast cancer previously treated with anthracyclines and taxanes. *Breast* 2017; 32: 66-72.
16. Zhang T, Wang R, Liu Y, Huang J, Yang Z. Efficacy and safety of doublet versus single agent as salvage treatment for metastatic breast cancer pretreated with anthracyclines and taxanes: a systematic review and meta-analysis. *Curr Med Res Opin* 2016; 32: 1883-9.
17. Rincón R, Zazo S, Chamizo C, et al. c-Jun N-Terminal Kinase inactivation by Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1 determines resistance to Taxanes and Anthracyclines in breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2016; 15: 2780-90.
18. De Iulius F, Salerno G, Giuffrida A, et al. Breast cancer cells respond differently to docetaxel depending on their phenotype and on survivin upregulation. *Tumour Biol* 2016; 37: 2603-11.
19. Morse DL, Gray H, Payne CM, Gillies RJ. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 1495-504.
20. Lyseng-Williamson KA, Fenton C. Docetaxel: a review of its use in metastatic breast cancer. *Drugs* 2005; 65: 2513-31.
21. Karampeazis A, Vamvakas L, Agelidou A, et al. Docetaxel vs. vinorelbine in elderly patients with advanced nonsmall-cell lung cancer: A Hellenic Oncology Research Group Randomized Phase III Study. *Clin Lung Cancer* 2011; 12: 155-60.
22. Yang F, Luo LJ, Zhang L, et al. MiR-346 promotes the biological function of breast cancer cells by targeting SRCIN1 and reduces chemosensitivity to docetaxel. *Gene* 2017; 600: 21-8.
23. Zhang Y, Wang Y, Wei Y, et al. MiR-129-3p promotes docetaxel resistance of breast cancer cells via CP110 inhibition. *Sci Rep* 2015; 5: 15424.
24. Wang X, Xu C, Hua Y, et al. Exosomes play an important role in the process of psoralen reverse multidrug resistance of breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2016; 35: 186.
25. Hansen SN, Westergaard D, Thomsen MB, et al. Acquisition of docetaxel resistance in breast cancer cells reveals upregulation of ABCB1 expression as a key mediator of resistance accompanied by discrete upregulation of other specific genes and pathways. *Tumour Biol* 2015; 36: 4327-38.
26. Zhao P, Ma W, Hu Z, Zang L, Tian Z, Zhang K. Filamin A (FLNA) modulates chemosensitivity to docetaxel in triple-negative breast cancer through the MAPK/ERK pathway. *Tumour Biol* 2016; 37: 5107-15.
27. Su S, Ding Y, Li Y, Wu Y, Nie G. Integration of photothermal therapy and synergistic chemotherapy by a porphyrin self-assembled micelle confers chemosensitivity in triple-negative breast cancer. *Biomaterials* 2016; 80: 169-78.
28. Singel SM, Cornelius C, Batten K, et al. A targeted RNAi screen of the breast cancer genome identifies KIF14 and TLN1 as genes that modulate docetaxel chemosensitivity in triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 2061-70.
29. Selvendiran K, Tong L, Vishwanath S, et al. EF24 induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by increasing PTEN expression. *J Biol Chem* 2007; 282: 28609-18.
30. Tan X, Sidell N, Mancini A, et al. Multiple anticancer activities of EF24, a novel curcumin analog, on human ovarian carcinoma cells. *Reprod Sci* 2010; 17: 931-40.
31. Zhang D, Wang Y, Dong L, et al. Therapeutic role of EF24 targeting glucose transporter 1-mediated metabolism and metastasis in ovarian cancer cells. *Canc Sci* 2013; 104: 1690-6.
32. Subramaniam D, May R, Sureban SM, et al. Diphenyl difluoroketone: a curcumin derivative with potent in vivo anticancer activity. *Canc Res* 2008; 68: 1962-9.
33. Yang CH, Yue J, Sims M, Pfeffer LM. The curcumin analog EF24 targets NF- κ B and miR-NA-21, and has potent anticancer activity in vitro and in vivo. *PLoS One* 2013; 8: e71130.

34. Sun A, Lu YJ, Hu H, Shoji M, Liotta DC, Snyder JP. Curcumin analog cytotoxicity against breast cancer cells: exploitation of a redox-dependent mechanism. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 6627-31.
35. Yar Sağlam AS, Yilmaz A, Onen HI, Alp E, Kayhan H, Ekmekci A. HDAC inhibitors, MS-275 and salermide, potentiates the anticancer effect of EF24 in human pancreatic cancer cells. *EXCLI J* 2016; 15: 246-55.
36. Onen HI, Yilmaz A, Alp E, et al. EF24 and RAD001 potentiates the anticancer effect of platinum-based agents in human malignant pleural mesothelioma (MSTO-211H) cells and protects nonmalignant mesothelial (MET-5A) cells. *Hum Exp Toxicol* 2015; 34: 117-26.
37. Thomas SL, Zhao J, Li Z, et al. Activation of the p38 pathway by a novel monoketone curcumin analog, EF24, suggests a potential combination strategy. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 1309-16.
38. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol* 2011; 731: 237-45.
39. Smith SM, Wunder MB, Norris DA, Shellman YG. A simple protocol for using a LDH-based cytotoxicity assay to assess the effects of death and growth inhibition at the same time. *PLoS One* 2011; 6: e26908.
40. Pfaffl MV, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e36.
41. Adams B, Herold M, Ferstl E, et al. Anticancer effects of monocarbonyl analogs of curcumin: oxidative stress, nuclear translocation and modulation of AP-1 and NF- κ B. *Int J Cancer Ther Oncol* 2015; 3: 1-15.
42. Yang SJ, Lee SA, Park MG, et al. Induction of apoptosis by diphenyldifluoroketone in osteogenic sarcoma cells is associated with activation of caspases. *Oncol Rep* 2014; 31: 2286-92.
43. Lee CC, Houghton P. Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 237-43.
44. Nathwani SM, Butler S, Fayne D, et al. Novel microtubule-targeting agents, pyrrolo-1,5-benzoxazepines, induce apoptosis in multi-drug-resistant cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66: 585-96.
45. Vuorelaa P, Leinonenb M, Saikkuc P, et al. Natural products in the process of finding new drug candidates. *Curr Med Chem* 2004; 11: 1375-89.
46. Fury MG, Pfister DG. Current recommendations for systemic therapy of recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2011; 9: 681-9.
47. Fabbri F, Amadori D, Carloni S, et al. Mitotic catastrophe and apoptosis induced by docetaxel in hormone-refractory prostate cancer cells. *J Cell Physiol* 2008; 217: 494-501.
48. Grimer R, Judson I, Peake D, Seddon B. Guidelines for the management of soft tissue sarcomas. *Sarcoma* 2010; 2010: 5061-82.
49. Morse DL, Gray H, Payne CM, Gillies RJ. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 1495-504.
50. Yeung TK, Germond C, Chen X, Wang Z. The mode of action of taxol: apoptosis at low concentration and necrosis at high concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 398-401.
51. Wang H, Ye T, Hajar A, et al. Multiple mechanisms underlying acquired resistance to taxanes in selected docetaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer* 2014; 22: 14-37.
52. Hernández-Vargas H, Palacios J, Moreno-Bueno G. Molecular profiling of docetaxel cytotoxicity in breast cancer cells: uncoupling of aberrant mitosis and apoptosis. *Oncogene* 2007; 26: 2902-13.
53. Trebunova M, Laputkova G, Slaba E, Lacjakova K, Verebova A. Effects of docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide on human breast cancer cell line MCF-7. *Anticancer Res* 2012; 32: 2849-54.
54. Chen W, Zou P, Zhao Z, et al. Synergistic anti-tumor activity of rapamycin and EF24 via increasing ROS for the treatment of gastric cancer. *Redox Biol* 2016; 10: 78-89.
55. Liang Y, Yin D, Hou L, et al. Diphenyl difluoroketone: a potent chemotherapy candidate for human hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2011; 6: e23908.
56. Adams BK, Cai J, Armstrong J, et al. EF24, a novel synthetic curcumin analog, induces apoptosis in cancer cells via a redox-dependent mechanism. *Anticancer Drugs* 2005; 16: 263-75.
57. Chen X, Dai X, Zou P, et al. Curcuminoid EF24 enhances the anti-tumour activity of Akt inhibitor MK-2206 through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in gastric cancer. *Br J Pharmacol* 2017 Mar 3 [Epub ahead of print].
58. Jochum W, Passetgué E, Wagner EF. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* 2001; 20: 2401-12.
59. Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001; 20: 2390-400.
60. De Sousa SO, Mesquita RA, Pinto DS Jr, Gutkind S. Immunolocalization of c-Fos and c-Jun in human oral mucosa and in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 78-81.

61. el Khyari S, Bourgarel V, Barra Y, Braguer D, Briand C. Pretreatment by tubulin agents decreases C-MYC induction in human colon carcinoma cell line HT29-D4. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231: 751-4.
62. Li Y, Shi T, Zhao W. The mechanism of docetaxel-induced apoptosis in human lung cancer cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2000; 22: 208-11.
63. Kim SM, Lee SY, Yuk DY, et al. Inhibition of NF-kappaB by ginsenoside Rg3 enhances the susceptibility of colon cancer cells to docetaxel. *Arch Pharm Res* 2009; 32: 755-65.
64. "Docetaxel With or Without a Phytochemical in Treating Patients With Breast Cancer". <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00852332/18/04/2017>.
65. "Curcumin" in Combination With Chemotherapy in Advanced Breast Cancer". <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03072992/18/04/2017>.