

# Kalsitriol ve Doksorubisin Kombinasyonunun MCF-7 Üzerine Olası Anti Kanser Etkilerinin Araştırılması

## An Investigation of Anticancer Effects of Doxorubicin and Calcitriol Combination on MCF-7 Cells

Özge Bildiren<sup>1</sup>, Buse Cevatemre<sup>2</sup>, Ebru Nur Ay<sup>1,3</sup>, Güneş Özen<sup>1</sup>, Ceylan Hepokur<sup>4</sup>, Merve Erkisa<sup>5</sup>, Özlem Küçük hüseyin<sup>1</sup>, Engin Ulukaya<sup>5</sup>, Serap Kuruca<sup>6</sup>, İlhan Yaylım<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Istanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Bursa, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>İstinye Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, İstanbul, Türkiye

<sup>4</sup>Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Sivas, Türkiye

<sup>5</sup>İstinye Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>6</sup>Istanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**Cite this article as:** Bildiren Ö, Cevatemre B, Ay EN, Özen G, Hepokur C, Erkisa M, et al. An Investigation of Anticancer Effects of Doxorubicin and Calcitriol Combination on MCF-7 Cells. Experimed 2018; 8(2): 41-6.

### ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada amacımız, belirli bir dozun üzerinde kardiyak yan etkileri oldukça fazla olan ve meme kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerden doksorubisinin, tedavide kullanım miktarlarını azaltmayı ve etkinliğini arttırmayı sağlayan bir maddeyi saptamaktır. Etkin madde olarak anti proliferatif etkisi olduğu düşünülen vitamin D analoglarından biri olan kalsitriol seçilmiş ve doksorubisin ile kombine tedavisinin, insan meme kanseri hücre hattı MCF-7 üzerine sitotoksik etkisinin saptanması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı kalsitriol ile muamele edilerek, gerçek zamanlı olarak, x-CELLigence cihazında 72 saat inkübasyona bırakıldı ve kalsitriolün anti-proliferatif optimum doz tespiti zamana bağlı hücre indeksi grafiği The xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) software programı kullanılarak yapıldı. Kalsitriol optimum dozu ve doksorubisinin farklı dozlarının kombinasyonu MCF-7 hücre kültürü ile muamele edilerek sitotoksikite tayini için Sulforhodamine-B (SRB) uygulaması ve spektrofotometrik ölçüm uygulandı. Spektrofotometrik ölçüm sonuçları anlamlılık sonuçları için Student's t-Testi ile değerlendirildi.

**Bulgular:** MCF-7 hücrelerinin antiproliferatif optimum kalsitriol doz tespiti zamana bağlı hücre indeksi grafiği RTCA software programı kullanılarak yapılmıştır. Sitotoksikite tayini için uygulanan SRB yöntemi sonucu elde edilen spektrofotometrik ölçüm sonuçları GraphPad Prism programı kullanılarak Student's t-testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kalsitriol optimum dozu 250 nM tespit edilmiştir. Doksorubisinin farklı dozları (1,84 µM-0,92 µM), kalsitriol (250 nM) ve kalsitriol olmaksızın MCF-7 hücre hattı ile sitotoksik etki saptaması için muamele edilmiştir. 0,46 µM doksorubisin ve optimum kalsitriol kombinasyonunun sitotoksik açıdan diğer dozlara göre anlamlı olduğu (p=0,0087) fakat doksorubisin kullanımında doz azaltımını sağlayacak kadar etkin olmadığı saptanmıştır.

### ABSTRACT

**Objectives:** This study aimed to identify a substance that both increases the efficiency and decreases the dose of doxorubicin. Doxorubicin has considerable cardiac side effects at certain doses when used treating breast cancer. Calcitriol, one of the vitamin D analogs considered to have antiproliferative effects, was selected, and its cytotoxic effects on the human breast cancer cell line MCF-7 were investigated in combination with doxorubicin.

**Materials and Methods:** MCF-7 cell line was treated with calcitriol in real time for 72 h in x-CELLigence. The antiproliferative optimal dose of calcitriol was determined by time-dependent cell index graph plotted using The xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) software program. The combination of different doses of doxorubicin and this optimal dose of calcitriol was used to treat the MCF-7 cell line. Then, Sulforhodamine-B (SRB) assay was conducted, and spectrophotometric measurements were performed for cytotoxicity assay. The results of these spectrophotometric measurements were analyzed by Student's t-test.

**Results:** The optimal antiproliferative calcitriol dose detection of MCF-7 cells was performed using the time-dependent cell index graph RTCA software program. Spectrophotometric measurements obtained using the protein-staining sulforhodamine B (SRB) assay for cytotoxicity determination were statistically evaluated by the Student's t-test using the GraphPad Prism program. The optimal dose of calcitriol was determined to be 250 nM. Different doses of doxorubicin (1.84-0.92 µM), calcitriol (250 nM), and calcitriol without the MCF-7 cell line were then used for detecting the cytotoxic effect. The combination of 0.46 µM doxorubicin and the optimal dose of calcitriol was found to be cytotoxic compared with other doses (p=0.0087); however, it was not as effective as the dose reduction obtained when using doxorubicin.

**Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** İlhan Yaylım **E-mail:** ilhanyaylim@gmail.com

**Geliş Tarihi/Received Date:** 05.07.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 17.10.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine [http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/\\_sayfasından](http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından) ulaşılabilir.

**Sonuç:** Doksorubisinin, kalsitriol ile kombine kullanımının günümüzde kullanılan dozlar üzerinde azaltıcı yönde anlamlı bir etkisinin olmadığını saptanmıştır. Vitamin D ve doksorubisin birlikte kullanımının meme kanserinde fayda sağlamayacağını söylemek için ise henüz erkendir. İlerleyen çalışmalarda vitamin D'nin farklı analogları ile çeşitli çalışmalar yapılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Meme Kanseri, doksorubisin, kalsitriol, MCF-7, hücre kültürü

## GİRİŞ

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser türlerindedir. Kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Avrupa'da yılda 180.000, Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda 184.000 yeni olgu saptanmaktadır. Meme kanseri sıklığı dünya üzerinde ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir (1). Türkiye'de yapılan kanser taramalarının verilerine göre her yıl yaklaşık 159.000 yeni kanser vakası ortaya çıkmaktadır (2). Meme kanseri, kadınlarda erkeklere oranla daha sık görülmekte ve kanser nedenli ölümlerin başında yer almaktadır. Meme kanseri tedavisinde cerrahi ve adjuvan yöntemler kullanılmaktadır (3). Meme kanseri kemoterapi tedavileri, adjuvan ve neo adjuvan olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Adjuvan ve neoadjuvan kemoterapide, ortak ilaçlar kullanıldığı gibi farklı anti-kanser ajanlar da kullanılmaktadır (4). Temel tümör biyolojisi ve klinik yenilikler arasındaki etkileşim sonucu ulaşılan bulgular, kemoterapi ajanlarının daha etkin kullanımı ile kanser tedavisinde ilerleme sağlamaktadır. Yaygınlaşan kanser tedavisi, kanser ve tümör baskılayıcıların işleyişinden elde edilen moleküler mekanizmaları hedef almıştır (5).

Doksorubisin, meme kanseri tedavisinde etkin olarak kullanılan bir anti-kanser ajandır (6). Yapılan pek çok çalışma da antiasiklin tipi bir antibiyotik olan doksorubisinin, diğer antrasiklin grup üyeleri gibi DNA ve RNA sentezini üzerindeki etkisi tespit edilmiştir (7). Meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan doksorubisin, DNA replikasyonunda kilit bir enzim olan topoizomera II üzerinden DNA'nın makromoleküler biosentezini inhibe eder (6, 8, 9). Doksorubisin akciğer, mesane, tiroid bezi, over kanseri, kemik sarkomu ve yumuşak doku sarkomu, Hodgkin ve Hodgkin dışı lenfomalar, nöroblastoma, Wilmstümörü, akut lenfoblastik lösemi, akut miyeloid lösemi gibi birçok kanserin tedavisinde sıklıkla kullanılan bir tedavi seçeneğidir (10-12). Bunun yanı sıra, Doksorubisinin kardiyotoksitesinin yüksek olması nedeniyle kanser tedavisinde sınırlamaya neden olmaktadır (13).

Vitamin D ise yağda çözünen bir grup steroid ve bunların ilgili metabolitlerini içerir. Doğada, iki büyük vitamin D formu olan, ergokalsiferol (D2 vitamini) ve kolekalsiferol (D3 vitamini) bulunmaktadır. D2 vitamini, bitkilerde fotokimyasal olarak sentezlenir, D3 vitamini ise, hayvan ve insan derisinde güneş ışığına bağlı olarak, özellikle de 290-315 nm UV-B radyasyonlarında üretilir (14). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (kalsitriol) D vitamininin biyolojik olarak aktif hormonal formunu oluşturur (15).

**Conclusion:** The combined use of doxorubicin with calcitriol was found to have no significant effect in reducing the doses presently being used. Hence, it is too early to state that a combination of vitamin D and doxorubicin in breast cancer treatment will not have any beneficial effects. Other vitamin D analogs might be potential candidates for breast cancer treatment in further studies.

**Keywords:** Breast cancer, doxorubicin, calcitriol, MCF-7, cell culture

Vitamin D'nin klasik sentez yolu, karaciğer ve böbrekte vitamin D<sub>2</sub> ve D<sub>3</sub>'ün 25 hidroksilaz ve 1α-hidroksilaz aktivitesiyle ilerler. İlk olarak, hidroksilasyon karaciğerde meydana gelir ve 25(OH)D<sub>3</sub> üretilir. 25(OH)D<sub>3</sub> sistemik dolaşıma girer ve 12-19 günlük bir yarılanma ömrüne sahiptir. İkinci, hidroksilasyon böbreklerde oluşur ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (kalsitriol) vitamin D'nin biyolojik olarak aktif hormonal formunu oluşturur. 25(OH)D<sub>3</sub> serum seviyeleri, vücuttaki genel vitamin D miktarını vermektedir. Diyetle alınan veya deride sentezlenmiş vitamin D ile ilişkili, dolaşımdaki 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> formunda iki temel enzim görev yapmaktadır. Bunlar, hepatik mikrozomal veya mitokondrial D 25-hidroksilaz (CYP27A1) ve renal mitokondriyal enzim 1α-hidroksilaz CYP27B1'dir (6). Bu hidroksilazlar, sitokrom P450 karışık fonksiyonlu mono oksidazları olarak bilinen bir protein sınıfına aittir. Son yıllarda makrofajlar, keratinositler, prostatlar ve kolon kanseri hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde 25 (OH) D<sub>3</sub>-1α-hidroksilaz (CYP27B1) aktivitesi bildirilmiştir (16, 17). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün çeşitli dokularda lokal olarak üretildiği gösterilmiştir. Hedef dokuların (örneğin, kolon, prostat, meme, akciğer, pankreas) kalsitriolü sentezleyebileceği ve bozabildiği gösterilmiştir. Çeşitli insan kanser türlerinde kalsitriolün lokal üretiminin ve degradasyonunun öneminin olduğu gösterilmiştir (18, 19). Kalsitriol, vitamin D reseptörü (VDR) ve vitamin D yanıt elementlerine (VDRE) bağlıdır. Birkaç transkripsiyon faktörü ile bağlantılı olarak, bu kompleks vitamin D'ye cevap veren genlerin transkripsiyonuna yol açar. Vitamin D / VDR dengesi nedeniyle ortaya çıkan başlıca hüresel ve moleküler fonksiyonlar arasında kalsiyum etkileri, antimikrobiyal, doku rejenerasyonu, bağışıklık modülasyonu ve otoantikör üretimi, kas fonksiyonu, steroid etkililiği, epigenetik düzenlenme, immün yanıt, inflamasyon ve hüresel proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis yer almaktadır (20).

Vitamin D ile meme kanseri arasında ilişki olabileceği ve potansiyel biyolojik mekanizmaları aydınlatmak için yapılan temel araştırmalar, normal meme dokusundaki vitamin D sinyalinin moleküler etkilerini tanımlamaya odaklanmıştır. Meme kanseri hücreleri üzerine 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün etkileri G0 / G1' de hücre döngüsü durması, farklılaşma belirteçlerinin indüksiyonu ve apoptozun aktivasyonu içermesinin açıklanması ile tanımlanmıştır. İnsan meme kanseri hücrelerinde 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ile regüle edilen klinik biyolojik belirteçler arasında BRCA1, p21, p53, c-Myc ve siklin D1 bulunur. Bu bulgulara dayanarak, meme kanseri tedavisinde Vitamin D reseptör (VDR) agonistlerinin terapötik kullanımı konusunda büyük ilgi odağı olmuştur. Vitamin D analoglarının kanser tedavisinde potansiyel etkilere sahip olabileceğine dair birçok çalışma bulunmaktadır (21-24) Yapılan *in vitro* ve *in vivo*

çalışmaların bazılarında Vitamin D'nin meme karsinogenezi üzerindeki etkilerini incelemiş ve bu veriler meme kanseri gelişiminde Vitamin D'nin koruyucu bir role sahip olduğunu göstermiştir (25, 26). Örneğin, farelerde Vitamin D yetersizliği, VDR gen ifadesi durdurulmuş farelerde kanser gelişimine yol açmaktadır (27).

Araştırmamızın amacı belirli bir dozun üzerinde yan etkileri oldukça fazla olan kemoterapötiklerden doksorubisinin, meme kanseri tedavisinde kullanım miktarlarını azaltmayı ve etkinliğini arttırmayı sağlayan bir madde saptamaktır. Etken madde olarak anti proliferatif etkisi saptanmış olan vitamin D analoglarından biri olan kalsitriol ile doksorubisin kombine kullanımının MCF-7 insan meme kanseri hücre hattına yönelik etkilerini saptamak üzere çalışmamız gerçekleştirilmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı, %5 fetal bovine serum, %1 Penisilin-G (100 U/mL)-Streptomisin (100 µg/mL) içeren RPMI besiyerinde hücre sayısı bakımından uygun sayıya ulaşıncaya kadar hücre kültüründe çoğaltılması sağlandı. Hücreler besiyeri ortamında 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda kültüre edildi. Deney için uygun koşullara getirilen hücreler, kullanılan 96 kuyulu E-plate içerisindeki her kuyuya 100 µL besiyeri koyularak ve 30 dakika 37 °C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyonu takiben bazal ölçüm yapılmak üzere xCELLigence cihazına yerleştirildi. Ölçüm tamamlandıktan sonra e-plate cihazdan çıkartıldı ve hücre soyları 100 µl besiyeri içerisinde 5×10<sup>3</sup> hücre/kuyucuk (3 tekrarlı) olacak şekilde 96 kuyucuklu altın mikroelektrodlarla entegre E-plate'lere ekildi. 24 saat 37 °C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyonu takiben yapılmış olan hücreler üzerinden hücrelere zarar vermeden 100 µl besiyeri uzaklaştırıldı. Kalsitriolün farklı dozları xCELLigence sistemi ile gerçek zamanlı olarak, MCF-7 hücre hattına uygulandı. İnsan meme kanseri hücresi MCF-7 üzerindeki sitotoksik etkileri, hücre büyümesini, proliferasyonunu, morfolojik değişikliklerini, canlılığını görüntülemek ve optimum kalsitriol doz saptamak üzere 48 saatlik işlem devam ettirildi. Zamana bağlı hücre indeksi grafiği 48 saat sonunda RTCA software programı kullanılarak görüntüldü.

Kalsitriolün optimum anti-proliferatif etki gösterdiği 250 nm olarak saptandı. 250 nM'lık kalsitriol ile doksorubisinin seri di-

lüsyon yapılan dozlarının (1,84 µM-0,92 µM) kombinasyonunun insan meme kanseri MCF-7 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisinin saptanmasına yönelik SRB testi uygulamasına geçildi. Bunun için 5000h/kuyu olmak üzere ekimi yapılmış MCF-7 hücrelerinin 24 saat inkübasyonundan sonra, kemoterapi ilaç kombinasyonları ile kalsitriol eklenmiş ve kalsitriol eklenmemiş gruplarını içermek üzere SRB testi için 48 saat inkübe edildi. SRB testi sonucunda spektrofotometrik ölçüm ile sitotoksik etki saptandı.

Vitamin D analoğu kalsitriol, doksorubisin ve her ikisinin kombinasyonunun MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla 96-kuyucuklu hücre kültür kaplarına her bir doz 3 farklı kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ayrıca her bir deney en az 2 ayrı bağımsız deney şeklinde gerçekleştirilmiştir.

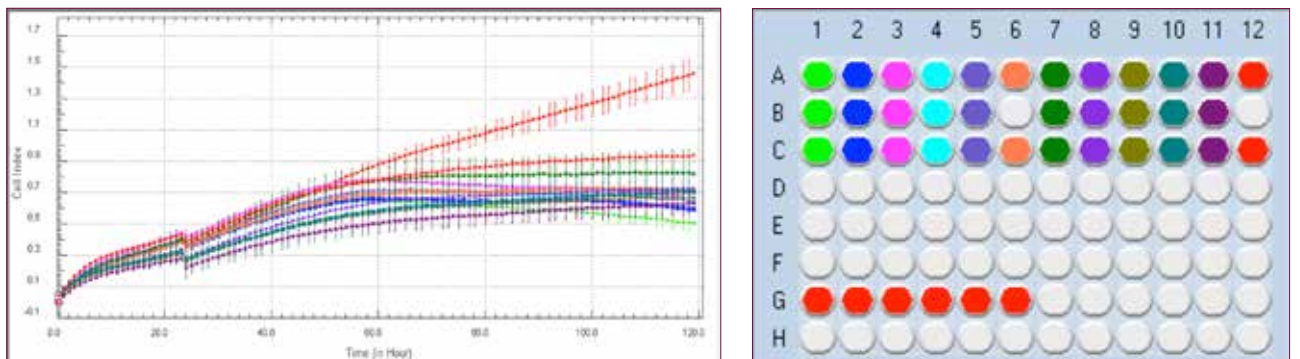
## İstatistiksel Analiz

MCF-7 hücrelerinin antiproliferatif optimum kalsitriol doz tespiti zamana bağlı hücre indeksi grafiği RTCA software programı kullanılarak yapılmıştır. Sitotoksikite tayini için uygulanan SRB yöntemi sonucu elde edilen spektrofotometrik ölçüm sonuçları, GraphPad Prism programı kullanılarak student's t testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Anlamlılık değeri p<0,05 olarak kabul edildi.

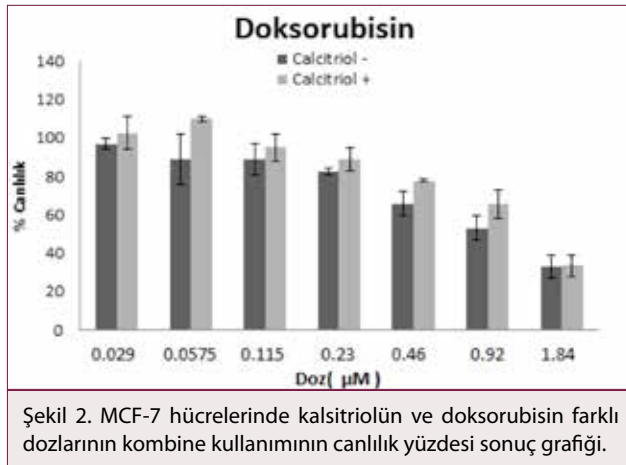
## BULGULAR

Kuyulara 4 µM'dan başlayarak seri dilüsyon ile kalsitriol dozları uygulandı (Şekil 1). Deney sonucu uygulanan tüm kalsitriol dozlarının anti-proliferatif etkisi olduğu gözlemlendi. Kalsitriol için seçilen optimum doz 250 nM'dı. Ertesi gün kuyu başına 5000 hücre olmak üzere MCF-7 hücreleri üzerinde tedaviye başlandı. 48 saat inkübasyonda tutulan hücrelerin SRB metodu ile doksorubisin ve kalsitriol kombinasyonlarının sitotoksik etkisi spektrofotometrik ölçüm yoluyla saptandı.

Doksorubisinin farklı dozları (1,84 µM-0,029 µM) ve kalsitriol optimum anti-proliferatif dozunun (250 nM) kombine tedavisinin MCF-7 hücreleri üzerinde SRB metodu ile ölçümü sonucu oluşturulan canlılık yüzdelere grafiği Şekil 2'de yer almaktadır. En yüksek doz 1,84 µM olmak üzere soldan sağa doğru seri



Şekil 1. Chex-CELLigence kalsitriol optimum doz tespit grafiği; 1 numara (4 µM) en yüksek kalsitriol dozunu içermektedir. Kalsitriol farklı dozları 1'den sağa doğru seri dilüsyon ile uygulanmıştır. 5 numaralı örnek grubu (250 nM) optimum doz olarak belirlenmiştir.



Şekil 2. MCF-7 hücrelerinde kalsitriolün ve doksorubisin farklı dozlarının kombine kullanımının canlılık yüzdesi sonuç grafiği.

dilüsyon yapılmıştır. Açık gri ile belirtilen grafik sütunu doksorubisin ve kalsitriol kombinasyonu iken, koyu gri ile gösterilen grafik sütunu sadece doksorubisin etkisini göstermektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. 250 nM kalsitriol ve 1,84 µM doksorubisin kombinasyonu p=0,9171, 250 nM kalsitriol ve 0,94 µM doksorubisin kombinasyonu p=0,0331, 250 nM kalsitriol ve 0,46 µM doksorubisin kombinasyonu p=0,0087, 250 nM kalsitriol ve 0,23 µM doksorubisin kombinasyonu p=0,0757, 250 nM kalsitriol ve 0,115 µM doksorubisin kombinasyonu p=0,2434, 250 nM kalsitriol ve 0,0575 µM doksorubisin kombinasyonu p=0,0176, 250 nM kalsitriol ve 0,029 µM doksorubisin kombinasyonu değerlerine sahiptir. Aynı zaman periyodu içinde kalsitriol varlığı baz alınarak, doksorubisin ile kombine kullanımı ve tek başına doksorubisin kullanımının istatistiksel değerlendirmesi yapılmıştır.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde meme kanseri tedavisinde ilaç kombinasyonlarının kullanılması konusunda yoğun bir ilgi vardır (28-30). Bu fikre uygun olarak, kombinasyon halinde olan ilaçların bireysel etkilerin toplamından daha büyük bir etki üretmesi ve daha etkili bir tedavi sağlaması durumunda, terapötik bir etki elde edileceği düşünülmektedir. MCF-7 insan meme kanseri hücreleri, antitümör ilaçların uygulanmasını araştırmak için yaygın olarak kullanılan bir hücre modelidir. Çeşitli çalışmalar farklı antikanser ilaçların dirençli hücreler üzerindeki antiproliferatif etkilerini ortaya koymuştur (19, 31-36).

Vitamin D ve analoglarının, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, apoptozis, anjiyogenez paratiroid hormon ilişkili peptid salgılanması ve tümör metastazları ile ilişkili çeşitli mekanizmalarda etkisi olduğu bilinmektedir (20, 37). *In vivo* ve *in vitro* yapılan çalışmalarda Vitamin D'nin VDR reseptörü ile bağlanmasının hücre döngüsü, apoptozis ve hücre farklılaşması ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu regüle ettiği belirtilmektedir. Bu durum vitamin D'nin kanser tedavisinde etkili bir ajan olabileceğini düşündürmektedir (38, 39). VDR nin klasik yerleşimi olan kemik, böbrek ve bağırsak yolu dışında lösemi hücreleri ve birçok malign hücre tipi gibi epitel ve mezenşimal hücrelerde yer alması da bu düşünceyi kuvvetlendirmektedir (20).

Tina Gissel, Lars Rejnmark ve arkadaşlarının vitamin D alımı ve meme kanseri ile ilgili literatürde yer alan çalışmalara dair yaptığı analizde, toplamda 1731 adet meme kanseri ve vitamin D ilişkili yayın bulunduğu fakat bunlardan sadece 6 tanesinin direkt vitamin D alımı ve meme kanseri riskine dair orijinal verileri içerdiğini belirtmektedir. Çalışmalarda 100-400 IU/gün düzeyinde alınan vitamin D'nin, meme kanseri riskinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığı, bu düzeyin üzerinde vitamin D alımında ise çalışma sonuçlarının riski düşürmede etkili olabileceğine dair sonuçlar yer almaktadır (33).

Yaptığımız çalışmada görüldüğü üzere Vitamin D'nin optimum anti proliferatif dozu, geçmişte yapılan çalışmalarda ki doz ile farklılık göstermektedir (40, 41). Buna ek olarak vitamin D'nin, uzun süreli kullanımda moleküler yapıyı nasıl etkilediğine ve herhangi bir toksik etkisi olup olmadığına dair yaş, cinsiyet vs. gibi durumlarla ilişkilendirerek daha kapsamlı çalışmalar da yapılmalıdır. Kalsitriolün, anti-proliferatif etkisi olduğu açıktır fakat bunun yanında vitamin D'nin kalsemik etkisi ilaç kombinasyonları ile kullanımında çeşitli zorluklar oluşturabilir.

Çalışmamızın sonucunda, antrasiklin grubu ilaçlardan doksorubisinin, kalsitriol ile kombine kullanımının günümüzde kullanılan dozlar üzerinde azaltıcı yönde anlamlı bir etkisinin olmadığını saptadık. Bunun yanında iki etken maddenin kombine kullanımının herhangi bir etkisinin olmadığını söylemek için ise henüz erkendir. İlerleyen çalışmalarda Vitamin D'nin farklı analogları kullanılarak, kemoterapötik ilaçlar ile etkileşimi incelenebilir. Doksorubisin ile kalsitriolün kombine kullanımının moleküler yollar üzerindeki etkilerini saptamak için çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bu nedenle bu alan ayrıca, vitamin D düzeyleri ve tümör gelişimi ile ilişkili moleküler yollarda görevli moleküllerin düzeylerinin değişim ve etkileşimlerine dair yapılacak çalışmalara da ihtiyaç göstermektedir.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir - İ.Y.; Tasarım - İ.Y.; Denetleme - İ.Y.; Kaynaklar - E.U., İ.Y., S.K.; Gereçler - E.U., İ.Y.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - Ö.B., B.C.; Analiz ve/veya Yorum - Ö.B., B.C., G.Ö., İ.Y.; Literatür Taraması - : Ö.B., E.N.A.; Yazıyı Yazan - Ö.B., E.N.A., İ.Y.; Eleştirel İnceleme - G.Ö., C.H., M.E., E.U., Ö.K., S.K., İ.Y.

**Teşekkür:** İstanbul Üniversitesi Bilimsel Projeleri Araştırma Birimi'ne finansal katkıları için teşekkür ederiz.

**Çıkar Çatışması:** Yazarların beyan edecek çıkar çatışması yoktur.

**Finansal Destek:** Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Projeleri Araştırma Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 45744).

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept - İ.Y.; Design - İ.Y.; Supervision - İ.Y.; Resource - E.U., İ.Y., S.K.; Materials - E.U., İ.Y.; Data Collection and/or Processing - Ö.B., B.C.; Analysis and/or Interpretation - Ö.B., B.C., G.Ö., İ.Y.; Literature Search - Ö.B., E.N.A.; Writing - Ö.B., E.N.A., İ.Y.; Critical Reviews - G.Ö., C.H., M.E., E.U., Ö.K., S.K., İ.Y.

**Acknowledgements:** Thanks for the Istanbul University Scientific Research Projects Entity's financial supports.

**Conflict of Interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

**Financial Disclosure:** This research was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Entity (Project No: 45744).

## KAYNAKLAR

- Haydaroğlu A, Dubova S, Özşaran Z. Ege Üniversitesinde Meme Kanseri, 3897 Olgunun Değerlendirilmesi. *Meme Sağlığı Dergisi* 2005; 1.
- Türkiye'de Kansere Önleme ve Taramaları 2014 Kısa Raporu. *Kanser Daire Başkanlığı*.
- Aydıntuğ S. Meme Kanserinde Erken Tanı TTB STED 2004; 6: 228.
- Wang Z, Chen JQ, Liu JL, Qin XG, Serious neutropenia following neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer: A case report. *Oncol Lett* 2016; 11: 1597-9. [\[CrossRef\]](#)
- Norman AW. Sunlight, season, skin pigmentation, vitamin D and 25-hydroxy vitamin D: Integral components of the vitamin D endocrine system. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 1108-10. [\[CrossRef\]](#)
- Harbeck N, Salem M, Nitz U, Gluz O, Liedtke C. Personalized treatment of early-stage breast cancer: present concepts and future directions. *Cancer Treat Rev* 2010; 36: 584-94. [\[CrossRef\]](#)
- Nabholtz JM. Docetaxel-anthracycline combinations in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 79: 3-9. [\[CrossRef\]](#)
- Bagheri F, Safarian S, Eslaminejad M, Sheibani N. Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Res* 1976; 36: 2891-5.
- Gudkov AV, Zelnick CR, Kazarov AR, Thimmapaya R, Suttle DP, Beck WT, Roninson IB, Thimmapaya R, Suttle DP, Beck WT, Roninson IB. Isolation of genetic suppressor elements, inducing resistance to topoisomerase II interactive cytotoxic drugs, from human topoisomerase II cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3231-5. [\[CrossRef\]](#)
- Thorn C, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard, McLeod H, Klein T and Altman R. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* 2011; 21: 440-6. [\[CrossRef\]](#)
- Dimitrakis P, Romay-Ogando MI, Timolati F, Suter TM, Zuppinger C. Effects of doxorubicin cancer therapy on autophagy and the ubiquitin-proteasome system in long-term cultured adult rat cardiomyocytes. *Cell Tissue Res* 2012; 350: 361-72. [\[CrossRef\]](#)
- Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther* 2014; 10: 853-8. [\[CrossRef\]](#)
- Ayla Ş, Oktar H, Tanrıverdi G, Cengiz M, Özkılıç AÇ, Böttjer N, et al. Doksorubisin ile Oluşturulmuş Deneysel Kardiyotoksiste Üzerine Nikotinamidin Etkisi. *Cerrahpaşa Tıp Derg* 2008; 39: 7-14.
- Barinaga M. From bench top to bedside. *Science* 1997; 278: 1036-9. [\[CrossRef\]](#)
- Cross HS. Extrarenal vitamin D hydroxylase expression and activity in normal and malignant cells: Modification of expression by epigenetic mechanisms and dietary substances. *Nutr Rev* 2007; 65: S108-S112. [\[CrossRef\]](#)
- Robsahm TE, Tretli S, Dahlback A, Moan J. Vitamin D3 from sunlight may improve the prognosis of breast, colon and prostate cancer (Norway). *Cancer Causes Control* 2004; 15: 149-58. [\[CrossRef\]](#)
- Tuohimaa P. Vitamin D, aging, and cancer. *Nutr Rev* 2008; 66: S147-S152. [\[CrossRef\]](#)
- Bernardi RJ, Johnson CS, Modzelewski RA, Trump DL. Antiproliferative effects of 1 $\alpha$ , 25-dihydroxy vitamin D3 and vitamin D analogs on tumor-derived endothelial cells. *Endocrinology* 2002; 143: 2508-14. [\[CrossRef\]](#)
- Chen ST, Pan TL, Tsai YC and Huang CM. Proteomics reveals protein profile changes in doxorubicin-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett* 2002; 181: 95-107. [\[CrossRef\]](#)
- Hines SL, Jorn HKS, Thompson KM, Larson JM. Breast cancer survivors and vitamin D: A review. *Nutrition* 2010; 26: 255-62. [\[CrossRef\]](#)
- Colston KW, Hansen CM. Mechanisms implicated in the growth regulatory effects of vitamin D in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2001; 9: 45-59. [\[CrossRef\]](#)
- Jensen S, Madsen MW, Lukas J, Binderup L, Bartek J. Inhibitory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the G1-S phase controlling machinery. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 1370-80. [\[CrossRef\]](#)
- Mehta RG, Mehta RR. Vitamin D and cancer. *J Nutr Biochem* 2002; 13: 252-64. [\[CrossRef\]](#)
- Welsh JE, Wietzke JA, Zinser GM, Smyczek S, Romu S, Tribble E, et al. Impact of the vitamin D receptor on growth regulatory pathways in mammary gland and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 83: 85-92. [\[CrossRef\]](#)
- Fu GK, Lin D, Zhang MY, Bikle DD, Shackleton CH, Miller WL, et al. Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase and mutations causing vitamin D dependent rickets type I. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 1961-70. [\[CrossRef\]](#)
- Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S. 25-Hydroxyvitamin D3-1-hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science* 1997; 277: 1827-30. [\[CrossRef\]](#)
- Friedrich M, Reichrath J, Chen T, et al. Expression of 25-hydroxyvitamin D3 1-hydroxylase in breast tissue. In: Anthony W. Norman Jürgen Roth Lelio Orci, eds. *Vitamin D endocrine system: structural, biological, genetic and clinical aspects*. University of Riverside Press, 2000; 189-91.
- Bonadonna G, Brusamolino E, Valagussa P, Rossi A, Brugnattelli L, Brambilla C, et al. Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. *N Engl J Med* 1976; 294: 405-10. [\[CrossRef\]](#)
- Carter SK. Single and combination nonhormonal chemotherapy in breast cancer. *Cancer* 1972; 30: 1543-55. [\[CrossRef\]](#)
- Jones SE, Durie BG, Salmon SE. Combination chemotherapy with adriamycin and cyclophosphamide for advanced breast cancer. *Cancer* 1975; 36: 90-7. [\[CrossRef\]](#)
- Crown J, O'Leary M, Ooi WS. Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. *Oncologist* 2004; 9: 24-32. [\[CrossRef\]](#)
- Dieras V. Docetaxel in combination with doxorubicin: a phase I dose-finding study. *Oncology (Williston Park)* 1997; 11: 17-20.
- Kars MD, Iseri OD, Gündüz U, Ural AU, Arpacı F, Molnár J. Development of rational in vitro models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds. *Anticancer Res* 2006; 26: 4559-68.
- Li J, Xu LZ, He KL, Guo WJ, Zheng YH, Xia P, et al. Reversal effects of nomegestrol acetate on multidrug resistance in adriamycin-resistant MCF-7 breast cancer cell line. *Breast Cancer Res* 2001; 3: 253-63. [\[CrossRef\]](#)
- Martin M. Docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide (the TAC regimen): an effective adjuvant treatment for operable breast cancer. *Womens Health (Lond)* 2006; 2: 527-37. [\[CrossRef\]](#)
- Prados J, Melguizo C, Rama AR, Ortiz R, Segura A, Boulaiz H, et al. GEF gene therapy enhances the therapeutic efficacy of doxorubi-

- cin to combat growth of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66: 69-78. [\[CrossRef\]](#)
37. Bemd GJCM, Chang GTG. Vitamin D and Vitamin D Analogs in Cancer Treatment. *Current Drug Targets* 2002; 3: 85-94.
  38. Gissel T, Rejnmark L, Mosekilde L, Vestergaard P. Intake of vitamin D and risk of breast cancer; A meta-analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 111: 195-9. [\[CrossRef\]](#)
  39. Reichrath J, Friedrich M, Vogt T. Vitamin D and its analogs in cancer prevention and therapy. *Anticancer Res* 2012; 32: 209-10.
  40. Holick MF. Vitamin D: Its Role in cancer prevention and treatment. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92: 49-59. [\[CrossRef\]](#)
  41. Trump DL, Hershberger PA, Bernardi RJ, Ahmed S, Muindi J, Fakhri M, et al. Anti Tumor activity of calcitriol. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90: 519-26. [\[CrossRef\]](#)