



# **MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE MİRİSETİNİN KEMOTERAPİ DUYARLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ**

**Hediye TEKELİOĞLU**

**2022  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TIBBİ BİYOKİMYA**

**Tez Danışmanı  
Dr. Öğr. Ü. Özlem CESUR GÜNAY**

**MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE MİRİSETİNİN KEMOTERAPİ  
DUYARLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ**

**Hediye TEKELİOĞLU**

**Tez Danışmanı  
Dr. Öğr. Ü. Özlem CESUR GÜNAY**

**T.C.  
Karabük Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında  
Yüksek Lisans Tezi  
Olarak Hazırlanmıştır**

**KARABÜK  
Aralık 2022**

## TEZ ONAY SAYFASI

Hediye TEKELİOĞLU tarafından hazırlanan “MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE MİRİSETİNİN KEMOTERAPİ DUYARLILIĞINA ETKİSİ” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Dr. Öğr. Ü. Özlem CESUR GÜNAY .....  
Tez Danışmanı, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 28.12.2022

<u>Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)</u>	<u>İmzası</u>
Başkan : Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ (KBÜ)	.....
Üye : Dr. Öğr. Ü. Özlem CESUR GÜNAY (KBÜ)	.....
Üye : Dr. Öğr. Ü. Zülfinaz Betül ÇELİK (SAMÜ)	.....

KBÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Doç. Dr. Müslüm Kuzu .....  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

*“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”*

Hediye TEKELİOĞLU

## **ÖZET**

**Yüksek Lisans Tezi**

### **MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE MİRİSETİNİN KEMOTERAPİ DUYARLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ**

**Hediye TEKELİOĞLU**

**Karabük Üniversitesi**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı**

**Dr. Öğr. Ü. Özlem CESUR GÜNAY**

**Aralık 2022, 82 Sayfa**

Bu çalışmada meme kanseri hücrelerinde mirisetinin kemoterapi duyarlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu araştırma yapılırken mirisetinin, doxorubisinin ve kombine uygulamalarının değişen dozlarda MCF-7 hücrelerine uygulanıp doza ve zamana bağımlı olarak hücre canlılığının tespiti ve hücrelerin %50'sinin yaşadığı dozu bulmak için XTT hücre proliferasyon testi kullanılmıştır. Gen düzeyinde ekspresyon değerlendirmesi yapabilmek amacı ile kontrol ve doz gruplarında RNA izolasyonu TrizolReagent ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazıyla gerçekleştirilmiştir. İzole edilen total RNA'lardan RT-PCR öncesi cDNA sentezi AppliedBiosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit ile 96 well plakalar kullanılarak StepOne Plus Real-Time PCR cihazıyla gerçekleştirilmiştir. MCF-7 hücre hattında kontrole göre BAX, BCL-2, MDR-1 ve STAT3 genlerinin mRNA düzeyindeki ekspresyon değişimleri Real-Time

PCR ile araştırılmıştır. PT-PCR yöntemi kullanılarak tespiti sağlanan mRNA ekspresyon değişimi sonucu elde edilen veriler  $\Delta\Delta\text{CT}$  metodu ile analiz edilmiştir.

Yaptığımız çalışma sonucunda mirisetinin ve doxorubisinin MCF-7 hücrelerinde artan doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Kombine uygulamalarda mirisetin ile doxorubisinin sinerjistik etki göstermediği tespit edilmiştir. Doxorubisinin kendi başına daha etkili olduğu belirlenmiştir. RT-PCR kapsamında STAT3, MDR-1, BAX ve BCL-2 genlerinin mRNA ekspresyon değişimleri araştırılmıştır. Doxorubisinin ve mirisetinin IC50 değeri ve kombine gruplarındaki gen ekspresyon değişimleri kontrol grubuna göre karşılaştırılmıştır. Özellikle STAT3 geni başta olmak üzere bazı gen ifadelerinde anlamlı değişimler tespit edilmiştir.

**Anahtar Sözcükler :** Kanser, Meme kanseri, Mirisetin, Kemoterapi, MCF-7, Doxorubisin, IC50

**Bilim Kodu** : 1090

## **ABSTRACT**

### **Master Thesis**

## **EFFECT OF MYRICETIN ON CHEMOTHERAPY SENSITIVITY IN BREAST CANCER CELLS**

**Hediye TEKELİOĞLU**

**Karabük University**

**Institute of Graduate Programs**

**Department of Medical Biochemistry**

**Thesis Advisor**

**Dr. Asst. Prof. Özlem CESUR GÜNAY**

**December 2022, 82 Pages**

In this study, the effects of myricetin on chemotherapy sensitivity in breast cancer cells were investigated. During this research, myricetin, doxorubicin and their combined applications were applied to MCF-7 cells in varying doses, and cell proliferation test with XTT was used to determine the cell viability in a time and dose dependent manner and to find the dose at which 50% of the cells lived. In order to evaluate the expression at the gene level, RNA isolation was performed with Trizol Reagent in the control and dose groups. The concentration and purity of the isolated RNA were determined by Nanodrop. cDNA synthesis from isolated total RNAs before RT-PCR was performed with Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit and StepOne Plus Real-Time PCR device using 96 well plates. Expression of BAX, BCL-2, MDR-1 and STAT3 genes at the mRNA level in MCF-7 cell line compared to control were investigated by Real-Time PCR. Data was analysed according to the  $\Delta\Delta CT$  method.

As a result of our study, it was determined that myricetin and doxorubicin decreased cell proliferation in MCF-7 cells depending on the increasing dose. It was determined that myricetin and doxorubicin did not show a synergistic effect in combined applications. It was determined that doxorubicin was more effective on its own. Within the scope of RT-PCR, mRNA expression changes of STAT3, MDR-1, BAX and BCL-2 genes were investigated. The IC50 value of doxorubicin and myricetin and the gene expression changes in the combined groups were compared with the control group. Significant changes were detected in some gene expressions, especially the STAT3 gene.

**Key Word** : Cancer, Breast Cancer, Myricetin, Chemotherapy, MCF-7, Doxorubisin, IC50

**Science Code** : 1090



## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında ve yürütülmesinde ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bilgilendirme ve yönlendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Dr. Öğr. Ü. Özlem CESUR GÜNAY'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca deneylerin gerçekleştirilmesinde ve verilerin analizinde yardımlarını esirgemeyen, tecrübelerinden faydalandığım sayın Dr. Öğr. Ü. Mücahit SEÇME'ye teşekkürlerimi sunarım.

Özellikle eşim Ali Can TEKELİOĞLU başta olmak üzere anneme ve babama bugüne kadar yanımda olup sevgi, destek ve ilgilerini benden esirgemedikleri ve beni sabırla destekledikleri için hepsine canı gönülden teşekkür ederim.

Tez çalışmama vermiş oldukları destekten dolayı Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinatörlüğü (KBÜBAP)'ne teşekkür ederim. Proje Numarası: KBÜBAP-21-YL-037

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ ONAY SAYFASI .....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiv
BÖLÜM 1 .....	1
GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
BÖLÜM 2 .....	3
KANSER.....	3
2.1. KANSER OLUŞUMUNDA ETKİLİ FAKTÖRLER .....	7
2.2. MEME KANSERİ.....	8
2.2.1. Meme Kanseri Tanı Yöntemleri .....	10
2.2.2. Meme Kanserinde Tarama Yöntemleri .....	11
2.2.3. Meme Kanseri Epidemiyolojisi .....	12
2.2.4. Meme Kanseri Etiyolojisi ve Patogenezi.....	14
2.2.5. Meme Kanseri ile İlişkili Genler .....	15
2.2.5.1. <i>BRCA-1 ve BRCA-2 Genleri</i> .....	15
2.2.5.2. <i>HER2 Geni</i> .....	16
2.2.5.3. <i>TP53 (p53) Geni</i> .....	17
2.2.5.4. <i>ER Genleri</i> .....	17
2.2.5.5. <i>PR Geni</i> .....	18
2.2.5.6. <i>MDR-1 Geni</i> .....	19
2.2.5.7. <i>BCL-2 Geni</i> .....	20

2.2.5.8. <i>BAX Geni</i> .....	22
2.2.5.9. <i>STAT-3 Transkripsiyon Faktörü</i> .....	24
2.2.6. Meme Kanseri Hücre Hatları .....	26
2.3. MEME KANSERİNDE TEDAVİ YÖNTEMLERİ .....	28
2.3.1. Lokal Tedavi .....	29
2.3.1.1. Cerrahi Tedavi .....	29
2.3.1.2. Radyoterapi .....	30
2.3.2. Sistemik Tedavi .....	30
2.3.2.1. Kemoterapi .....	30
2.3.2.2. Hormonal Tedavi .....	33
2.3.2.3. Hedefe Yönelik Tedavi .....	33
2.4. MEME KANSERİNDE BESLENMENİN ETKİSİ .....	34
2.4.1. Flavonoidler .....	35
2.4.1.1. Flavonoidlerin Biyoyararlanımı .....	35
2.4.1.2. Flavonoidlerin Kansere Karşı Etkileri .....	36
2.4.1.3. Flavonoidlerin Oksidatif Strese Etkisi .....	37
2.4.1.4. Flavonoidlerin Apoptoza Etkisi .....	38
2.4.1.5. Flavonoidlerin Sınıflandırılması .....	39
2.5. MİRİSETİN .....	42
2.5.1. Mirisetinin Meme Kanserine Karşı Etkisi .....	43
2.5.2. Mirisetinin Apoptoza Etkisi .....	44
2.5.3. Mirisetinin Kemoterapiye Etkisi .....	46
<b>BÖLÜM 3</b> .....	<b>48</b>
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>48</b>
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ .....	48
3.2. XTT TESTİ .....	48
3.2. RNA İZOLASYONU .....	50
3.3. cDNA SENTEZİ .....	51
3.4. RT-PCR TESTİ .....	52
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ .....	53
<b>BÖLÜM 4</b> .....	<b>55</b>

DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	55
KAYNAKLAR .....	68
ÖZGEÇMİŞ .....	82

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Normal ve kanserli hücreler arasındaki farklılıkların karşılaştırılması.....	4
Şekil 2.2. Metastaz oluşumu ve basamakları .....	5
Şekil 2.3. Kanser belirteçleri.....	6
Şekil 2.4. Meme kanserinin metastaz kademelerini gösteren şema.....	10
Şekil 2.5. Meme kanserinin biyolojisi .....	27
Şekil 2.6. Flavonoidlerin hücre içi ve dışı apoptoz yollarındaki etkisi.....	39
Şekil 2.7. Flavonoidlerin temel yapısı.....	40
Şekil 2.8. Flavonoidlerin temel iskelet yapıları ve sınıfları .....	41
Şekil 2.9. Flavonoidlerin sınıfları, alt sınıfları ve doğal kaynakları.....	42
Şekil 2.10. Doz miktarına bağlı olarak mirisetinin JAR hücrelerindeki hücre canlılığı üzerine etkisi.....	45
Şekil 2.11. Doz miktarına bağlı olarak mirisetinin JAR hücrelerindeki hücre canlılığı üzerine etkisi.....	46
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan MCF-7 hücrelerinin 48 saat sonraki ışık mikroskop görüntüsü (4x) .....	56
Şekil 4.2. Mirisetinin MCF-7 hücrelerindeki 24 ve 48 saat sonundaki hücre canlılığı üzerine olan etkisi.....	56
Şekil 4.3. Doxorubisinin MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi .....	57
Şekil 4.4. MCF-7 hücrelerinde doxorubisin ve mirisetinin 24 saat ve 48 saatteki IC50 değerlerinin tespit edilmesi.....	58
Şekil 4.5. Kombine uygulamaların MCF-7 hücrelerindeki hücre canlılığı üzerine etkisi .....	59
Şekil 4.6. MCF-7 hücrelerinin kontrol 48. saat 4x mikroskop görüntüleri.....	60
Şekil 4.7. Çalışmada belirli gen ifadelerinin tespiti için kullanılan primerlere ait erime eğrisi analizleri .....	62

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 2.1. Kansere neden olan iç ve dış faktörler .....	8
Çizelge 2.2. Amerikan Kanser Birliği tarafından önerilen meme kanseri tarama yöntemleri ve uygulama sıklıkları .....	12
Çizelge 2.3. Meme karsinomunun hücre hatları ve alt tiplerine göre moleküler sınıflandırılması .....	28
Çizelge 2.4. Diyetle genel olarak bulunan flavonoidler.....	41
Çizelge 3.1. cDNA sentez karşıması .....	52
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan genlere ait forward ve reverse sekans bilgileri .	53
Çizelge 4.1. Doxorubisin IC50, Mirisetin IC50 ve kombine grubun gen ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması.....	61

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABC	: ATP Bağlayıcı Kaset
ABCB1	: ATP Bağlayıcı Kaset Proteini 1
ADH	: Atipik Duktal Hiperplazi
AIF	: Apoptoz Uyarıcı Faktör
AKT/PKB	: AKT/Protein Kinaz B
ATM	: Ataksi Telenjiektazi Mutasyon
ATP	: Adenozin Trifosfat
ATR	: Ataksi Telenjiektazi Ve Rad3 İlişkili Protein Kinaz
BAD	: BCL-2 ilişkili Hücre Ölümü Uyarıcı Proteini
BAK	: BCL-2 Antagonisti Proteini
BAX	: BCL-2 İlişkili X Proteini
BC	: Breast Cancer (Meme Kanseri)
BCL-2	: B Hücreli CLL/ Lenfoma 2
BCL-XL	: B Hücreli Lenfoma Ekstra Büyük Proteini
BID	: BH3 İnteracting Domain Death Agonist
BOH	: Bulaşıcı Olmayan Hastalıklar
DCIS	: Duktal Karsinoma <i>In Situ</i>
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNA-PK	: DNA Bağımlı Protein Kinaz
DOX	: Doxorubisin
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	: Östrojen Reseptörü
FDA	: Food and Drug Administration (Amerika Gıda ve İlaç Dairesi)
HepG2	: İnsan Karaciğer Karsinoma Hücre Hattı-2
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
IBC	: İnvazif Meme Kanseri

IARC	: The International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı)
IFN	: İnterferon
İDK	: İnvaziv Duktal Karsinom
İLK	: İnvazin Lobuler Karsinom
JAK	: Janus Kinaz
JNK	: c-Jun NH2 ucu Protein Kinaz
JNK1/2	: c-Jun N Terminal Kinaz ½
KKMM	: Kendi Kendine Meme Muayenesi
LFS	: Li-Fraumeni Sendromu
MCF-7	: İnsan Meme Adenokarsinoma Hücre Hattı-7
MDR-1	: Çoklu İlaç Direnci Geni 1
MOM	: Mitokondri Dış Zarı
MOMP	: Mitokondri Dış Zar Geçirgenliği
mRNA	: Haberci Ribonükleik Asit
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2, 5-difenil tetrazolyum bromür)
OMM	: Outer Mitochondrial Membrane (Dış Mitokondri Zarı)
P-gp	: P-glikoproteini
PKA	: Protein Kinaz A
PKC	: Protein Kinaz C
PR	: Progesteron Reseptörü
RNA	: Ribonükleik Asit
STAT3	: Sinyal Dönüştürücü Ve Transkripsiyon Aktivatörü 3
TAM	: Tümör ile İlişkili Makrofaj
TDLU	: Terminal Duktal Lobüler Ünitesi
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TP53	: Tümör Proteini 53
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)



## BÖLÜM 1

### GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser genetik ve çevresel faktörlerin etkisinde kalan hücrelerin kontrolsüz bir biçimde bölünmesi ve çoğalmasıyla ortaya çıkan kompleks bir hastalıktır. Hücrelerin bölünmesi ve çoğalması genlerin kontrolü altında olmasına rağmen kanser temel olarak genlerde oluşan ve düzeltilemeyen hasarlarla başlar [1]. DNA dizilimi sırasında metabolizmayı ve hücre çoğalmasını kontrol eden yollarda meydana gelen mutasyonlar metabolik ve anabolik anormalliklere neden olur [2].

Kalıtımsal ve çevresel birçok etken kanserin nedeni olabilir. Normalde gen ekspresyonu sırasında meydana gelen kalıtımsal bir hata sigara, alkol, radyasyon, ultraviyole ışınlar gibi çevresel faktörlerin etkisiyle bireylerin kansere yatkınlığını artırabilir [3-4]. Uluslararası kanser araştırma ajansının (IARC) 2018 verilerine göre küresel kanser yükü 18,1 milyon yeni hasta ve 9,6 milyon kanserden ölümün olduğu açıklanmıştır. Dünya genelinde her 5 erkekten biri ve her 6 kadından birinin yaşamlarının bir döneminde kansere yakalandıkları ve 8 erkekten birinin ve 11 kadından birinin kanserden kaynaklı öldüğü tespit edilmiştir. Dünya çapında 5 yıllık yaygınlık olarak adlandırılan kanser teşhisi konulduktan sonra 5 yıl içinde hayatta kalan insan sayısının 43,8 milyon olduğu tahmin edilmektedir [5].

Kanser insidansı ve ölüm oranı dünyada hızla artmaktadır [6]. Bulaşıcı olmayan hastalıklar (BOH) artık küresel ölümlerin çoğundan sorumludur. Kanser 21. yüzyılda dünyadaki her ülkede ölümlerin önde gelen nedeni ve artan yaşam süresinin önündeki en önemli engel olarak karşımıza çıkacağı tahmin edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2015 yılında yapmış olduğu tahminlere göre 172 ülkeden 91'inde kadın ve erkeklerde 70 yaşından önce birinci veya ikinci ölüm nedeni kanserdir [7-8]. Tüm dünyada artan nüfus oranı ve yaşam süresinin uzaması yanı sıra kötüye giden yaşam tarzı sebebiyle hastalıklar içerisinde kanser yükü her geçen gün

artmaktadır. Gelişmiş ya da gelişmemiş ülkelerde 60 yaşından sonra kansere yakalanma oranları göz önüne alındığında dünya nüfusunun %49,5'ini oluşturan kadınlar için bu oran oldukça fazladır [9].

Kemoterapi, kanser hücrelerini öldürmek için kimyasal maddeler verilerek yapılan ve aynı zamanda malign tümörlerin tedavisinde kullanılan çok etkili olan bir yöntemdir. Kemoterapi tedavisinde bir ilaç veya birkaç ilaç birlikte kullanılabilir. Kemoterapinin genel amacı, hastalığın belirtilerini azaltmaktan iyileştirmeye doğru yönelmiştir. Hastalığın lokalize olduğu durumlarda cerrahi tedavi ve radyoterapi tedavisi uygulanırken, kemoterapi tedavisinin ön plana çıkmasındaki en önemli etken metastaz durumlarında da uygulanabilir olmasıdır [10].

Kanser önleme üzerine yapılan araştırmalarda beslenme ile ilgili stratejilere yön vermek amacıyla birçok besin karbonhidratlar, yağ asitleri, vitamin ve mineraller, karotenoidler, fitööstrojenler gibi besin içerikleri açısından ele alınmaktadır. Meme kanseri etiyojisinde bazı spesifik besinlerin antioksidan içeriklerinin, kanser epigenetiği üzerine etkisi, DNA onarımı, inflamasyon, genin düzenlenmesi ile ilgili ekspresyon, büyüme faktörlerinin uyarılması gibi biyolojik süreçlere olan etkileri epidemiyolojik çalışmalarda ele alınmaktadır. Flavonoller arasında mirisetinin kansere karşı etkisi birkaç yıldır araştırma konusu olmuştur ve tümör baskılayıcı olarak yararlı özellikleri hemen hemen ortaya çıkmıştır. Mirisetin ayrıca farklı meme kanseri hücre dizilerinde kemoterapötik molekül olarak test edilmiştir. Üçlü negatif meme kanseri (TNBC), toplam meme kanseri vakalarının %15'ini temsil eder. İnsan TNBC hücre hattı, MDA-MB-231'de, mirisetinin, apoptozu indüklenmesiyle hücre büyümesini azalttığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, meme kanseri hücrelerinde mirisetinin kemoterapi duyarlılığı üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma, literatür taraması ve deneysel çalışmalar yapılarak hazırlanmıştır. Deneysel çalışmalarımız sonucunda elde edilen bulgular daha önce hazırlanmış olan çalışmalardaki bulgularla neden-sonuç ilişkisi içerisinde karşılaştırılmıştır. Son olarak ise deneysel çalışmalarımız sonucu elde edilen bulgular çalışmanın sonucuna uygun bir şekilde değerlendirilerek yorumlanmış ve sona erdirilmiştir.

## BÖLÜM 2

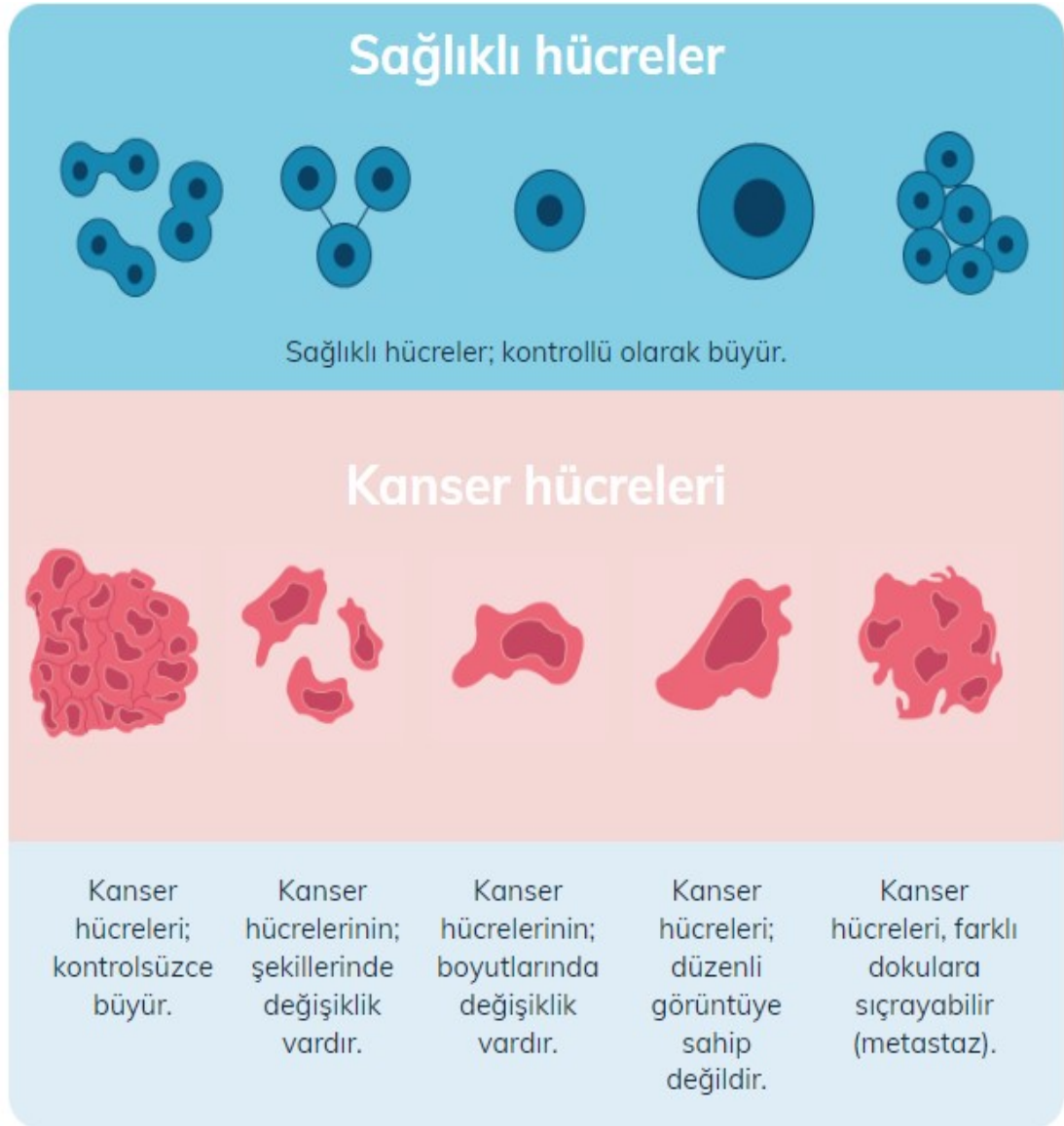
### KANSER

Kanserin tanımı, M.Ö. 460-377 yıllarında ilk önce Hipokrat tarafından organizma içinde şifası bulunamayan yeni oluşumları belirtmek için kullanılmıştır. Hipokrat, dokularda gelişen, sağlıklı hücrelere göre farklı özellikleri olan, normal hücrelerle karşılaştırıldığında daha yavaş gelişen ve al renkli şişliklere “Carcinos” veya “Carcinoma” adını vermiştir. M.S. 2. yüzyılda Galen ise, normal dokuya göre farklı yapısal özellik gösteren oluşumları yengece benzettiği için “kanser” diye adlandırmıştır. Tarsuslu Osman Hayri Efendi Türk tıp tarihinde kanser tanımını “Kenz üssihhat ül-ebdaniye” adlı kitabında yapmıştır. Ağrılı seyreden ve damarlı küçük yumru büyüklüğünde oluşumları anlatmak için “seratan” ifadesini kullanmıştır [11].

Kanser, DNA hasarına maruz kalan hücrelerin anormal bir şekilde kontrolsüz çoğalması olarak tanımlanmaktadır. Kanser ve tümör kelimeleri birbirlerinin yerine kullanılsa da aslında aynı yapısal bozukluğu bildiren kelimeler değildir. İyi huylu veya kötü huylu olarak ikiye ayrılan tümöre kıyasla kanser kötü huylu olduğu kesin bilinen tümördür [12].

Modern zaman hastalıklarının arasında yer alan kanser yirmi birinci yüzyıldan itibaren ciddi sağlık sorunlarından biri olarak görülmeye başlanmıştır. Kanser, yirminci yüzyıldan itibaren modern zamanın hastalığı olarak nitelendirilse bile kanserin canlı yaşamı ile birlikte var olduğunu gösteren kanıtlarda mevcuttur [13]. Kanser bütün dünyada giderek artan önemli bir sorun haline gelmekle birlikte yaklaşık olarak her yıl 6 milyondan fazla insan bu hastalığa yakalanmaktadır [14]. Kanser gelişimine sebep olan etkenler, radyasyon, ağır metaller, güneşten gelen zararlı ultraviyole ışınları ve sigarada bulunan kimyasal ve karsinogenik ajanlar olarak sıralanabilir. Bunlara ek olarak, antioksidan açısından zengin içerikli

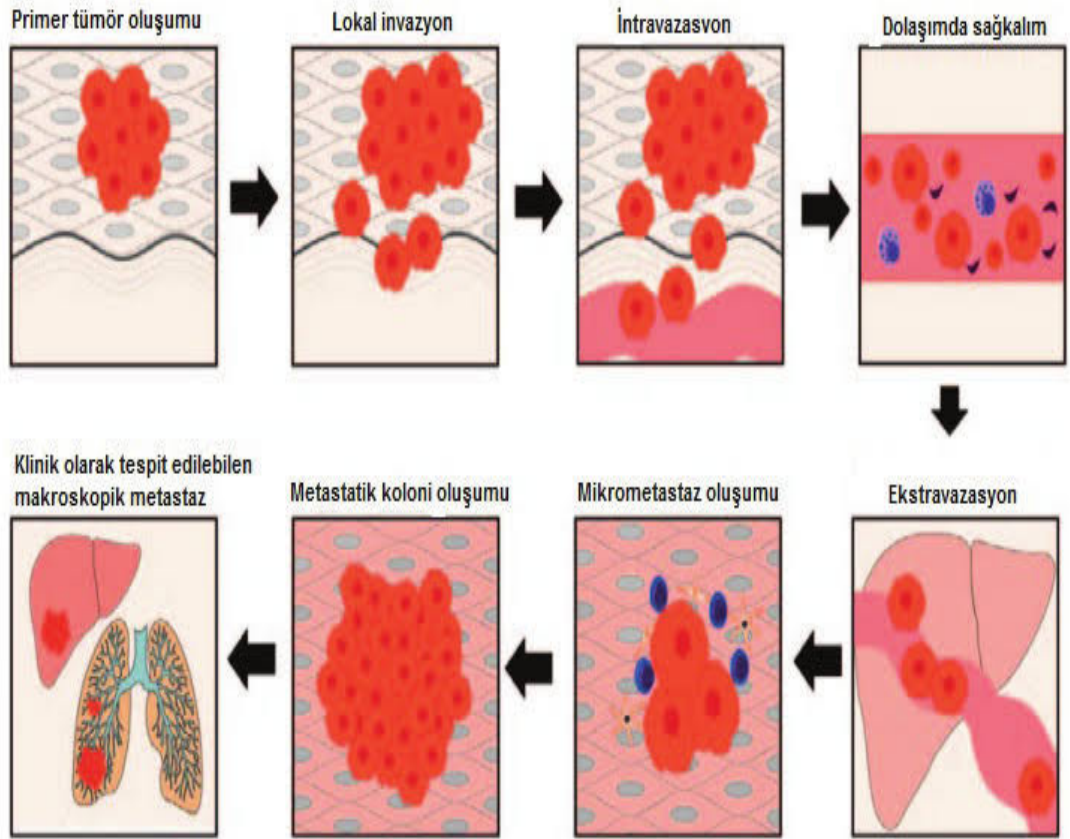
besinlerin yeteri kadar tüketilmemesiyle birlikte bağımsızlık sistemi mekanizmaları zayıflar, hücre hasarı meydana gelir ve kanser gelişimi söz konusu olur. Kanser, dünyada ve ülkemizde %22'lik görülme oranıyla kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedenidir. Ölüm oranlarının yüksek olmasından dolayı bu konu ön plana çıkmış olup erken tanı ve tedavi ile kanserli hastaların yaşam kalitelerinin artırılması ve yaşam sürelerinde uzama sağlanabilmiştir. Şekil 2.1'de sağlıklı hücre ile kanserli hücrelerin büyümeleri arasındaki fark gösterilmiştir [15].



Şekil 2.1. Normal ve kanserli hücreler arasındaki farklılıkların karşılaştırılması

Kanser, hücrelerin normal sınırları dışında büyümesi kontrolsüz büyüyen hücrelerin sağlıklı hücre ve diğer organlara da yayılması kanserin en belirleyici özelliğidir. Bu

şekilde hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi, diğer hücelere ve organlara yayılması metastaz olarak adlandırılmaktadır. Kanser hücreleri, birçok sebeple değişim geçirmiş, kontrolsüz çoğalma ve hücre proliferasyonu özelliğine sahip olan ve aynı zamanda vücudun çeşitli bölgelerine yayılma özelliği gösteren hücrelerdir [16]. Kontrolsüz olarak proliferasyona uğrayan kanser hücreleri, buldukları bölgede bir kitle oluşturduktan sonra bölgenin dışına yayılma eğiliminde değil ise farklı bölgelere invaze olmayan kanserlere benign tümör, ancak bulunduğu bölgeden farklı bölgelere yayılma eğiliminde ise bu tür kanserlere malign tümör denilmektedir. Malign tümörler, kan, lenf veya vücut boşluklarını kullanarak primer lokalizasyonlarının dışına çıkarlar farklı bölgelere metastaz yapıp o bölgelerde de gelişmeye devam ederek ölümcül bir hale gelirler [17]. Şekil 2.2’de metastaz oluşumu ve basamakları gösterilmiştir [18].

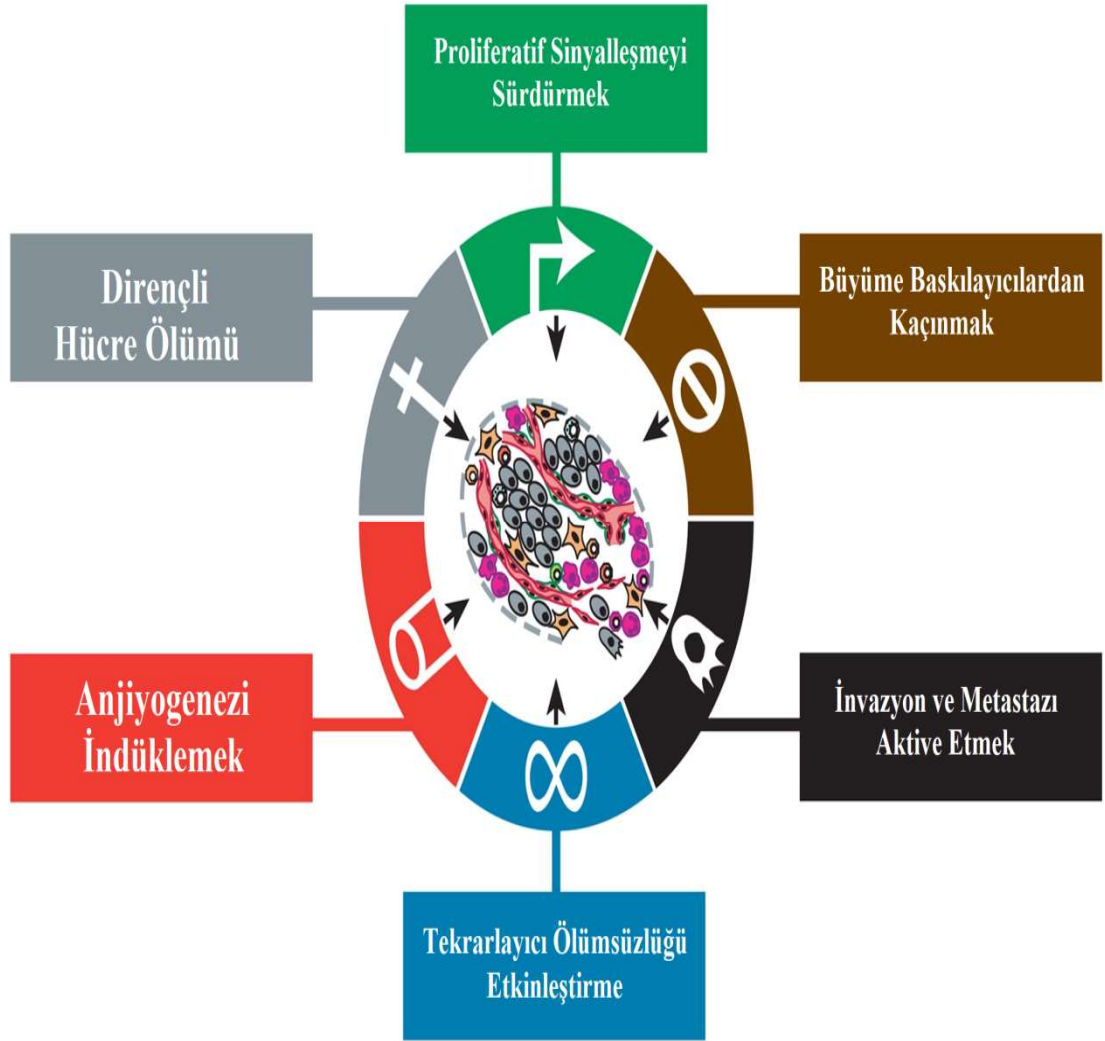


Şekil 2.2. Metastaz oluşumu ve basamakları

Kan, lenf ya da vücut boşluklarını aracılığıyla metastaz yapan, başka organlara sıçrayan kanser hücreleri, birbirine yapışmaz, apoptoza uğramazlar ve diğer

hücrelerden gelen sinyallere asla yanıt vermezler. Metastaz, kanser nedeniyle gerçekleşen ölümlerin önemli bir nedenidir[19].

Kanser oluşumunun meydana geldiği hücrelerin özelliğine göre dört başlıkta incelenmektedir. İlk olarak karsinoma epitel hücrelerden kaynaklanır. İkinci olarak sarkoma bağ doku ve hücrelerinden kaynaklanır. Üçüncü olarak lösemi hematopoietik hücrelerden kaynaklanır ve son olarak lenfoma ise hematopoietik hücrelerden kaynaklanır ve lenf damarlarında tutulma gösterir. Kanser gelişimi gösteren bir dokunun oluşumunu ve metastaz gelişimini kademeli olarak gösteren altı adet belirteç olduğu belirtilmiştir. Şekil 2.3’de kanser belirteçleri gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Kanser belirteçleri

- **Büyüme ve sinyal otonomisi:** Büyüme faktör yolağında meydana gelen mutasyonlar ve kontrolsüz büyümeye sebebiyle kanserli hücreler büyüme faktör sinyalinden bağımsız bölünmektedirler.
- **Büyüme inhibitör sinyallerinden kaçınma:** Mutasyona uğradıkları için kanser hücreleri inhibitör sinyallerine yanıt vermez.
- **Büyüme ve sinyal otonomisi:** Kanserli hücrelerde telomerazın uzunluğu korunduğundan sınırsız replikasyon yeteneği gelişmektedir.
- **Apoptotik hücre ölümlerinden kaçınma:** Apoptotik sinyallere yanıt kanserli hücrelerde gerçekleşmemektedir.
- **Anjiyogenez (Yeni kan damarlarının oluşumu):** Tümörün yaşaması ve büyümesi için yeni kan damarlarının oluşması gerekli olduğundan kanser hücreleri anjiyogenezi uyarmaktadır.
- **İnvazyon ve metastaz:** Kanser hücreleri, sağlıklı hücrelerin aksine vücudun diğer bölgelerine yayılma eğiliminde olduğundan, kanserden kaynaklı ölümlerin en önemli nedenidir [20].

## 2.1. KANSER OLUŞUMUNDA ETKİLİ FAKTÖRLER

Kanseri önlemenin öncelikli yolu kansere neden olan etmenleri belirlemektir. Uluslar arası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) ve çeşitli ulusal sağlık kuruluşlarında kanserojen tespit programları kanserojenlere maruziyeti engellemek için mücadele etmeye yönelik kamu ve özel kişi ve kurumların çabalarına bilimsel bir temel sağlar [21].

Kanser oluşumu son derece karmaşık bir olaydır. Kansere neden olan iç ve dış faktörler, kanserde risk faktörleri olarak adlandırılmaktadır. Kanserin çeşidine göre risk faktörleri farklılık gösterdiği gibi kanserin risk dereceleri de farklılık

göstermektedir. Çizelge 2.1’de de gösterildiği gibi kansere neden olabileceği belirlenen pek çok iç ve dış etken vardır [22].

Çizelge 2.1. Kansere neden olan iç ve dış faktörler

➤ İç Faktörler	➤ Dış Faktörler
<ul style="list-style-type: none"><li>• Yaş</li><li>• Cinsiyet</li><li>• Kalıtım</li><li>• Irk</li><li>• Hormonal Sistem</li><li>• Bağışıklık</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Coğrafi Faktörler</li><li>• Yetersiz ve Dengesiz Beslenme</li><li>• Toplumsal Faktörler</li><li>• Biyolojik (Virüs ve Parazitler)</li><li>• Radyoaktivite</li><li>• Kimyasal Karsinojenler</li></ul>

## 2.2. MEME KANSERİ

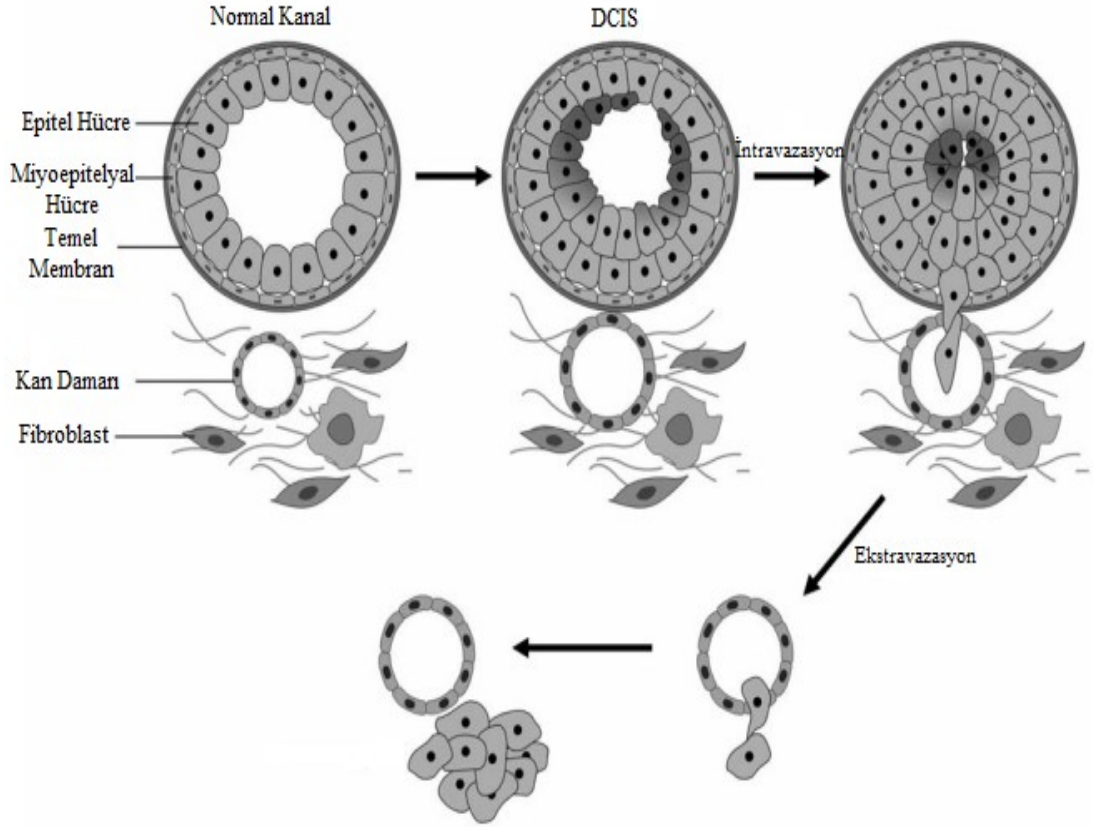
Memedeki süt kanallarını oluşturan hücrelerin ya da süt bezi hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucu oluşan kanser türü, meme kanseri olarak tanımlanmaktadır. Meme kanseri patolojisi, hastalığın seyri hakkında bilgi verdiği gibi tedavi yöntemini belirlemede de çok önemli bir faktördür. Meme kanserinin yaklaşık %80’ini invaziv duktal karsinom (İDK) ve %14’ünü ise invaziv lobuler karsinom (İLK) oluşturmaktadır. Çok sık rastlanmayan ve prognozu daha iyi olan musinöz, meduller ve tubuler kanser gibi nadir rastlanan tümör çeşitleri de bulunmaktadır. Meme tarama ve tanı yöntemlerinin geliştirilmesiyle invaziv olmayan (*in-situ*) kanser tiplerinde artış olduğu tespit edilmiştir [23].

- **Lobuler karsinoma *in situ* (LCIS):** Kontrolsüz çoğalan hücrelerin süt bezlerinin dışına metastaz yapmayan kısmı lobuler karsinoma *in situ* olarak adlandırılmaktadır. Mikroskop altında incelenebilen bir lezyon olduğu için el ile muayene yöntemiyle anlaşılması mümkün değildir ve tümör oluşturmamaktadır. Bu nedenle insidansı tam olarak tespit edilememektedir.



- **Duktal karsinoma *in situ* (DCIS):** Kontrolsüz çoğalan hücrelerin süt kanallarının dışına metastaz yapmayan kısmı duktal karsinoma *in situ* olarak adlandırılmaktadır. Farklı türlerden oluşan lezyon grubunu oluşturmaktadır. Duktal karsinoma *in situ* ile lobuler karsinoma *in situ*'nun ortak özelliği malign karakterdeki hücrelerde membranla çevrili boşluklar içinde gerçekleşen sınırlı proliferasyondur.
- **İnvaziv duktal karsinom (İDK):** Kontrolsüz çoğalan hücrelerin süt kanallarının dışına metastaz yaparak bölünmesi sonucu oluşan kanser türü invaziv duktal karsinoma olarak adlandırılmaktadır. Meme kanseri türleri arasında görülme sıklığı en çok olan fakat invaziv karsinomların herhangi bir tipine uymayan malign tümördür. İnvaziv duktal karsinomda nekroza çok fazla rastlanılmamaktadır. Genel olarak bu tür vakaların yaklaşık olarak %60'ında kalsifikasyona rastlanmaktadır.
- **Medullar karsinoma:** Meme kanseri türlerinden biri olan medullar karsinoma meme kanserlerinin %5-7'sini oluşturmaktadır. Medullar karsinomada makroskopik (biyopsi) inceleme yapılmaktadır. Genel olarak metastaz durumu sınırları belli olan, yumuşak kıvama sahip, homojen bir kesit yüzeyi olan ve grimsi renkte tümörlerdir. Bu tip kanserde sık sık kanamalara rastlanmaktadır ve nekroz görülmektedir. Klasik medullar karsinomalarda tümörün boyutu büyük olmasına rağmen prognoz genel olarak daha iyidir [24].

Meme kanserleri içerisinde en yaygın olarak görülen kanser tipi duktal kanserdir. Genel olarak duktal kanser meme kanserlerinin %75'ini oluşturur. Duktal kanser metastaz yaparak meme dokusu haricinde öncelikle koltuk altında bulunan lenf bezlerinde tutulum göstermektedir. Şekil 2.4'de meme kanserinin metastaz kademeleri gösterilmiştir [25].



Şekil 2.4. Meme kanserinin metastaz kademelerini gösteren şema

### 2.2.1. Meme Kanseri Tanı Yöntemleri

Meme kanserinde anamnez, fiziki muayene, inspeksiyon, palpasyon, mamografi ve biyopsi gibi yöntemlerle tanı konulabilmektedir.

- **Anamnez:** Hastanın yaşı, aile öyküsü, menstürasyon öyküsü, doğum yaşı, meme ile ilgili geçirdiği hastalıklar, menopoz yaşı gibi birçok faktör göz önünde bulundurularak hastalık öyküsü genel hatlarıyla belirlenmelidir.
- **Fiziki Muayene:** Elle muayene yapılarak meme dokusundaki değişikliklerin gözlemlenmesi sonucu lezyon ve kitlelerin tespit edilmesini sağlamaktadır.
- **İnspeksiyon:** Memelerin görünümüne, büyüklüğüne, simetrisine, deride renk değişikliğine ve meme başlarına bakılır.

- **Palpasyon:** Hastanın meme dokusundaki farklılıkların varsa kitlenin tespit edilmesi için yatar pozisyonda yapılan elle muayene yöntemidir. Memede dolgunluk, yoğunluk veya nodül olan bölge diğer tarafla kıyaslanır.
- **Mamografi:** Meme kanserinin tanısında kullanılan en önemli yöntem olan mamografi memenin röntgenini çekerek gerçekleştirilir.
- **Sitoloji:** Meme ucundan gelen akıntının mikroskopik olarak incelenmesidir.
- **Ultrasonografi:** Yüksek ses dalgaları kullanılarak meme dokusunun içerisindeki lezyonların tespit edilmesini sağlayan yöntemdir.
- **Biyopsi:** Memeden alınan küçük bir doku veya meme ucundan gelen sıvının patoloji laboratuvarlarında incelenerek teşhis konulması meme biyopsisi olarak adlandırılmaktadır [26].

Meme kanserinin erken evrelerinde tanı konulması, uygulanacak tedavi yöntemlerinin sayısını, tedavinin başarılı olmasını ve sağkalım oranını önemli derecede arttırmaktadır. Meme kanseri vakalarında ilerlemiş evrelerde tanı konulmasıyla 5 yıllık hayatta kalma olasılığı %10 oranında iken, erken dönemde tanı konulan vakalarda ise bu oran %80'e çıkmaktadır. Meme kanseri için erken tanı yöntemi olarak birbirini tamamlayıcı üç yol vardır. Bu yollar;

- Kendi Kendine Meme Muayenesi – KKMM
- Fiziki Meme Muayenesi
- Mamografi [27].

### 2.2.2. Meme Kanserinde Tarama Yöntemleri

Meme kanserini tespit etmede kullanılan tarama yöntemleri sayesinde hastalığın erken teşhisi ile erken tedavi şansı arttırmakta ve tedavi sonrası yapılan kontrol programları sayesinde diğer kanser türlerine kıyasla meme kanserinden kaynaklı

mortalite ve morbiditenin azalması hedeflenmektedir[28]. Erken evrede teşhis edilen meme kanseri için daha başarılı tedavi yönteminin de belirlenmesi söz konusu olur. Tespit edilen birçok meme kanseri vakasının engellenemez oluşu, meme kanseri kaynaklı ölümlerin önüne geçmesi ve ameliyat sonucu memenin alınması yönteminin azaltılması yönündeki beklentiler, hastalığın erken dönemde teşhisi ile tedavi edilmesine katkıda bulunan tarama yöntemlerinin kullanılması açısından önemli bir strateji haline gelmiştir. Çizelge 2.2’de Amerikan Kanser Birliği’nin önermiş olduğu meme kanseri tarama rehberinde meme kanseri tarama yöntemleri ve uygulama sıklıkları gösterilmiştir [29].

Çizelge 2.2. Amerikan Kanser Birliği’nin önermiş olduğu meme kanseri tarama yöntemleri ve uygulama sıklıkları

Yaş Grubu	Yöntem	Uygulama Sıklığı
20 – 39	KKMM	Ayda 1
	Klinik Muayene	3 Yılda 1
40 – 49	KKMM	Ayda 1
	Klinik Muayene	Yılda 1
	Mamografi	2 Yılda 1
50 +	KKMM	Ayda 1
	Klinik Muayene	Yılda 1
	Mamografi	Yılda 1

### 2.2.3. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri, kadınlarda görülme sıklığı en çok olan kanser türüdür. Kolon kanseri ve akciğer kanseri ile birlikte dünya genelinde en yaygın görülen üç kanserden biridir. 2012 yılında, dünya genelinde yaklaşık 1,7 milyon kişi meme kanseri teşhisi almış ve yaklaşık yarım milyon kişi bu hastalıktan kaynaklı hayatını kaybetmiştir [30]. 2013 yılında dünya çapında yarım milyon insan meme kanserinden ölmüş ve kanserden kaynaklı ölümlerin %15’inin meme kanseri kaynaklı olduğu belirlenmiştir [31]. Amerika Birleşik Devletleri’nin 2019 yılında yapmış olduğu ulusal kanser

istatistik raporuna göre ABD'li kadınlarda yaklaşık 268,600 yeni invazif meme kanseri vakası ve 48,100 erken evreli meme kanseri (DCIS) vakası teşhis edilmiş ve 41,760 kadın bu hastalıktan öleceği belirlenmiştir [32]. Meme kanserinin en çok tespit edildiği yaş aralığı 55-64 yaşdır ve medyan yaş 61 olarak belirlenmiştir. 40 yaşın altında görülme oranı %5'tir ve çoğu malignitede olduğu gibi risk yaş ile birlikte artar [33]. Küresel kanser insidansı da giderek artmaktadır. 1980'de 641,000 olarak belirlenen vaka sayısı yılda %3,1 oranında artarak 2010 yılında 1,6 milyonun üzerinde olduğu belirlenmiş ve 2030 yılına kadar dünya çapında yılda 3,2 milyon meme kanseri vaka sayısının olacağı beklenmektedir [34].

Meme kanserinin görülme sıklığı gelişmiş ülkelerde daha fazla olmasına rağmen erken teşhis ve gelişmiş tedavi imkânları sayesinde ölüm oranları gelişmemiş ülkelere göre daha azdır [35]. Araştırmalar, hastalarda sağ kalımın tümörün özelliklerinden çok tanı süresine ve tedavi olanaklarına erişime bağlı olduğunu göstermektedir. Gelişmiş ülkeler arasında olan Amerika'da meme kanserine bağlı ölümler, daha iyi tedavi ve teşhis olanaklarına erişim nedeniyle azalmıştır [36]. Dünya nüfusunun %60'ının yaşadığı gelişmekte olan Asya ülkelerinde ise meme kanseri insidansı giderek artmaktadır. Meme kanseri vakalarının en yüksek olduğu Asya ülkelerinin başında Çin, Hindistan, Japonya, Endonezya ve Pakistan gelmektedir. Bu ülkeler arasında meme kanseri vaka sayısı ve meme kanserine bağlı ölüm oranları kıyaslandığında gelişmekte olan ülkelere kanser vaka sayısı fazlayken az gelişmiş ülkelere kanserden ölüm oranının fazla olduğu tespit edilmiştir [37].

Türkiye'de 1987-2008 yılları arasında yaklaşık 23,000 meme kanseri kaynaklı ölüm gerçekleşmiştir. Bu yıllar arasında ortalama ölüm oranı 100,000 kadında 9,2'den 14,9'a yükselmiştir [38]. 2007'de 44,253 olan meme kanseri vaka sayısı 2012'de 51,990 olmuştur [39]. Meme kanseri riskinin yaş ile birlikte arttığı göz önüne alınca Türkiye'nin genç demografik yapısı nedeniyle Türk kadınları düşük risk grubunda yer almaktadır. 20'li yaşlarda meme kanserine yakalanma riski %0,05'iken bu oran 60'lı yaşlarda %3,45'e yükselmektedir [40].

#### 2.2.4. Meme Kanseri Etiyolojisi ve Patogenezi

Meme kanseri etiyolojisi ve patojenik özellikleri açısından oldukça heterojendir. Olguların bazılarında prognoz yavaş ilerlerken birçok olguda da prognoz oldukça agresif olabilmektedir [41]. Meme kanserinin en önemli nedeni meme epitel dokusunda malign hücrelerin kontrolsüz büyüüp çoğalmasıdır. Meme kanserinin kesin teşhisi, epitel dokuda meydana gelen doku bozulmasının fiziki muayene ardından laboratuvar testleriyle somutlaşmasıyla olmaktadır [42].

Kontrolsüz hücre çoğalmasıyla tümörler oluşmakta ve tümörlerin sınıflandırılması iyi veya kötü huylu olup olmadıklarına göre belirlenmektedir. İyi huylu tümörler oluştukları dokudan kan veya lenfatik damarlar yoluyla başka bir dokuya metastaz yapmaz. Bunun aksine kötü huylu tümörler kendilerine yakın veya uzak doku ve organlara metastaz yaparlar [43]. Meme kanserinin başlangıcı ve hastalığın ilerlemesi için iki teori ortaya atılmıştır. Bunlardan ilki kanserde kök hücre teorisi ikincisi ise rastlantısal teoridir. İlk olarak kök hücreyi hedef alan teoriye göre tüm tümör alt gruplarının aynı kök hücreden türetildiği varsayılır. Rastlantısal teoriye göre ise her tümör alt grubunun tek bir hücre tipinden (kök hücre, öncül hücre ve farklılaşmış hücre) meydana geldiği varsayılır. Herhangi bir meme hücresinde meydana gelen rastgele mutasyonlar kademeli olarak birikebilir ve biriken mutasyonların düzeyi yeterli hale geldiğinde tümör oluşturabilir. Kök hücre için yapılan tanım, vücutta çok uzun bir süre bölünmeye devam eden, kendini yenileyebilen ve bu sayede farklılaşmış hücreler oluşturabilen hücre şeklindedir. Başka bir ifadeyle kök hücre farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline sahip ve kendisini yenileyebilme gücü olan hücrelerdir. Aldıkları sinyale göre başka hücre tiplerine dönüşebilmektedirler [44]. Kök hücrenin farklı bir hücreye dönüşümü “kök hücre plastisitesi” gelişimsel ve embriyonik kök hücre araştırmalarında iyi bilinen bir olgudur ve hücrelerin farklılaşmış ve farklılaşmamış durumları en iyi embriyodaki epitel hücrelerin farklılaşarak “epitelden mezenkimale geçiş (EMT)” mezenkimal özellik kazanmalarıyla tersine çevrilebilir işleme gösterilmektedir [45]. Meme kanseri genellikle süt kanalı hücrelerinin hiperpoliferasyonu ile başlar. Bozulmaya karşı koyamayan hücreler çeşitli karsinojenlerin de etkisiyle iyi huylu veya metastasik tümörlere dönüşür [46]. Meme kanserinde kök hücrelerin oluşumu

bazal kök hücelere kıyasla lümen epitel kök hücrelerden oluşma olasılığı daha fazladır [47-48].

Kanser kök hücre teorisine göre; kanserlerin, kök hücre özelliklerine sahip bir kötü huylu hücre alt kümesinden geliştiği meme kanseride dahil çeşitli malignitelerin gelişimini hesaba kattığı öne sürülmüştür. Bu kanser kök hücreleri, kendi kendini yenileme, asimetrik hücre bölünmesi, apoptoza direnç, bağımsız büyüme, tümör oluşumu ve metastatik potansiyele sahip olmaları bakımından hem kök hücrelerin hem de kanser hücrelerinin özelliklerine sahiptir [49].

## **2.2.5. Meme Kanseri ile İlişkili Genler**

### **2.2.5.1. BRCA-1 ve BRCA-2 Genleri**

Meme kanseri ile ilişkisi olan genlerin incelenmesi tespit edilen vakalarda kanser oluşumunun kalıtsal olup olmama durumlarının değişmesinden dolayı oldukça zordur. Meme kanserine yatkın olan genlerin tespiti için ailelerde meme kanserinden etkilenmenin nesilsel aktarımı olmalıdır. Nesilsel aktarımın ele alınmaya başlandığı 1994 yılında BRCA-1 geni ardından 1995'te BRCA-2 geninin tespiti ile meme kanseri riskinin altında yatan moleküler genetik ortaya çıkarılmaya başlanmıştır. BRCA-1 ve BRCA-2 tümör baskılayıcı gen türleridir; hücrelerde hasarlı DNA'yı onarmak için gereken özel proteinler üretir. Bu genlerdeki bazı mutasyonlar hasarlı DNA'nın onarımını engeller. BRCA-1 ve BRCA-2 genleri tümör baskılayıcı gen olarak kodlanmışlardır, DNA hasarı söz konusu olduğunda onarım yolunda sinyal iletimi sağlayarak genomik bütünlüğün korunmasını sağlarlar. Buna karşılık, onarılmamış DNA'nın varlığı, kanserin gelişimine katkıda bulunan diğer mutasyonların edinilmesi riskini artırır [50-51]. BRCA-1 ve BRCA-2 genleri, homolog rekombinasyonla tamir edilen çift sarmallı DNA kırıklarının onarımında aktif bir role sahiptir [52]. Bununla birlikte meme kanseri insidansının görüldüğü birçok ailede BRCA-1 ve BRCA-2 genlerinde mutasyon saptanamamıştır ve bu durum daha başka meme kanseri genlerinin olduğunu düşündürmüştür [53]. BRCA-1 ve BRCA-2 genlerinde mutasyona sahip olan kadınlarda aile öyküsüne bakılmaksızın meme kanserine yakalanma riskinin yaklaşık %80 olduğu bildirilmiştir [54-55].

Kadınlarda tek başına BRCA-1 geninde meydana gelen mutasyonlar nedeniyle meme kanserine yakalanma riskinin yaşam boyu %60-70 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte tek başına BRCA-2 geninde meydana gelen mutasyonların ise %40-60 oranında meme kanseri riski ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Nadirden de olsa çok az sayıda bireyde hem BRCA-1 hem de BRCA-2 genlerinde mutasyon olduğu belirlenmiştir [56]. BRCA-1, kromozom stabilitesini ve tümör baskılamasını korumadaki rolüne katkıda bulunan çoklu protein kompleksleri oluşturabilen çoklu onarım proteinleri ve hücre döngüsü düzenleyicileri ile ilişkilidir [57]. BRCA-1, DNA hasar tepkisini kontrol eden merkezi DNA hasarı tepki kinazları ATM (ataksi telenjiyektazi mutasyona uğramış) ve ATR' nin (ataksi telenjiyektazi ve Rad3 ilişkili protein) bir substratıdır. BRCA-2 birincil işlevi DNA'da çift iplik kırıkları olduğunda ve iplik istilasını rekombinaz RAD51'e bağlanma kabiliyetine dayanır. BRCA2, her biri RAD51'i DNA hasarı bölgelerine bağlayabilen ve bunlara katılabilen sekiz BRC tekrarı içerir. BRCA1 ve BRCA2, DNA onarımının kısmen sağlanması, hücre döngüsü kontrol noktasında bulunma, mitotik aşamalar veya hücre bölünmesi adımlarının düzenlenmesiyle genom bütünlüğünün korunmasında rol oynar. Bu nedenle, her iki proteinin de tam işlev kaybı, genomik dengesizlikte olumsuz bir artışa yol açar. BRCA-2 yapısal olarak BRCA-1'den farklı olsa da çeşitli çalışmalar, BRCA1 ve BRCA2 ekspresyonunun, hücre döngüsü ilerlemesi sırasında ve DNA hasarına yanıt olarak birlikte düzenlendiğini göstermektedir [58].

#### **2.2.5.2. HER2 Geni**

Epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR) ailesinin bir üyeside insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)'dir. Bu reseptörler ayrıca meme kanserinde çoğalmayı, göçü ve istilayı yönlendiren HER1, HER2, HER3 ve HER4'ü içerir. HER2 onkogeni, hücre içi tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran glikoprotein reseptörünü kodlamaktadır [59]. Meme kanseri vakalarının çoğunda, HER2 aşırı ekspresyonu nedeniyle oluşur. HER2 aşırı ekspresyonu, HER2'nin diğer EGFR ailesi üyeleri ile homodimerizasyonunu veya heterodimerizasyonunu teşvik eder, bu da hücre proliferasyonu, hücre döngüsü bozulması ve çeşitli hücre sinyal yollarının aktivasyonu ile apoptoz inhibisyonu gibi olayları hızlandırır [60]. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %20'si HER2 pozitifdir [61]. EGFR ailesi üyelerinden



özellikle HER1 ve HER2'nin aşırı ekspresyonu meme kanseri hastalarında hayatta kalma sürelerinin azalması ile ilişkilidir [62].

### **2.2.5.3. TP53 (p53) Geni**

Tümör supresör protein kodlayan p53 geni, meme kanseri de dâhil olmak üzere çoğu insan kanseri türünde en sık mutasyona uğramış gendir [63]. p53 “genomun koruyucusu” olarak bilinen çok önemli bir tümör supresör gendir. DNA hasarı söz konusu olduğunda hasarın olduğu kısımda hasarı onarmak ya da apoptozu başlatmak için p53 geni bir kontrol noktası olarak görev alır. p53 genindeki germ hattı mutasyonları, ailesel bir kanser yatkınlığına neden olur. Mutasyonlu p53 geni taşıyıcılarında kansere yakalanma riski oldukça yüksektir. Hasarlı geni taşıyanlarda genellikle görülen maligniteler yumuşak doku sarkomaları ve kadınlarda meme kanseridir [64]. Erken başlangıçlı meme kanseri, Li-Fraumeni sendromu (LFS) olarak bilinen nadir otozomal dominant kalıtsal malignite örneğidir. Li-Fraumeni sendromu (LFS), p53 transkripsiyon faktörünü kodlayan gen olan p53'teki germ hattı mutasyonlarının neden olduğu nadir bir kanser yatkınlığı durumudur. Meme kanseri, germ hattında p53 mutasyonları olan kadınlar arasında en yaygın tümördür. LFS'li kadınlarda meme kanseri riski, 60 yaşına kadar yaklaşık % 49'dur ve mutasyonlu p53 genine sahip kadınlar 40 yaşından önce önemli risk taşır [65-66].

### **2.2.5.4. ER Genleri**

Östrojen reseptörleri ER- $\alpha$  ve ER- $\beta$ , östrojenlerin hedef dokulardaki etkilerine aracılık eden nükleer reseptör süper ailesinin iki üyesidir. Meme bezinde ER genleri, hormon bağlanmasına yanıt olarak gen ekspresyonunu kontrol ederek hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenler. DNA'ya ya doğrudan östrojen yanıt elemanlarında hedef genlerin transkripsiyonel düzenleyici bölgelerinde ya da DNA'ya bağlı diğer transkripsiyon faktörleri aracılığıyla bağlanırlar [67]. Aktif ER genleri, spesifik DNA dizilerinde transkripsiyon faktörleri olarak işlev gören farklı koreseptör ve koaktivatörleri etkileyerek gen ekspresyonunu kontrol edebilirler. Pek çok kanıt dizisi, östrojen sinyallemesinin bozulması ile kanserin başlaması, ilerlemesi ve tedaviye yanıt vermesi arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir.

Östrojenlerin çeşitli etkileri ve ER- $\alpha$ /ER- $\beta$  varyasyonu ile birlikte meme, endometriyal ve prostat kanserinde östrojen-ER bağlanmasının rekabetçi inhibitörlerinin bu dokulardaki oranları, ER alt tiplerinin kanser biyolojisi ve tedavisinde farklı işlevlere sahip olduğunu göstermektedir [68].

Östrojenler, normal meme bezindeki büyüme ve farklılaşmanın önemli düzenleyicileridir ve aynı zamanda meme karsinomunun gelişimi ve ilerlemesinde de önemlidir. Teşhis anında tüm meme kanserlerinin yaklaşık üçte ikisi ER+ olduğundan, reseptörün ekspresyonunun meme kanseri biyolojisi ve tedavisi için önemli etkileri vardır [69].

#### **2.2.5.5. PR Geni**

PR (progesteron reseptör), nükleer hormon reseptör ailesinin liganda bağımlı transkripsiyon faktörlerinin bir üyesidir, ya progesteron yanıt elemanları (PRE'ler) aracılığıyla spesifik hedef genlere bağlanarak ya da DNA'ya bağlı diğer transkripsiyon faktörlerine bağlanarak işlev görür [70]. Progesteron, meme bezi kök hücre gelişmesinde önemli bir araçtır. Progesteron, menstürel döngünün ikinci yarısında veya luteal fazda öncelikle yumurtalıklarda bulunan korpus luteum tarafından üretilen bir steroid hormondur. Östrojen varlığında hem otokrin hem de parakrin mekanizmalarıyla proliferasyonu indüklemek için ER'in neden olduğu PR ekspresyonu gereklidir. PR ekspresyonu, östrojene duyarlı dokularda ER'e bağlı yönlendirilir. Bu nedenle ER, PR ve progesteron işlevleri için izin veren gen durumundadır [71].

PR geninin PR-A ve PR-B olmak üzere iki adet izoformu vardır. PR-B, tam uzunluktaki reseptörü ifade ederken, PR-A, N-terminal kısmından kesilmiş olan bir versiyondur. PR-B'ye göre PR-A'da ilk 164 amino asit kesilmiş durumdadır [72]. PR-B tipik olarak, hormonla uyarılan hedef genler üzerindeki PR-A'ya göre daha güçlü bir transkripsiyon faktörü olarak hareket eder [73]. PR geninin iki izoformunda genellikle memede benzer oranda eksprese edilir ancak oran, PR-A izoformunun baskın olduğu meme tümörlerinde değişebilmektedir. Farelerde spesifik izoform mutantları oluşturulmuş ve PR-B'nin meme bezinde fonksiyonel olarak önemli bir

form olduğu, PR-A'nın ise yumurtalık fonksiyonu için önemli olduğu ortaya çıkarılmıştır [74].

#### **2.2.5.6. MDR-1 Geni**

Çoklu ilaç direnci geninin tanımı yapılırken yapısal benzerliğe sahip olmayan, moleküler hedefler üzerinde farklılık gösterebilen ve farklı ilaçlara yönelik eş zamanlı bir direnç oluşumuna sahip olan gen ifadeleri kullanılır. Çoklu ilaç direnci, hücre içinde belli etkileşimlere sahip olan ilaçların hücre dışına akışınında olduğunu tespit eden bazı biyokimyasal direnç mekanizmalarıyla belirlenebilmektedir [75]. Kanserle karşı etmesi olan ilaçların hücreden dışarı aktığı bu mekanizmalar, ATP-bağlayıcı Kaset (ATP-binding Cassette, ABC) taşıyıcı protein süper ailesinin bir üyesi olan ABCB1 veya çoklu ilaç direnci 1 (multidrug resistance 1, MDR-1) geni olarak adlandırılan geçirgenlik glikoproteini (permeability glycoprotein, P-gp) gibi proteinlerle düzenlenir [76].

MDR-1 geni için 50 adetten fazla sayıda tek nükleotid polimorfizmi (SNPs) tespit edilmiştir. Bunların içinde, 26. ekzonda (C3435T SNP) oluşan sessiz mutasyon MDR-1'in ekspresyon düzeyini ve buna bağlı olarak da hücrelerin ilaç direncini etkilemektedir [77]. İnsan genomunda MDR-1 ve MDR-2 olmak üzere iki tane MDR geni vardır. Her iki MDR geni periplazmik aktif taşımayı ve eksport sistemi kodlayan genlerle benzerlik göstermektedir. Sadece MDR-1'in insan kanser hücrelerinde ilaç direnci ile ilişkisi olduğu tespit edilmiştir. MDR'in klasik formu, MDR-1 geninin ve MDR-1 geninin ürünü olan P-glikoproteininin (P-gp) aşırı derecede ekspresyonudur [78].

MDR-1 geninin ifade ettiği düzenleyici mekanizmalar oldukça karmaşıktır ve halen tam olarak anlaşılmamıştır. MDR-1 gen ekspresyonunu hem translasyon hem de transkripsiyon düzeyinde arttıran aktivatörlerin ilaca direnci arttıran protein kinaz C (PKC) geni olduğu bilinmektedir. Sitotoksik ilaçlardan bazılarının uzunca bir süre maruz kalınması MDR-1 geninin aşırı miktarda eksprese edilmesine neden olmaktadır [79]. Tanımı oldukça iyi yapılmış olan mitojen aktive edici protein kinaz kaskadının (MAPK) önemli üyelerinden biri de c-Jun NH2-ucu protein kinaz

(JNK)'dir. İnsan karsinoma hücrelerinde birçok farklı antikanser ilaçla muamele sonucu, JNK'nın aktive olması ve bu aktivasyon sonucunda MDR-1 geninde ekspresyon düzeyinin artmasının da olduğu belirlenmiştir. Böylece JNK'nın çoklu ilaç direnci geninin aktive edilmesinde rol aldığı tahmin edilmektedir.

JNK, heterodimer özellikte olan transkripsiyon faktörü (AP-1) yarısını meydana getiren c-jun'un fosforilasyonunu ve aktivasyonunu sağlamaktadır [80]. MDR-1 geninde gen DNA'sı üzerinde transkripsiyonu başlatan AP-1 bağlanma bölgeleri bulunmaktadır, bu sebeple MDR-1 transkripsiyonuyla AP-1 aktivasyonu arasında pozitif bir bağlantı olduğu belirlenmiştir. MDR-1 gen ekspresyonunun uyarılması, JNK aktivasyonuna bağlı olarak AP-1 transaktivasyonu aracılığıyla gerçekleşmektedir. Özetle JNK ve diğer protein kinaz kaskadlarını aktive eden ajanların da MDR-1 gen ekspresyonunun düzeyini de etkilediği görülmüştür [81].

#### **2.2.5.7. BCL-2 Geni**

BCL-2 protein ailesinin belirlenen ilk üyesi BCL-2'dir ve ilk kez insan B hücresi foliküler lenfoması (BCL)'nda gösterilen, kromozomal translokasyonu olan, BCL-2 geninin aşırı ekspresyonunu indükleyen ve apoptozu inhibe ederek programlı hücre ölümünü düzenleyen bir proteindir. BCL-2 geni üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre BCL-2 ailesi üyeleri, evrimsel düzeyde korunmuş bir  $\alpha$ -heliks BCL-2 homolojisi (BH) bölgesi bulundurmalarından dolayı yapısal veya fonksiyonel benzerlikler göstermektedir. BCL-2 ailesi, sahip oldukları yapısal ve fonksiyonel benzerlikler göz önüne alınarak pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler olarak iki gruba ayrılmaktadır [82].

Anti-apoptotik proteinler grubu üyeleri arasında BCL-2, BCL-xL (BCL211 uzun izoform), BCL-w (BCL212), MCL-1 (miyeloid hücre lösemisi-1, BCL213) ve BFL-1/A1 (BCL215) proteinleri bulunmaktadır. Bu proteinlerin dört BH bölgesi ve A1 dışında bir karboksil terminal transmembran bölgesi vardır. Bu proteinler genellikle dış mitokondriyal zar (outer mitochondrial membrane, OMM) üzerinde bulunmaktadır. Tüm anti-apoptotik proteinler beş veya altı heliksten meydana gelen tersiyer bir yapıyla BH1-3 bölgelerini çevrelemektedir. Bu tersiyer yapı sayesinde,

BCL-2 ailesinin pro-apoptotik üyeleriyle etkileşiminde görev alan hidrofobik bir bağlantı kısmı oluşturmaktadır. Bazı hücre tiplerinde anti-apoptotik BCL-2 proteinlerinin aşırı ekspresyonu, pro-apoptotik BCL-2 proteinlerinin direkt sinyal iletimi baskılanmaktadır. Böylece hücrelerde apoptoza karşı direnç geliştirmekte dolayısıyla immün hastalıklara ve kanserli hücrelerin oluşumuna yol açılabilmektedir [83].

Pro-apoptotik BCL-2 proteinleri kendi aralarında fonksiyon ve yapılarına göre iki grupta incelenmektedir. Bu alt gruptan birinci sınıfı, BCL-2 antagonist katili (Bak) ve BCL-2 ile ilişkili X proteini (BAX)'ni bulundurmaktadır. BCL-2 antagonist katili ve BCL-2 ile ilişkili X proteininin üç BCL-2 homoloji (BH) bölgesi vardır ve bunlar dış mitokondriyal zar (OMM)'ında bulunan proteolipid porları içine oligomerize olmuşlardır [84]. Bu proteinlerin apoptotik sinyal iletimi sonucu konformasyonu değiştiği için mitokondriyal zarlar arası boşluğa salınımı olmaktadır. Bunun sonucunda ise sitokrom c, Omi/HtrA2, Smac/DIABLO gibi öldürücü etkiye sahip olan efektörlerin mitokondriden sitozole salınmasıyla apoptotik sürecin düzenlenmesini sağlayan mitokondriyal dış zar geçirgenliği (MOMP)'ne neden olmaktadır [85].

Pro-apoptotik BCL-2 proteinlerin ikinci sınıfında ise, yalnızca bir adet BH bölgesi olduğundan BH3 proteinleri olarak adlandırılmaktadır. BH3 proteinleri, BCL-2 modifiye edici faktör (Bmf), BCL-2 ile etkileşen hücre ölümünün düzenleyicisi (Bim), BCL-2 hücre ölüm antagonisti (Bad), p53 ile regüle edilen apoptoz düzenleyici (Puma), BCL-2 ile etkileşen katil (Bik), Noxa, Harakiri (Hrk) ve BH3 ile etkileşen bölge ölüm agonisti (Bid)'ni barındırmaktadır. Yalnızca bir adet BH3 bölgesi olan bu proteinler doğrudan pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlere bağlanabildikleri gibi bunları da düzenleyebilmektedirler. Hücrelerin mitokondriyal yolağa girip girmeyeceğini anlamak için antagonistik BCL-2 proteinlerinin oranına bakılması gerekmektedir [86].

BCL-2 proteinleri apoptozda ve bazı hücrel süreçlerde de yer almaktadır. Hücrel aktiviteye örnek olarak nükleer zarla ilişkili olan BCL-2 fraksiyonu, hücre çekirdeğinde transkripsiyon faktörlerinin lokalize olmasını önler ve aktivasyonlarını

engeller. Bir diğerk örnekte ise BCL-2 proteinleri hücre döngüsünün, G1 fazında uzamasına neden olmakta, G<sub>0</sub> fazında kalmasını sağlamakta ve büyüme faktörleriyle aktive edilen hücrelerin hücre döngüsüne girmesini geciktirmektedir. Bu durum BCL-2 geninin anti-apoptotik rolünden bağımsız olarak gerçekleşen hcresel süreçlerdir [87]. Tüm bu örneklere ek olarak BCL-2 ailesi, nükleer DNA tamirinde de rol almaktadır. Endoplazmik retikulumda hücre içi Ca<sup>2+</sup> akışının düzenlenmesinde BCL-2'nin görev aldığı bilinmektedir. Ca<sup>2+</sup> akışının düzenlenmesinde BCL-2 geni apoptozu başlatması yanı sıra hücre fizyolojisinin normal koşullarda kalmasını sağlanması rolü açısından önemlidir [88].

#### **2.2.5.8. BAX Geni**

Canlılarda stres kaynaklı apoptoz indikasyonu, BCL-2 ailesi proteinleri tarafından kontrol edilmektedir. Apoptozun başlamasında aktif bir rolü olan BAX geni, BCL-2 ailesinin önemli bir üyesidir [89]. Normal hücrelerde BAX, çoğunlukla hücre sitozolinde inaktif küçük yapılar halinde; daha düşük oranlarda ER'da ve OMM'de gevşek durumda bulunmaktadır. Yapısal olarak sadece tek bir BH3 bölgesi olan proteinlerin aktivasyonu ile BAX yapısal değişikliğe uğrar, mitokondriye göç eder ve mitokondride başka proteinlerle kompleks oluşturarak apoptozu sağlamak için MOMP'a neden olur. Bu işlevi sayesinde sitokrom c gibi mitokondriyal apoptotik proteinler ve ROS'un mitokondriden serbest bırakılmasını sağlamakta ve kaspaz aktivasyonunu başlatmaktadır [90].

BAX geni hücresel yapı açısından diğerk BCL-2 ailesi üyeleriyle benzer özelliklere sahiptir. BAX proteini 9  $\alpha$ -heliksten oluşur ve bu heliks yapı kısa iplikler ile birbirine bağlanmıştır. BAX'ın OMM ile etkileşiminde  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  ve  $\alpha 9$ 'un, katkıda bulunduğu öngörülmektedir. Lipid çift tabakasında por oluşumuna neden olduğunu bilinen  $\alpha 5$  ve  $\alpha 6$  tıpkı bakteriyel toksinler gibi saç tokası şeklindeki amfipatik heliks yapıları ihtiva etmektedir [91].  $\alpha 5$  veya  $\alpha 6$  heliks mutasyonları, BAX geninin zar geçirgenliğini artmasına neden olmakta dolayısıyla BAX'ın apoptozu başlatma özelliğini ortadan kaldırmaktadır.  $\alpha 5$  ve  $\alpha 6$  heliksleri, bir bölümlerinde  $\alpha 1$  ve  $\alpha 2$  heliksleri, diğerk bölümlerinde  $\alpha 3$  ve  $\alpha 4$  heliksleri, yukarı bölümlerinde ise  $\alpha 7$  ve  $\alpha 8$  heliksleriyle ile çevrelenmiştir [92]. BAX geninin ilk  $\alpha$ -heliksi ( $\alpha 1$ ), normal

hücrelerde BAX'ın konformasyonunun sabit kalmasını dolayısıyla homo-oligomerizasyonun inhibe olmasını sağlamaktadır. tBid, Puma gibi tek BH3 bölgesi olan aktivatörler BAX'ın homo-oligomerizasyona uğraması için genin  $\alpha 1$  heliksine direkt bağlanıp N- ve C-terminal bölgelerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır.  $\alpha 1$  heliks kalıntısı D33, Bax'ın tBid ve Puma ile etkileşiminden sorumludur ve K21 kalıntısı da Bax'ın BH3 bölgesinin Bim ile etkileşiminden sorumludur. Bu kalıntılardaki mutasyonlar BAX'ın tek bir BH3 aktivatörüyle etkileşimini engeller dolayısıyla BAX aktivasyonunun zayıflamasını sağlayıp apoptoza neden olmaktadır [93].

BAX'ın mitokondriyal göçü için N-terminal bölgesi, proteinin inaktif formunda tutulmasında görevlidir ve bu göç için BAX proteininde bu bölgenin hareket etmesi gerekmektedir. Bu bölge işlevi göz önünde bulundurularak Hedeflemenin Apoptotik Düzenlenmesi (ART) olarak adlandırılmaktadır. BAX'ın N-terminal bölgesinde meydana gelen değişiklikler, sadece BAX'ın aktifleşmesi ve mitokondriye göçünü gerçekleştirmekte yetersizdir [94]. BAX'ın hidrofobik yapıya sahip  $\alpha$ -heliks ( $\alpha 9$ )'un C-terminal bölgesi, BH bölgelerinden oluşur ve transmembran tutucu gibi görevi vardır. Bu heliksin baskılanması proteinin zara tutunmasını engellemektedir. Bu nedenle heliksin harekete başlaması BH bölgelerinde,  $\alpha 5$  ve  $\alpha 6$  hidrofobik saç tokası yapısını oluşturarak dimerizasyon ve oligomerizasyona sebep olmaktadır [95].

BAX'ın aktivasyon mekanizması henüz kesin belirlenememiş olsada iki görüş üstünde durulmaktadır. Direkt olmayan görüşe göre, BAX, BCL-2 hayatta kalım proteinleriyle tutulmaktadır. Bu proteindeki BH3 bölgesi, BAX proteininin BCL-2 ailesi proteinleriyle etkileşimini ve homo-oligomerizasyonu düzenler. BAX proteininde bazı BH3 kalıntıları, hayatta kalım proteinleri ile ilişkisini düzenler [96]. BAX'ın ihbibasyonunu kolaylaştırmak için tek BH3 bölgesi olan proteinler BCL-2 hayatta kalım proteinlerine apoptoz esnasında bağlanır. Direkt görüşe göre ise tBid, Bim ve Puma gibi tek BH3 bölgesi olan aktivatörler direkt olarak BAX'a bağlanır ve BAX'ın konformasyonunu değiştirir. Diğer tek BH3 bölgesi içeren aktivatörler de BCL-2 hayatta kalım proteinlerine bağlanıp geriye kalan tek BH3 bölgesi olan aktivatörlerin salınmasını sağlamaktadır. Yapılan son çalışmalar, BAX'ın aktivasyonunda bu iki modelin de yer alabileceğini göstermiştir [97].

### **2.2.5.9. STAT-3 Transkripsiyon Faktörü**

Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörleri (STAT, signal transducer and activator of transcription), yedi üyeden (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6) oluşan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu transkripsiyon faktörleri, hücrelerin sağkalımı, farklılaşması ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde görev almaktadır. STAT transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, sitoplazmik tirozin kinazlar olan Janus kinazları (JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2) ile olur. Uyarılmamış hücrelerde bu kinazlar aktif değildir. JAK'lar Reseptör-ligand etkileşiminden sonra sitoplazmada inaktif haldeki STAT proteinlerini Src homoloji 2 (SH2) bölümündeki spesifik tirozin rezidülerinden fosforilleyerek aktive eder. Homodimer veya heterodimer oluşturarak nükleusa geçip aktive olan STAT transkripsiyon faktörleri ve ilgili genlerin transkripsiyonunu sağlar [98].

TAM ve MDSC'ler tümörde yaygın olarak bulunan immün baskılayıcılardır ve aktif özellik kazanmaları STAT3 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu sayesinde gerçekleşir. Bu hücrelerde STAT3 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu immün baskılayıcı olarak ortaya çıkmaktadır dolayısıyla bu hücrelerin olgunlaşmaları engellenir [99]. STAT3 aktivasyonunda etkisi olan faktörler arasında İL-6 ailesi üyeleri (İL-6, İL-11, Onkostatın M, Kardiyotrofin-1, Lösemi inhibitör faktörü, Siliyer nörotrofik faktör) dahil olan kanser hücreleri ve mikro çevrede bulunan immün hücreler tarafından üretilen farklı etkenler yer almaktadır. STAT3'ün aktive olmasıyla; İL-6, İL-1 $\beta$ , makrofaj-koloni uyarıcı faktör (M-CSF), siklooksijenaz-2 (COX2) ve PGE2 gibi tümör gelişimini destekleyen mikroçevrenin oluşumu gerçekleşir. Aynı zamanda Bcl-xL, c-myc, siklin D ya da survivin gibi genler aracılığıyla hücre canlılığını ve hücre proliferasyonunu desteklemektedir. Anjiyogenez ve invazyona aracılık etmeleri için VEGF, HGF, bFGF ve matriks metalloproteazların (özellikle MMP-2 ve MMP-9) üretimi gerçekleştirilir. İL-6, İL-10 ve TGF- $\beta$  üretimini uyarılmasını sağlar ve İFN- $\gamma$ , İL-12, MHC-II, CD80 ve CD86 ifadesini önler böylece tümör-ilişkili makrofajların tam olgunlaşmasını engelleyerek immün baskılayıcı özellik kazanmaktadır [100].

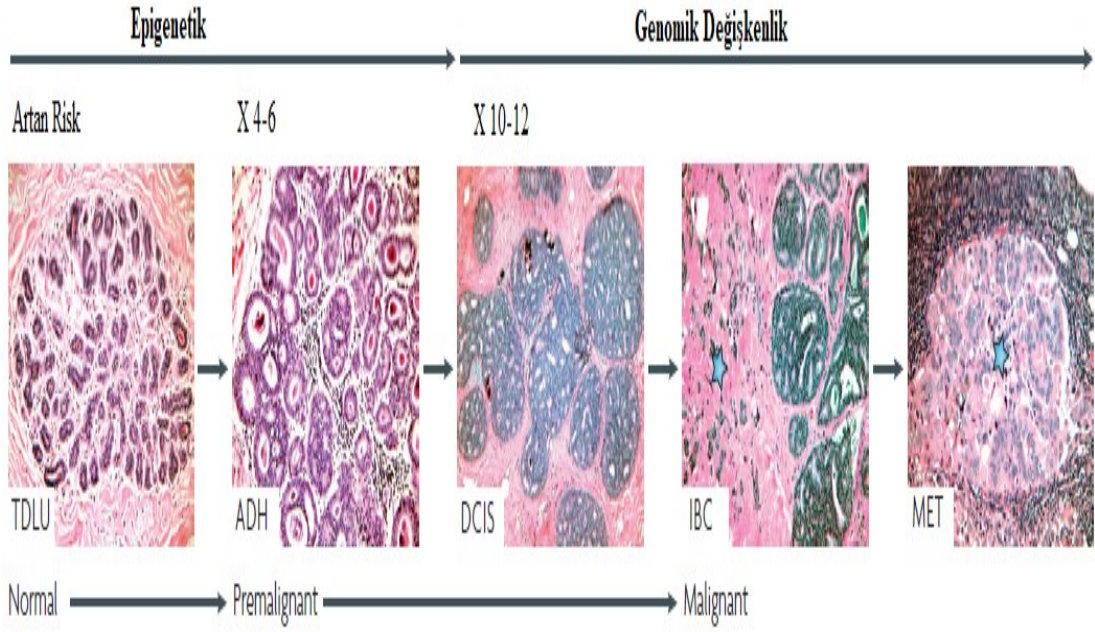


Kanser tedavisinde STAT3 transkripsiyon faktörü proteinini hedefleyen stratejilerin geliştirilmesine yol açan faktörler arasında bu proteinin inflamatuvar mikroçevre oluşturabilmesi, hücre çoğalmasını uyarması, hücre sağkalımını desteklemesi, anjiyogenezi uyarması, invazyonu sağlaması ve miyeloid hücre karakteri üzerine etkilerinin olması gösterilmektedir. Doğrudan ve dolaylı olarak iki yol STAT3 inhibisyonu belirlenmiştir. Doğrudan yol için STAT3 inhibisyonunda; dimerizasyon engellenmekte, STAT3 mRNA'sının seçici inhibisyonu olmakta, STAT3-DNA etkileşimi ve transkripsiyon durdurulması söz konusu olmaktadır. Dolaylı yol için STAT3 inhibisyonunda; sitokin ve büyüme faktörlerinin ilgili reseptörlerine bağlanması engellenir, JAK tirozin kinaz fosforilasyonu engellenir, STAT3'ü negatif olarak düzenleyen proteinlerin aktivasyonu sağlanır, STAT3'ün nükleositol plazmik geçişi engellenir ve protein tirozin kinazlar inhibe edilmesi söz konusu olmaktadır [101]. Pre-klinik çalışmalarda elde edilen verilere göre STAT3 inhibisyonu için transkripsiyon faktörünün gen düzeyinde susturulması anti-tümör yanıtları destekleyerek tümör oluşumunu engellemektedir. STAT3'ün geçici inhibisyonuyla tümör oluşumunu destekleyen inflamasyonun anti-tümör immünitete doğru ilerlemesi sağlanmaktadır. STAT3 proteininin küçük moleküllerde dimerizasyonu ve DNA bağlanmasını inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu etkisinden dolayı tümörlü hücre çoğalmasını engelleyip ve apoptozu uyardığı belirlenmiştir [102]. FDA onaylı STAT3'ü direkt inhibe eden bir ajan belirlenmemiştir. Fakat bu transkripsiyon faktörü için solid ve hematopoetik gibi bazı kanser türleri için faz-I ve faz-II çalışmaları sürmektedir. Dolaylı yoldan STAT3'ün inhibisyonunda FDA onaylı JAK inhibitörleri (Tofacitinib, Ruxolitinib) ümit verici olmaktadır. Diğer yandan FDA onaylı diğer tirozin kinaz inhibitörleri de (Sorafenib, Sunitinib) STAT3'ün dolaylı yoldan inhibe edilmesini sağlamaktadır. Dolaylı da olsa hücre döngüsünün durması ve apoptozun aktive edilmesi söz konusu olmaktadır. Aynı zamanda bu ajanların bir diğer etkileri tümör ilişkili immün hücrelerde STAT3 aktivitesini engellemek ve tümördeki immünolojik mikroçevreyi kanser tedavisine uygun duruma getirmektir. STAT3 aracılı kanser tedavilerinde görev almaları bu şekilde olmaktadır [103].

### 2.2.6. Meme Kanseri Hücre Hatları

Meme kanseri tek bir hastalık değildir. Bunun yerine, çeşitli histopatolojilere, genetik ve genomik varyasyonlara ve klinik sonuçlara sahip bir meme hastalıkları koleksiyonudur. Meme kanseri hücre hatları, meme kanserinin ilerlemesi sırasında proliferasyon, apoptoz ve göçün nasıl düzensiz hale geldiğini araştırmak için en yaygın olarak kullanılan ölçütler olmuştur. Hücre hatlarının kullanımı, bu süreçleri düzenleyen genler ve sinyal yolları hakkında zengin bir bilgi birikimi sağlamıştır. Yerleşik hücre hatları, genetik etkenler ve iyi tanımlanmış deneysel koşullar altında kolayca çoğaltılır, göreceli olarak izlenebilir özelliktedir, genellikle tekrarlanabilir ve ölçülebilir sonuçlar vermektedirler. Bundan dolayı meme kanseri araştırmaları için meme kanseri hücre hatları temel ölçüt olmuştur.

Meme kanseri, bir süreç boyunca gelişen, genetik ve genomik olarak heterojen bir hastalıktır. Şekil 2.5’de meme kanserinin gelişim aşamaları gösterilmiştir. Normal meme hücresi terminal duktal lobüler ünitesi (TDLU), lümen ve miyoepitelyal hücrelerden meydana gelen iki katmanlı bir epitelden oluşan lobüller ve kanallar içerir. Atipik duktal hiperplazi (ADH), kanal veya lobül içindeki anormal hücre katmanları ile karakterize premalign bir lezyondur. ADH'nin anormal hücreler içeren invazif olmayan bir lezyon olan erken evreli meme kanseri (DCIS) karsinomunun öncüsü olduğu düşünülmektedir. Her aşamada, kötü huylu veya invazif meme kanseri (IBC) geliştirme riski artar. DCIS, IBC'ye yol açabilir (bu durum bir DCIS lezyonuna bitişik mavi bir yıldızla gösterilmiştir), ancak hangi lezyonların ilerleyeceğinin nasıl tahmin edildiği açık değildir. Hücre istilası bir kez gerçekleştiğinde, metastaz geliştirme riski önemli ölçüde artar. Lenf düğümleri, meme kanseri metastazı (MET) için birincil bölgedir (MET; mavi bir yıldızla gösterilmiştir). Şekil 2.5’de Meme kanserinin genomik değişkenliği gösterilmiştir [104].



Şekil 2.5. Meme kanserinin biyolojisi

Meme kanseri hücre hatları, meme kanseri fizyolojisinin anlaşılmasına, ilaç keşfi ve toksisite çalışmaları gibi diğer uygulamalara önemli ölçüde katkıda bulunmuştur [105]. Yakın geçmişte, DNA mikrodizisi çalışmaları, farklı gen ekspresyon modellerinde DNA kopya sayısı değişiklikleri ile ilişkili klinik sonuçlara dayalı olarak meme kanserinde beş ana alt tipi belirleyerek bir sınıflandırma önermiştir [106]. Sınıflandırma; histolojik tip, tümör derecesi, lenf düğümü durumu, ER ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) gibi belirteçlerin olduğuna dayanmaktadır. DNA mikrodizileri kullanılarak moleküler profilin geliştirilmesi ile gen ekspresyon profili, ER- $\alpha$ , PR ve HER2'nin immünohistokimyasal ekspresyonu ile meme kanserinin en az beş alt tipte sınıflandırılabilirliğini kanıtlanmıştır. Bunlar luminal-A, luminal-B, HER2, normal ve bazal alt tiplerdir. Çizelge 2.3'de meme karsinomunun hücre hatları ve alt tiplerine göre moleküler sınıflandırılması gösterilmiştir [107].

Çizelge 2.3. Meme kansinomunun hücre hatları ve alt tiplerine göre moleküler sınıflandırılması

Hücre Hattı	Alt tipi	ER	PR	HER2
MCF-7	Luminal A	+	+	-
T-47D	Luminal A	+	+	-
MDA-MB-361	Luminal B	+	-	+
HCC1954	HER2	-	-	+
SK-BR-3	HER2	-	-	+
MDA-MB-468	Basal A	-	-	-/+
BT-20	Basal A	-	-	-
MDA-MB-231	Basal B	-	-	-
BT-549	Basal B	-	-	-

MCF-7 hücre hattı, insan meme kanseri ile ilgili çalışmalar için kullanılan yaygın bir *in vitro* modeldir. Bu hücre hattı östrojen reseptörlerini ifade eder ve MCF-7 hücrelerinin büyümesi hormona bağlıdır. MCF-7'nin meme kanserinde önemi, östrojen reseptörünün ekspresyonu yoluyla östrojen duyarlılığına bağlanabilir, bu da hormonların hücre proliferasyonu ve protein sentezi üzerindeki etkisini incelemek için ideal bir yol oluşturur [108]. MCF-7'nin türetilmesinin ve izolasyonunun anlaşılması, bu tek hücre hattından meme kanseri ile ilgili temel kavramlar geliştirildiği için kritiktir. MCF-7 hücre hattı genomik çalışmalar için referans olarak kullanılmaktadır. Bunun nedeni ise MCF-7 hücre hattının sınırsız oranda DNA ve RNA üretebilmesinden kaynaklanmaktadır [109].

### 2.3. MEME KANSERİNDE TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Meme kanseri tedavi yöntemi ve iyileşme aşaması, hastalığın ne kadar ilerlediği yani kanserin kaçınıcı evrede olduğuyla doğrudan ilgilidir. Meme kanseri, tanı yöntemleri

ile teşhis edildikten sonra ameliyat ile kanserli bölgenin alınması gerekir. Meme kanseri olan hastanın hormon tedavisinden yararlanıp yararlanamayacağına karar verebilmek için kanserli dokuda progesteron ve östrojen reseptörlerine bakılması gerekmektedir. Patoloji sonucunda tümörün boyutu, progesteron ve östrojen reseptörlerinin varlığı, kanserli hücrelerin görünümü, lenf bezlerinin kanser hücreleri tarafından tutulup tutulmadığı gibi tümöre ait birçok özelliğe bakılır ve bu sayede tedavi planını belirlemede yol gösterici rol üstlenir. Ayrıca bu özellikler kanserin evresini belirler. Patoloji raporundaki tümörün ve hastanın genel özellikleri göz önünde bulundurularak genel cerrahlar, radyasyon onkologları ve medikal onkologları tarafından bir kurul halinde değerlendirilerek cerrahi işlem sonrasında yapılacak olan tedavi yöntemine de karar verirler [110].

Meme kanseri olan kadınların birçok tedavi yöntemi vardır. Bunlar;

- Lokal Tedavi
  - Cerrahi Tedavi
  - Radyoterapi
  
- Sistemik Tedavi
  - Kemoterapi
  - Hormonal Tedavi
  - Hedefe Yönelik Tedavi [111].

### **2.3.1. Lokal Tedavi**

#### **2.3.1.1. Cerrahi Tedavi**

Cerrahi tedavi meme kanseri olan hastalarda kullanılan en yaygın tedavi yöntemlerinden biridir. Cerrahi işlem 3 farklı şekilde yapılmaktadır.

- **Meme Koruyucu Cerrahi Tedavi:** Memenin tamamının alınmadığı sadece kanserli bölgenin alındığı cerrahi müdahaleye meme koruyucu cerrahi tedavi denilmektedir. Genellikle cerrahlar koltuk altında bulunan lenf

bezlerinde kanserli hücrelerin tutulup tutulmadığını anlamak için lenf bezlerini de alırlar. Genellikle cerrahi işlemden sonra meme bölgesinde kanserli hücre kalma ihtimaline karşılık kanserli hücreleri yok etmek için radyoterapi tedavisi de uygulanmaktadır.

- **Mastektomi:** Lenf bezlerinin bir kısmının veya tamamının, memenin ise tamamının alındığı cerrahi operasyonlara mastektomi denir.
- **Onkoplastik Cerrahi:** Cerrahi operasyon sırasında kanserli bölge ile alınan memenin bir kısmının veya tamamının alınmasından sonra estetik olarak diğer memenin benzerinin yapıldığı cerrahi işlemdir [112].

### 2.3.1.2. Radyoterapi

Radyoterapi, kanserli hücrelerin çoğalmalarını engellemek ve onları yok etmek için yüksek enerjili ışınların (x-ışınları gibi) kullanıldığı tedavi yöntemidir. Radyoterapi tedavisinde genel amaç kanserli hücrelere tahrip ederken sağlam hücrelere minimum düzeyde hasar vermektir. Radyoterapi tedavisi genellikle cerrahi işlem sonrası 6 ay içinde yapılır. Bu tedavi yaklaşık olarak 3 hafta sürmektedir ve genellikle hastaların hastanede yatmasına gerek kalmadan ayakta tedavi uygulanır. Radyoterapi sonrası hastalarda genellikle; halsizlik, iştahsızlık, memede ödem kaynaklı ağırlık hissi, memenin şeklinde değişiklik vb. şikayetler görülmektedir [113].

### 2.3.2. Sistemik Tedavi

#### 2.3.2.1. Kemoterapi

Kemoterapi tedavisi, antikanser ilaçları kullanarak kanserli hücrelerin çoğalmasını önlenmek veya bu hücrelerin kontrol altına alınmasını sağlamak için uygulanmaktadır. Kemoterapi, genellikle kontrolsüz çoğalan kanserli hücrelere karşı öldürücü etkileri olan doğal veya sentetik biyolojik, kimyasal ajanlar ve hormonlarla yapılan tedavi yöntemidir [114]. Kemoterapi tedavisinin nasıl bir etki oluşturduğunu anlamak için hücre siklusunun bilinmesi gerekir. Hücre siklusunun önemli olan 5 fazı vardır. Bunlar;

- **G<sub>0</sub> Fazı:** Mitoz sonrasında hücrelerin hücre bölünmesinde aktif olmadıkları evredir. Bu fazda kemoterapötik ajanlar çok fazla etki etmemektedir.
- **G<sub>1</sub> Fazı:** Bu faz uyarılma sonucu başlamaktadır ve hücrenin üremesinde etkili olan RNA, proteinler ve enzimler sentezlenir. Bu fazda hücre kemoterapiye karşı duyarlıdır.
- **S Fazı:** Bu fazda yeni bir DNA sentezi başlar ve hücre bölünmesi için hazırlık yapılır. Bu fazda kullanılan ilaçlara karşı hücre hassasiyeti artmaktadır.
- **G<sub>2</sub> Fazı:** Bu fazda mitoz için gerekli olan RNA ve proteinlerin sentezi hızlanmaktadır.
- **M Fazı:** Bu faz mitoz fazı olarak geçer ve dört aşamada yeni iki hücre oluşmaktadır. Oluşan iki hücre ya G<sub>1</sub> fazında hücre siklusuna girer ya da kemoterapiye dirençli olarak G<sub>0</sub> fazında dinlenir [115].

Sağlıklı ve kanserli hücrelerin hücre siklusları birbirine benzemektedir. Sağlıklı hücre ile kanser hücresi arasındaki en önemli fark kanser hücrelerinde proliferasyonu durduracak bir mekanizmanın olmamasıdır. Kanserli hücrelerde proliferasyonunu durduracak mekanizma olmadığından dolayı bu proliferasyon organizmanın ölümü ile sonuçlanabilir. Hücrelerin proliferatif dönemde olması kemoterapötik ajanların etkisinin daha fazla olması ve bu sayede ilaç gelişiminin daha spesifik yapılması için önemlidir. Bu sayede hücre siklusunun tek fazında spesifik etkili ilaçlar (faz spesifik) ya da bütün fazlarda etkili olan (faz spesifik olmayan) ilaç gelişimi sağlanabilmektedir. Hücre siklusunda faz spesifik olmayan alkilleyici kemoterapötik ilaçlar G<sub>0</sub> fazındaki hücrelere karşı etki etmektedir ve yalnızca aktif olarak bölünen hücrelere değil yavaş büyüyen tümörlerin bir kısmına da etki etmişlerdir [116].

Kemoterapinin amacı metastazın önlenmesi, kanserli hücrelerin öldürülmesi ve kanserli hücrelerin sebep olduğu yakınmaları minimum düzeye indirmektir. Kemoterapi genellikle diğer tedavi yöntemlerini tamamlayıcı olarak uygulanır.

Kemoterapi, el veya koldaki küçük damarlara damar yolu açılarak veya büyük damarlara port denilen vücut içi araçlar yardımıyla uygulanır. Kemoterapinin bir diğer uygulama yöntemi ise kas, deri altı veya tümör bölgesine doğrudan enjekte edilerek uygulanır. Bunların yanı sıra hap veya şurup olarak oral yolla uygulanabilir. Kemoterapi kan dolaşımı aracılığıyla bütün vücuda yayılıp doku ve organların hepsini etkilediğinden dolayı cerrahi işlem ve radyoterapi gibi lokal tedavi yöntemlerine göre daha farklıdır [117].

Meme kanserinde kemoterapi tedavisi uygulanan hastalarda tedaviden dolayı görülen yan etkiler bazı etkenlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yan etkilerin farklılık gösterme nedenleri arasında verilen ilaçların türleri, verilme süreleri ve miktarları etkilidir. Kemoterapi tedavisinin mide bulantısı, saç dökülmesi (alopecia), halsizlik, tat alma duyusunda kayıplar, ağız yaraları, iştahsızlık, enfeksiyon riskinin artması, deri rahatsızlıkları, ishal veya kabızlık gibi birçok yan etkisi vardır [118].

Kemoterapi tedavisinde uygulanan ilaçlar 2 grupta incelenir.

#### ➤ **Hücre siklusuna bağımlı ilaçlar**

- **Antimetabolitler:** Hücre metabolizmasını ve DNA sentezini bozarak etki eden ilaçlardır. S fazında etkili olan ilaçlardır.
- **Bitki Alkoloidleri:** Ana hücreden iki küçük hücre oluşmasını engelleyen ilaçlardır. M fazında etkili olan ilaçlardır.
- **Antitümör antibiyotikler:** RNA, DNA ve protein sentezini etkileyen ilaçlardır. G<sub>2</sub> fazında etkili olan ilaçlardır.

#### ➤ **Hücre siklusundan bağımsız ilaçlar**

- **Alkilleyci ajanlar:** Hücre çekirdeğini, DNA ve RNA sentezini etkileyen ilaçlardır. Kontrolsüz ve hızlı bir şekilde çoğalan hücrelerin ölümüne yol açarlar.
- **Hormonlar:** Protein sentezini bloke ederler ve tümör ortamını değiştirerek büyüme ve çoğalmayı engellerler.



- **Antibiyotikler:** DNA replikasyonunu bozarak hücrelerin hızlı bir şekilde çoğalmasını engellerler [119].

### 2.3.2.2. Hormonal Tedavi

Meme kanseri dahil birçok kanserin oluşumunda ve gelişiminde hormonların önemli bir rolü vardır. ABD’de yapılan bir araştırmada erkeklerde görülen kanser türlerinin %20’si kadınlarda görülen kanser türlerinin %40’ı hormonlardan kaynaklı olarak gelişmektedir. Meme kanseri gelişiminde rol oynayan en önemli iki hormon östrojen ve progesterondur [120]. Meme kanseri olan hastaların hormonal tedaviye duyarlılığını etkileyen en önemli faktör kanserli hücrede hormon reseptörlerinin olmasıdır. Hormonal tedavi planlanırken immünohistokimyasal yöntemiyle bakılan östrojen ve progesteron reseptörleri rol oynamaktadır. Hormonal tedavi sırasında östrojen hormonu bloke edilerek kanserli hücrelerin çoğalmasını engellenmesi hedeflenmektedir [121].

Hormonal tedavinin amacı; en başta gerçekleştirilen cerrahi tedavi, kemoterapi veya radyoterapi tedavilerinden sonra vücudun herhangi bir kısmında kalabilecek olan kanserli hücrelerin yok edilmesidir. Hormonal tedavi, invazif olmayan meme kanserlerinde tedaviden sonra büyük tümörlerin küçültülmesi, yeni kanser oluşumu riskini azaltmak için uygulanabilir [122].

### 2.3.2.3. Hedefe Yönelik Tedavi

Hedefe yönelik tedavinin tanımı kanser ile ilişkisi bulunan yolakların, reseptörlerin ve genlerin spesifik olarak tedavi edilmesi yöntemi olarak belirtilmektedir. Bu tedavi yönteminde apoptoz, anjiogenez, migrasyon, hücre döngüsü gibi kanserle ilgili olan özelliklere göre tedavi hedeflenmektedir. Hedefe yönelik tedavi yöntemi uygulanırken kullanılan birtakım ilaçlar bulunmaktadır. Bunlar;

- **Trastuzumab:** Kimerik monoklonal bir antikordur. Metastatik meme kanserinde HER-2 proteinini hedef alır.

- **Bevacizumab:** Vasküler endotelial büyüme faktörüne karşı (VEGF) geliştirilen rekombinant monoklonal bir antikör türüdür. Vasküler endotelial büyüme faktörü, endotelial poliferasyonunu ve migrasyonunu artırarak damarlaşmayı uyarır ve apoptozu inhibe eder.
- **Lapatinib:** Tirozin kinaz inhibitörü olarak rol oynar. Hem epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) hem de HER-2/ErbB2'yi inhibe etmektedir.
- **Pertuzumab:** HER-2 spesifik, rekombinant ve humanize monoklonal bir antikördür. HER-2/HER-2 homodimerini, HER-2/HER-2 ve HER-2/HER-3 heterodimerlerini inhibe etmektedir [123].

#### 2.4. MEME KANSERİNDE BESLENMENİN ETKİSİ

Kilo yönetimi ve yüksek kaliteli diyet gibi sağlıklı yaşam davranışlarına sahip olmak hem meme kanseri riskini hem de tanı koyulduktan sonraki durumu etkiler. Temelde, yüksek kalorili gıdaların (şeker, doymuş yağlar vb.) fazla miktarda alınmasının yanı sıra güvenilir gıdaların (omega-3 yağ asitleri, doğal antioksidanlar, lif içeren) düşük alımı ile karakterize olan hareketsiz yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıkları obeziteye yol açar [124].

Özellikle menopoz sonrası kadınlarda görülen obezitenin yan etkileri ile meme kanseri insidansını, ilerlemesini ve ölüm oranını artırır. Menopozdan sonra, yağ dokusu östrojen üretimi için önemli bir bölge haline gelir ve bu da obez kadınlarda tümör büyümesine neden olabilir. Kilo alımı, menopoz sırasında çok yaygındır, çünkü yumurtalık östrojeninin kaybı hipotalamustaki leptin duyarlılığını azaltır ve böylece aşırı beslenmeyi teşvik eder. Meme kanserinde menopoz sonrası obez olan bireylerde risk düzeyini artırmaktadır [125-126].

Kanser önleme üzerine yapılan araştırmalarda beslenme ile ilgili stratejilere yön vermek amacıyla birçok besin karbonhidratlar, yağ asitleri, vitamin ve mineraller, karotenoidler, fitoöstrojenler gibi besin içerikleri açısından ele alınmaktadır. Meme

kanseri etiyojisinde bazı spesifik besinlerin antioksidan içeriklerinin, kanser epigenetiği üzerine etkisi, DNA onarımı, inflamasyon, genin düzenlenmesi ile ilgili ekspresyon, büyüme faktörlerinin uyarılması gibi biyolojik süreçlere olan etkileri epidemiyolojik çalışmalarda ele alınmaktadır [127].

#### **2.4.1. Flavonoidler**

Flavonoidler, bitkilerde fenilpropanoid yolu ile sentezlenen sekonder polifenolik metabolitlerin bir sınıfıdır [128]. Bitkilerde renk, tat ve farmakolojik aktivitelerde görevli biyoaktif ikincil metabolitler olarak sentezlenen polifenolik bileşiklerdir [129]. Flavonoidlerin bitkilerde biyosentezi kloroplast, tonoplast ve çekirdekte tespit edilmiştir. Ayrıca endoplazmik retikulumun (ER) sitozolik tarafı flavonoidlerin biyosentezi için bölme olarak kabul edilmiştir. Bitki hücrelerinde flavonoidlerin geniş dağılımı ve ER'nin sitozolik yüzünde var olan biyosentetik bölgeler, bitkilerin bu metabolitleri membranlar arası bölmeler boyunca iletmek için etkili flavonoid taşıma sistemlerine sahip olduğunu gösterir. Bitkilerde flavonoid biyosentezi bağımsız bileşenlerin bir araya gelmesiyle değil büyük, karmaşık ve sıkı bir şekilde düzenlenmiş bir metabolomik ağın işleyişiyle oluşur [130].

Sağlığı korumak ve hastalıkları önlemek için uygun bir diyet ve yaşam tarzının gerekli olduğu bilinmektedir. Bitkilerden elde edilen gıdalarda (örneğin sebzeler, meyveler ve içecekler) bol miktarda bulunmaları ve potansiyel antioksidan aktiviteleri nedeniyle, flavonoidler, özellikle kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere diyabet, kanser ve bilişsel bozukluklar gibi hastalıklara neden olan risk faktörlerini azaltmada adjuvanlar olarak son yıllarda önemli ölçüde incelenmiştir [131].

##### **2.4.1.1. Flavonoidlerin Biyoyararlanımı**

Biyoyararlanım, Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından "etkin bileşenin veya bir kısmının emilme ve kullanılabilir hale gelme hızı ve kapsamı" olarak tanımlanır. Farmasötik bilimler tarafından biyoyararlanım genellikle absorpsiyon derecesi olarak

hesaplanır. Biyoyararlanım bir bileşimin vücut tarafından ne ölçüde kullanılabildiğini gösteren ölçüttür [132].

Bağırsak mikrobiyomu, flavonoidlerin emilimi ve metabolizması için çok önemlidir. Bağırsak veya kolon mikroflorası, flavonlar, izoflavonlar, flavonoller ve antosiyaninler gibi glikozile edilmiş flavonoidleri ilgili aglikonlarına hidrolize edebilir. Bu sebeple, flavonoid glikozitler, absorpsiyondan önce bağırsak lümeninde ya da epitelde parçalanırlar [133].

Flavonoidler diğer besinlerle etkileşime girebilirler, karbonhidrat hidrolizasyon enzimleri ( $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz) ve glikoz taşıyıcılarının baskılanması nedeniyle glikoz emilimini azaltabilirler. Diabetes mellitus prevalansının artması, genel olarak karbonhidrat sindirimine dikkat çekmiş ve tokluk hiperglisemiyi azaltıcı stratejilerin araştırılmasına neden olmuştur. Bu kapsamda flavonoidlerin sindirim sisteminde karbonhidrat hidrolize edici enzimleri inhibe ederek glikoz emilimini geciktirme etkisi araştırılmıştır. Çeşitli polifenollerin, özellikle flavonoidlerin, bu enzimleri inhibe ettiği rapor edilmiştir [134].

Yağdan zengin diyet, flavonoid biyoyararlanımını artırır ve misellerle birleşimin sağlanacağı safra tuzlarının salgılanmasını artırma yoluyla bağırsak flavonoidlerin emilimini artırır. Bununla birlikte, proteinden zengin diyet hem antioksidan etkinliği hem de flavonoid biyoyararlanımını azaltabilir [135].

#### **2.4.1.2. Flavonoidlerin Kansere Karşı Etkileri**

Flavonoidlerin kanser ve metabolik hastalıkları önleme ve iyileştirmesindeki etkisi, büyük ölçüde bu bileşiklerin antioksidan kapasiteleri ve biyolojik sistemlerin serbest radikal aracılı bozulmasını engelleme potansiyellerinin varlığından kaynaklanır. Son on yılda, flavonoidlerin çoğunlukla geleneksel antioksidanlar gibi davranmadığı, ancak diğer oksidan eğilimli kısımların yanı sıra protein kinazları ve redoks duyarlı sistenleri içerenler gibi çoklu sinyal yollarında yer alan enzimatik hedeflerde antioksidan etkiler gösterebileceği yönünde ortaya çıkan bir görüş vardır [136]. Araştırmalar, flavonoidlerin prooksidan aktivitesinin kanser hücrelerinde sitotoksik

ve proapoptotik etkilerinden sorumlu olabileceğini göstermektedir. Böylece, flavonoidler ya normal hücreleri antioksidan ajanlar olarak oksidatif stresten koruyabilir ya da sitotoksik pro-oksidanlar olarak hareket ederek kanser veya premalign hücrelerin nekrotik ölümünü tetikleyebilir. Artan sayıda antikanser stratejisi, bu tür stratejiler için hedef olma potansiyeli, diğer hücresel elemanlar yanı sıra, tüm tümör hücrelerinde değişmez bir şekilde mevcut olmaları gerçeğinden dolayı mitokondriye odaklanmaktadır. Flavonoidlerin antioksidan aktivitesinin altında yatan mekanizmalardan biri, mitokondriyal membran akışkanlığını azaltmalarıyla birlikte serbest radikal reaksiyonlarının kinetiğinde bir azalma oluşmasıdır. Kanser hücreleri daha yüksek içsel reaktif oksijen türleri (ROS) seviyeleri gösterir ve bu nedenle normal hücrelere göre daha düşük antioksidan kapasite gösterir, bu da onları oksidatif stresi daha da artıran ajanlara karşı daha az dirençli hale getirir [137]. Tümör hücrelerinin bir başka metabolik özelliği, gelişmiş ROS üretimidir. Mitokondri, hücre içi ROS üretimi için ana organellerinden biridir. Kanser hücrelerinde oksidatif metabolizma geliştirildiğinden, mitokondriyal elektron taşıma zinciri (ETC) tarafından yüksek miktarlarda ROS üretilir, bu da kanser hücresi proliferasyonunu destekleyen mitokondri sisteminin yakınında bulunan sinyal yollarını daha da aktive eder [138].

Flavonoidlerin hücre büyümesini inhibe ettiği ve antikanser ajanları olarak görev yaptığı bilinmektedir. Flavonoidler çok çeşitli antikanser etkileri uygularlar. Bunlar ROS süpürücü enzim aktivitelerini modüle etmek, hücre döngüsünü durdurmaya katılmak, apoptozu indüklemek, otofajiyi indüklemek, kanser hücresi proliferasyonunu ve invazivliğini baskılamaktır [139].

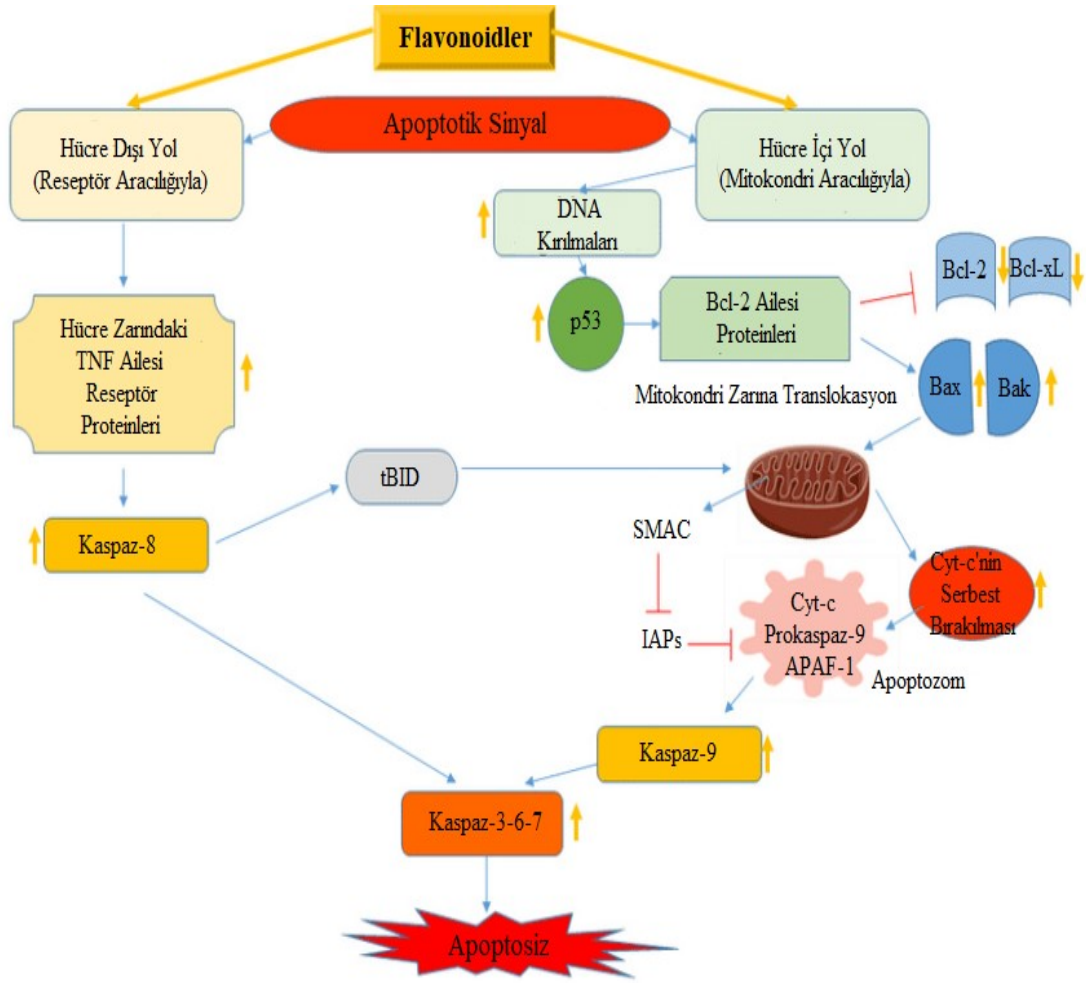
#### **2.4.1.3. Flavonoidlerin Oksidatif Strese Etkisi**

Oksidatif stres, üretilen ROS miktarı ile karakterize edilir ve DNA'daki oksidatif lezyonların neden olduğu kanser gibi bazı hastalıkların gelişimi ile yakından ilgilidir. Bir organizmadaki tüm biyolojik süreçler homeostazda kalmalıdır. Pro-oksidan yük ve antioksidan savunma dengesiz olduğunda, reaktif oksijen türleri (ROS) üretilir ve serbest radikaller üretilir. Bununla birlikte, organizmaları oksidasyona karşı koruyan, iyi beslenme de dahil olmak üzere başka mekanizmalar vardır. Bu durum

flavonoidler gibi antioksidan aktiviteye sahip bileşiklere olan ilgiyi arttırmıştır. *İn vitro* ve *in vivo* olarak flavonoidlerin güçlü antioksidan aktivitesini gösteren kanıtlar vardır ve birçok epidemiyolojik çalışma, diyet flavonoidlerinin oksidatif stresi azaltmadaki etkilerinden dolayı daha düşük kanser insidansı ile ilişkili olduğunu göstermiştir [140]. Flavonoidler, ROS'u doğrudan temizleyebilir ve fenolik hidroksil gruplarının varlığı nedeniyle serbest radikalleri stabilize etme yetenekleri sayesinde metal iyonları ile kompleks oluşturabilir. Flavonoidlerin antioksidan etkileri, antioksidan enzimlerin aktivasyonu, pro-oksidan enzimlerin baskılanması, antioksidan enzimlerin ve faz II detoksifikasyon enzimlerinin oluşumunun uyarılması ile ilgilidir. Hem antioksidan hem de pro-oksidan aktiviteler flavonoidlerin oksidatif stresi önleyip hücreyi kansere karşı korumayı sağladığını göstermektedir [141-142].

#### **2.4.1.4. Flavonoidlerin Apoptoza Etkisi**

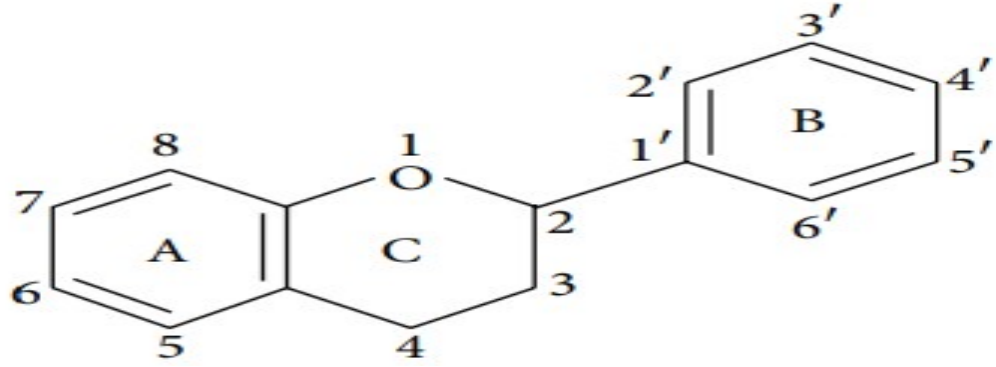
Apoptoz, sinyal iletim kaskadları ve hücresel proteinler tarafından düzenlenen, yoğun bir biçimde organize olan bir süreçtir. Kanser, AIDS, diyabet ve Parkinson sendromu gibi birçok başka hastalık, apoptotik yollardaki dengesizlikler ve anormal mekanizmalar sonucunda ortaya çıkar. Kanser hücreleri, genellikle bir dizi sinyal iletim yolu ve pro-apoptotik proteinler (kaspazlar ve Bcl-2 ailesi proteinleri) tarafından indüklenen programlanmış bir hücre ölümü olan apoptoza karşı dirençlidir [143]. Karsinogenez sürecinde flavonoidler, çoklu sinyal iletim yollarına müdahale eder böylece proliferasyonu, anjiyogenezi ve metastazı sınırlar veya apoptozu artırır [144]. Pro-oksidanlar olarak hareket eden flavonoidler, epidermal büyüme faktörü reseptörü, mitojenle aktive olan protein kinaz, fosfatidilinositid 3-kinazlar (PI3K), protein kinaz B ve nükleer faktör kappaB'nin inhibisyonu yoluyla kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılayabilir [145]. Şekil 2.6'da flavonoidlerin hücre içi ve dışı apoptoz yollarındaki etkisi gösterilmiştir [147].



Şekil 2.6. Flavonoidlerin hücre içi ve dışı apoptoz yollarındaki etkisi

#### 2.4.1.5. Flavonoidlerin Sınıflandırılması

Flavonoidler fenolik bileşiklerin ana grubudur ve bitkilerde yaygın olarak bulunan en çeşitli ikincil metabolitlerdir. Yapısal olarak 15 karbonlu bir iskeletten yapılırlar ve 3 karbonlu bağlantı zinciri ile birbirine bağlanan iki benzen halkasından (A halkası ve B halkası) oluşurlar. Bu nedenle, C6-C3-C6 bileşikleri olarak temsil edilirler. Birçok flavonoidde, bağlantı zinciri ayrıca heterosiklik bir piran veya piron halkası (C halkası) oluşturmaktadır. Bu üçüncü halka sisteminin (C halkası) yokluğunda, flavonoidler kalkanlar olarak adlandırılır ve çoğunlukla çeşitli flavonoid sınıflarının öncüleri olarak hizmet eder. Flavonoidlerin biyosentezi iki farklı yoldan ilerler. Birinci yol, asetat yoludur (A halkası) ve ikinci yol şikimat yoludur (B halkası ile C6-C3 bileşenini oluşturan bağlantı zinciri C halkası). Şekil 2.7’de flavonoidlerin temel yapısı gösterilmiştir [146].



Şekil 2.7. Flavonoidlerin temel yapısı

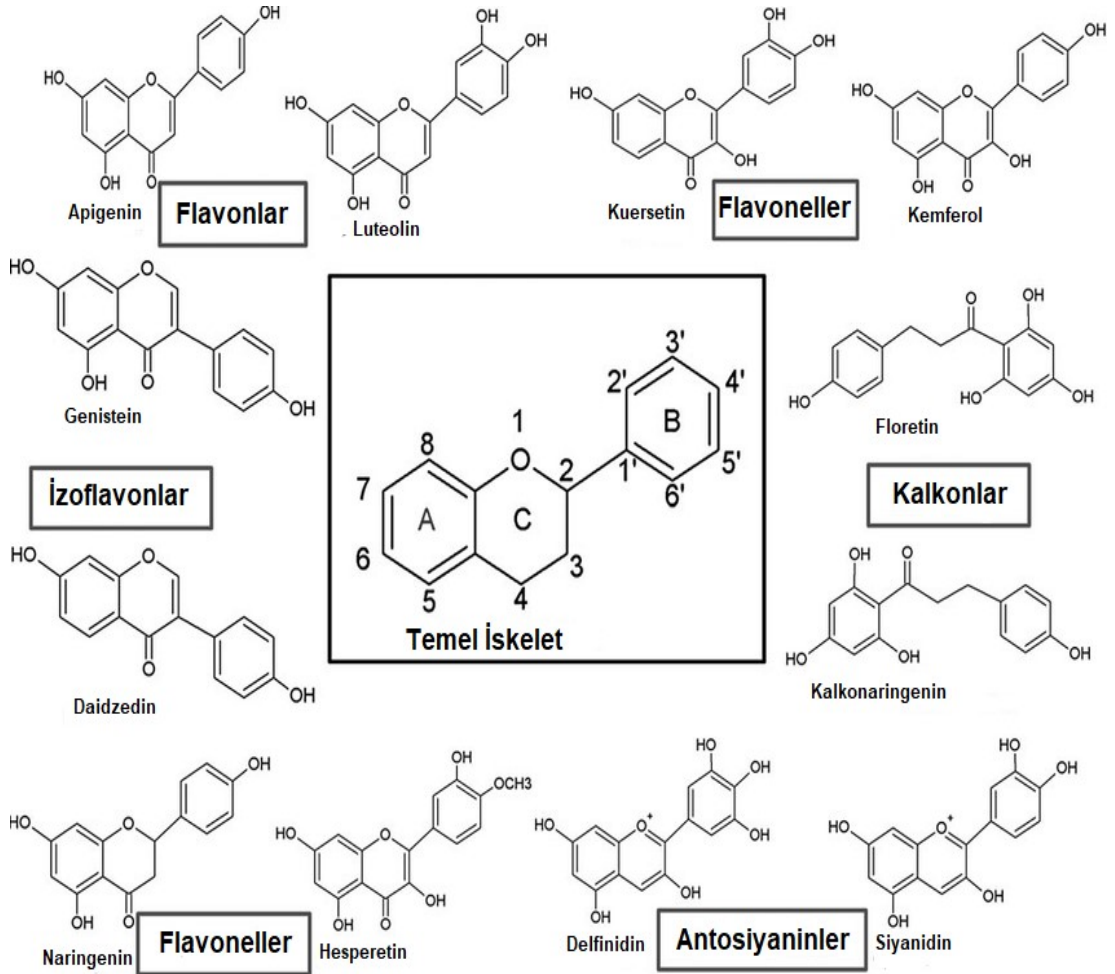
A halkası, glikozun dönüşümleri yoluyla üretilen üç malonil-CoA molekülünden sentezlenirken, B halkası, şikimat yolu yoluyla fenilalanin'den üretilen 4-kumaroil-CoA'dan sentezlenir. A ve B halkalarının yoğunlaşması, daha sonra flavanon oluşturmak üzere izomeraz katalizli siklizasyona uğrayan kalkon üretir. Sonraki bileşik, diğer flavonoidlerin sentezi için başlangıç bileşiği olarak kullanılır. Bilinen tüm flavonoid bileşikler, yaklaşık 7000, bu ortak biyosentetik yola sahiptir ve bu nedenle aynı temel yapısal iskeleti paylaşır. Yapısal farklılıkları nedeniyle flavonoidler temel olarak flavanonlar, flavanoller, flavonlar ve flavonoller gibi farklı gruplara ayrılır. Diğer flavonoid bileşikleri sınıfları arasında izoflavonlar, biflavonoidler, flavonolignanlar, prenilflavonoidler, flavonoid glikozidoesterler, auronlar ve kalkonlar bulunur [146].

Doğada flavonoid bileşikler, bitkilerden elde edilen ürünlerdir ve bitkinin çeşitli yerlerinde bulunurlar. Çizelge 2.4'de diyetle genel olarak bulunan flavonoidler gösterilmiştir [147]. Şekil 2.8'de ise flavonoidlerin sınıfları, alt sınıfları ve doğal kaynakları gösterilmiştir [147]. Şekil 2.9'da flavonoidlerin temel yapıları ve sınıfları gösterilmiştir [148].

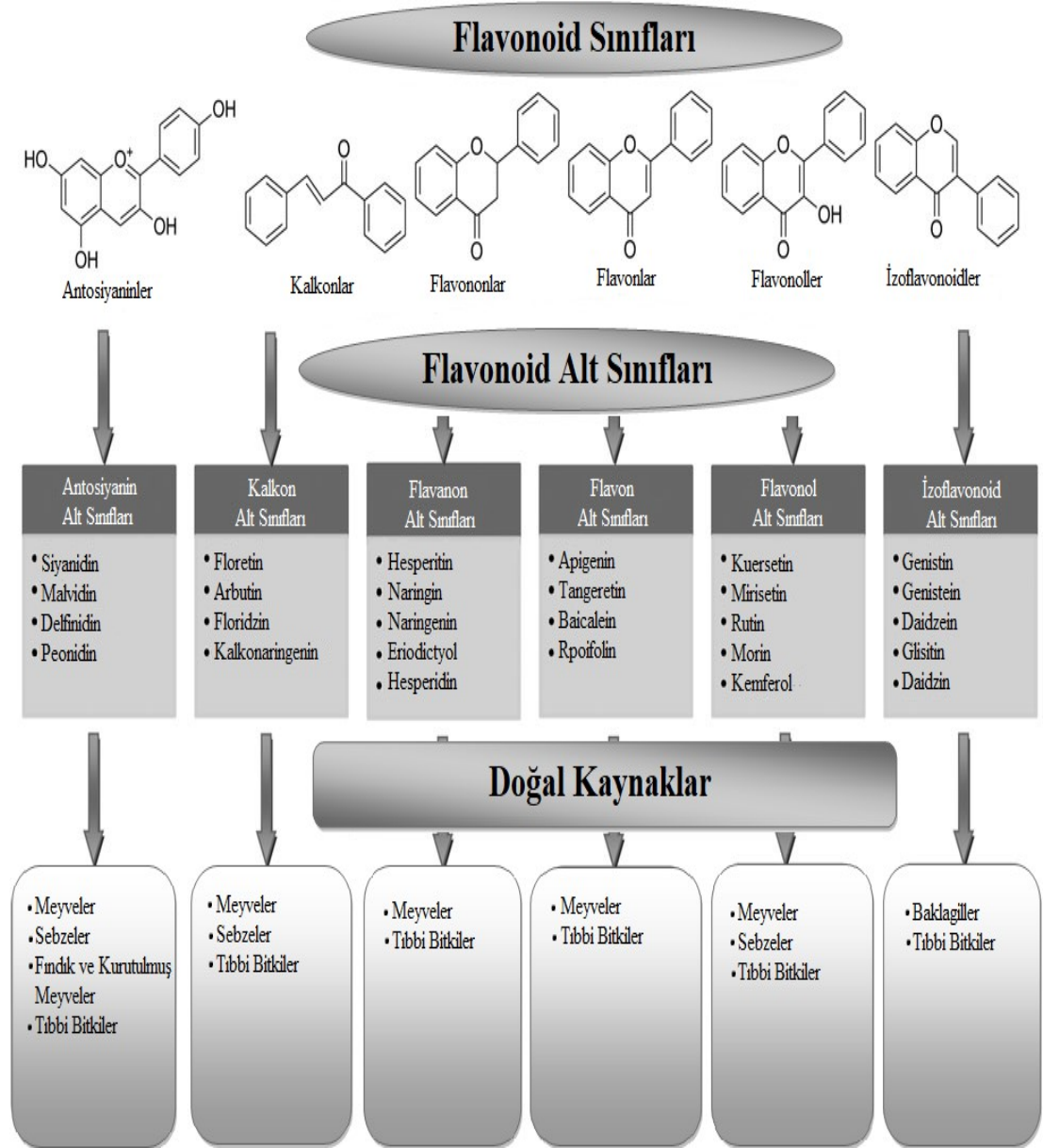


Çizelge 2.4. Diyetle genel olarak bulunan flavonoidler

Sınıf	Bileşik	Besin Kaynakları
Flavonoller	Kemferol, Mirisetin Kuersetin	Soğan, Brokoli, Çay, Elma, Meyveler, Rezene
Flavonlar	Apigenin, Luteolin	Kırmızı Biber, Kekik, Kereviz, Maydanoz
Flavanonlar	Hesperedin, Naringenin	Narenciye, Kuru Erik
Flavan-3-ols	Kateşin, Epikateşin, Teaflavinler	Çay, Elma, Kakao
Antosiyanidinler	Siyanidin, Delfinidin, Malvidin, Pelargonidin	Kiraz, Üzüm
İzoflavonlar	Genistein, Daidzein, Glisitin	Baklagiller, Soya Fasulyesi



Şekil 2.8. Flavonoidlerin temel iskelet yapıları ve sınıfları



Şekil 2.9. Flavonoidlerin sınıfları, alt sınıfları ve doğal kaynakları

## 2.5. MİRİSETİN

Mirisetin (3, 5, 7, 3', 4', 5'-heksahidroksiflavonol) orijinal olarak Myrica rubra ağacının kabuğundan izole edilmiştir. Açık sarı kristallerden oluşan ve metanol, asetonitril, etanol ve diğer polar çözücülerde kolayca çözünen bir polihidroksiflavonol bileşiktir. Meyvelerde, sebzelerde, balda, kırmızı şarapta, çayda ve birçok besinde önemli bir aktif bileşen olarak bulunur [149]. Mirisetin yapısal olarak kuersetin, morin, kaempferol ve fisetin gibi iyi bilinen birkaç fenolik bileşikle benzer özelliktedir. Mirisetin bileşiği, kuersetin ile yapısal benzerliğinden

dolayı hidroksikueretin olarak adlandırılır. Mirisetinin nutrasötik ve antioksidan özellikleri çok değerlidir. Bilimsel kanıtlar, bu bileşiğin anti-inflamatuar, analjezik, antitümör, hepatoprotektif ve antidiyabetik aktiviteler dâhil olmak üzere çeşitli farmakolojik aktiviteler gösterdiğini iddia etmektedir. Bazı çalışmalar mirisetinin, çeşitli DNA polimerazlar, RNA polimerazlar, ters transkriptazlar, telomerazlar, kinazlar ve helikazlara karşı etkinliğini göstermiştir [150].

### **2.5.1. Mirisetinin Meme Kanserine Karşı Etkisi**

Flavonoller arasında mirisetinin kansere karşı etkisi birkaç yıldır araştırma konusu olmuştur ve tümör baskılayıcı olarak yararlı özellikleri hemen hemen ortaya çıkmıştır. Mirisetin ayrıca farklı meme kanseri hücre dizilerinde kemoterapötik molekül olarak test edilmiştir. Üçlü negatif meme kanseri (TNBC), toplam meme kanseri vakalarının %15'ini temsil eder. İnsan TNBC hücre hattı, MDA-MB-231'de, mirisetin, apoptozu indüklenmesiyle hücre büyümesini azalttığı saptanmıştır. Bir başka hücre hattı olan MDA-MB-468'de 50 µM mirisetin konsantrasyonunda ER+, MCF-7 ve insan epitelyal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) büyüme inhibisyonunu sağladığı ve bu etkinin kanser kemoterapisinde kullanılan bir ilaç olan doxorubisine çok benzer bir etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir. MCF-7'de 50 µM mirisetin kullanılarak, telomerazın aşırı eksprese edildiği insan telomeraz revers transkriptaz (TERT) gen ekspresyonunu yaklaşık %90 oranında bastırdığı gözlemlenmiştir. Bu etki mirisetinin, insan TERT gen ekspresyonunu doğrudan kontrol eden bir transkripsiyon faktörü olan c-Myc aktivitesini düzenleyen farklı yollar üzerindeki inhibitör aktivitesiyle bağlantılı olabileceği belirtilmiştir [151].

Mirisetinin meme kanseri hücre büyümesi üzerindeki etkisini değerlendirmek için, TNBC hücre hatlarından MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 üzerinde, ER+, MCF-7 ve HER2'yi aşırı eksprese eden SK-BR-3 hücre hattında, mirisetinin farklı konsantrasyonlarda yokluğunda ve varlığında 24 saat boyunca kültür ortamı oluşturulmuştur. Ardından hücre sayısının bir göstergesi olarak asit fosfataz aktivitesi belirlenmiştir. Mirisetin varlığında test edilen tüm insan meme karsinomu hücre hatları için fosfataz aktivitesi doza bağlı bir azalma ile sonuçlanmıştır. Bu durum meme kanseri hücre büyümesi üzerinde mirisetinin inhibitör etkisini

göstermektedir. Bununla birlikte, SK-BR-3 hücrelerinin mirisetine diğer meme kanseri hücre hatları kadar duyarlı olmadığı belirlenmiştir [152].

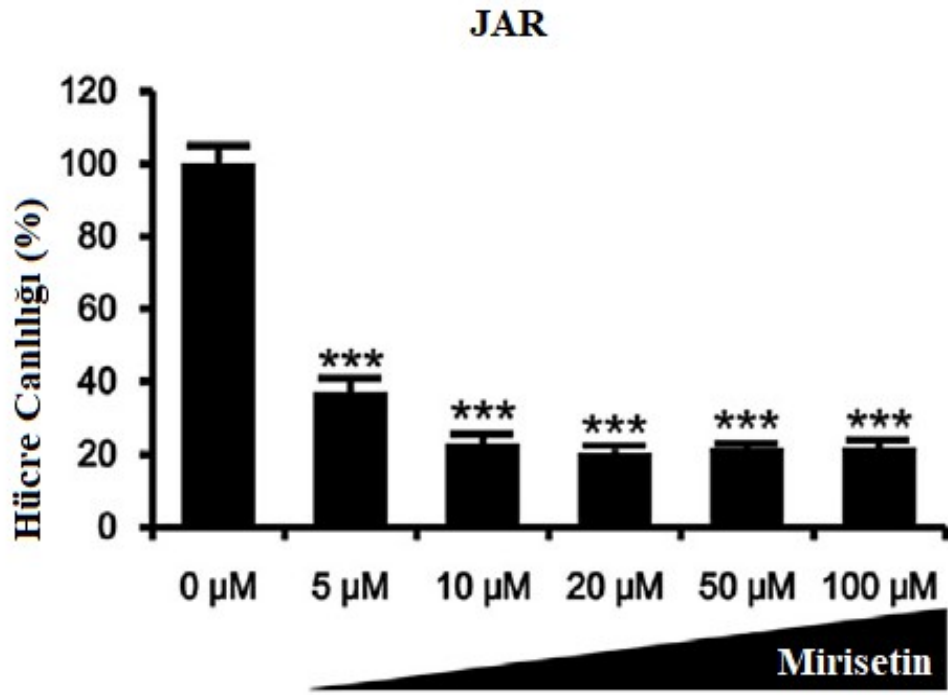
### **2.5.2. Mirisetinin Apoptoza Etkisi**

Çok hücreli organizmalarda dokulardaki hücre sayısı, programlanmış hücre ölümü apoptoz süreci tarafından yakından kontrol edilir. Apoptoz, hücre döngüsünde homeostazi sağlayan hayati bir süreçtir. Bu nedenle, bu süreçteki herhangi bir dengesizlik, kanser dahil olmak üzere çeşitli patolojik duruma yol açmaktadır. Ancak, tümörjenezde genellikle apoptozdan kaçınılır. Kanser hücrelerinin bu kaçışına katkıda bulunan mekanizmalar arasında antiapoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu, proapoptotik proteinlerin düşük ekspresyonu, kaspaz ekspresyonunda azalma, apoptoz inhibitör proteinlerinin (IAP'ler) ekspresyonunda artış ve tümör baskılayıcı proteinlerde işlevsel bozukluk bulunur. Bu nedenle, kanser tedavisinin ana hedefi, apoptoz mekanizmasının restorasyonu ve kanser hücrelerinin eliminasyon ile ortadan kaldırılmasıdır. Mirisetinin birçok kanser hücresi türünde apoptotik hücre ölümünü desteklediği gösterilmiştir [153].

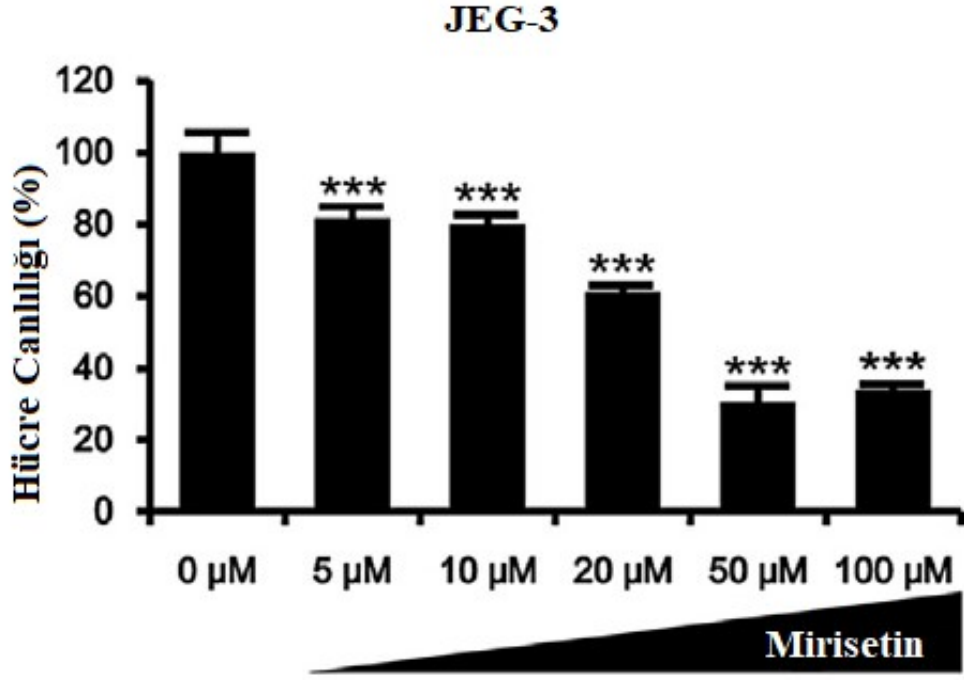
Hepatoselüler karsinom HepG2 hücrelerinde mirisetin, nükleer fragmanlar ve yoğunlaştırılmış kromatin oluşturarak apoptozu önemli derecede indüklemiştir. Mitokondriden sitokrom C'nin serbest bırakılmasını sağlayıp mitokondriyal membran potansiyelini azaltıp apoptozu sağlamıştır. Ek olarak mirisetin, antiapoptotik proteinlerin BCL-2 ve BCL-2 ile ilişkili X proteini (BAX) seviyesini düşürmüştür ve mitokondride proapoptotik proteinin (Bad) ekspresyonunu arttırmıştır. Mirisetinin apoptozu önleyici etkisi proapoptotik proteinin (Bad) fosforilasyonunda önlenmesi ile karakterizedir [154].

Mirisetinin, kadınlarda uterus ve overlerde erkeklerde de testiste yerleşim gösteren maling karakterde kötü prognozla seyreden koryokarsinom hücrelerinde apoptozu indüklediğini gösteren başka bir çalışmada değişen dozlarda mirisetin kullanılarak JAR ve JEG-3 hücrelerinin proliferatif aktivitesi mirisetine yanıt olarak doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmada JAR hücreleri üzerinde 5 mM'de ve JEG-3 hücreleri üzerinde 50 mM'de mirisetin konsantrasyonu,

hayatta kalma oranlarını %50'nin altına düşürdüğü görülmüştür. Yapılan bu çalışmada, mirisetinin iki koryokarsinom hücre hattının (JAR ve JEG-3) proliferasyonunu azalttığını ve ayrıca JAR ve JEG-3 hücrelerinde doza bağlı bir şekilde apoptozu ve düzenlenmiş hücre döngüsü ilerlemesini desteklediğini doğrulanmıştır. Şekil 2.10'da Doz miktarına bağlı olarak mirisetinin JAR hücrelerindeki hücre canlılığı üzerine etkisi ve Şekil 2.11'de ise Doz miktarına bağlı olarak mirisetinin JEG-3 hücrelerindeki hücre canlılığı üzerine etkisi gösterilmiştir [155].



Şekil 2.10. Doz miktarına bağlı olarak mirisetinin JAR hücrelerindeki hücre canlılığı üzerine etkisi



Şekil 2.11. Doz miktarına bağlı olarak mirisetinin JEG-3 hücrelerindeki hücre canlılığı üzerine etkisi

### 2.5.3. Mirisetinin Kemoterapiye Etkisi

Mirisetinin, kanserin ilerlemesi ve proliferasyonunda yer alan anahtar enzimlerin ekspresyonunu düzenleyerek kanser büyümesinin inhibisyonunda yer aldığı bildirilmiştir. Kolon kanseri üzerinde yürütülen bir çalışmada mirisetinin insan kolon kanserinin HCT15 hücre dizilerinde doza bağlı bir şekilde apoptozu indüklediğini bildirilmiştir. Doza bağımlı (5-100 µM) mirisetin varlığı, BAX/BCL-2 oranını arttırmış ve sonuçta apoptotik mekanizmanın devreye girmesine ve sonuç olarak HCT-15 hücrelerinde hücre ölümüne yol açmıştır. Mirisetin, BCL-2 ile ilişkili X Proteini (BAX) gibi apoptotik genleri aktive ederek HCT-15 hücrelerinde sitotoksitesiteyi desteklediği görüşmüştür. Mirisetinin DNA replikasyonu ve onarımı için sorumlu olan bir endonükleaz olan insan fab endonükleaz 1 (hFEN1)'in aktivasyonunu sağladığı belirlenmiştir. Böylece mirisetin kanserli hücrelerin çoğalmasını engelleyici yollarda görev yapmaktadır. Mirisetin'in ayrıca yumurtalık kanseri hücre hatlarında anjiyogenezi baskıladığı da bildirilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* yaklaşımları kullanan bir çalışma, mirisetinin OVCAR-3 hücrelerinde doza bağlı bir şekilde anjiyogenezi inhibe ettiğini göstermiştir. Başka bir yumurtalık kanseri hücre

dizisi SKOV-3'te mirisetin, hücre canlılığını doza bağılı bir şekilde doğrudan etkilemiştir. 40 µg/ml'lik bir dozda mirisetin, endoplazmik retikulum stresinin aktivasyonu ve DNA çift sarmal kırılmaları yoluyla SKOV-3 hücrelerinde apoptozu tetiklemiştir [156].

## BÖLÜM 3

### GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücrelerinin %1 L-glutamin, 100 U/ml penisilin ve 0,1 mg/ml streptomisin ve %10 FBS ile zenginleştirilmiş DMEM besi ortamlarını içeren T-75 yassı şişelerde kültürleri yapılmıştır. Pasaj öncesi yassı şişelerde üreyen hücrelerin ışık mikroskopunda yoğunluğu ve morfolojileri incelendikten sonra, %80-90 konflüent kültür derecesine ulaştıklarında ortalama her 3-4 günde bir pasajları yapılmıştır. Bunun için, eski besi ortamı yassı şişelerden uzaklaştırılarak, hücreler 1x PBS ile yıkandıktan sonra 2x Tripsin-E DTA ile 37°C'de 5-10 dk. muamele edilip, adherent hücrelerin yüzeyden sıyırılması sağlanmıştır. Daha sonra besi ortamı eklenilerek Tripsin nötralize edilmiş ve hücrelerin içinde bulunduğu solüsyon, steril falkon tüplerinde toplanmıştır. Hücre süspansiyonununun 1/10'u yassı şişe içerisine geri transfer edilip besi ortamı (DMEM) ilave edilerek hücre kültürünün devamlılığı sağlanmıştır. Hücreleri içeren yassı şişeler nemli bir inkübatör içerisine yatay pozisyonda yerleştirilmiştir (37°C; 5% CO<sub>2</sub>). Hücrelerin sayımı için hemositometre kullanılmıştır. Hücrelerin kültür şişelerinde gelişimi sırasında görüntüleri alınmıştır. Ayrıca mirisetin ve doxorubisin uygulaması sonrasında da görüntüleri alınmıştır.

#### 3.2. XTT TESTİ

2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2Htetrazolyum-5-karboksanilid (XTT) suda çözünen tetrazolyum tuzlarıdır. Hücre canlılığının spektrofotometrik olarak belirlendiği bu testlerde de uygulama yapılmayan hücrelerin canlılığı %100 kabul edilir ve uygulamanın yapıldığı hücrelerin canlılığı bu hücrelere göre yüzde (%) olarak alınır.



XTT testi ile boyama yönteminin dezavantajları ise; MTT testine göre daha pahalı olması ve ortamın pH'sı, iyon konsantrasyonu (kalsiyum, potasyum, sodyum), çevresel faktörler (nem, ısı) ve hücre sikluslarının süreleri XTT testinin sonucunu etkileyebilir. Ayrıca hücreler XTT testi ile ortalama 2 saat inkübe edilirler; bekletildikleri süre içinde XTT testinin hücre canlılığını ne kadar etkileyebileceği bilinmemektedir.

Mirisetin, doxorubisinin ve kombine uygulamalarının değişen dozlarda MCF-7 hücrelerine uygulanıp zamana ve doza bağımlı olarak hücre canlılığın tespiti ve hücrelerin yüzde ellisinin (%50) yaşadığı dozu bulmak için XTT ile hücre proliferasyon testi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan mirisetin ticari olarak satın alınmıştır. Bu test suda eriyebilen bir bileşik olan XTT (2,3-bis(2-methoxy-4 nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)'yi canlı hücrelerde turuncu renkli formazon bileşenlerine indirgenmesi prensibine göre işlemektedir.

Mirisetin, doxorubisinin ve kombine uygulamalarının sitotoksik etkisi, doz ve zamana bağlı etkisi "Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit (Cat # 20-300-1000-Biological Industries)" ile yapılmıştır. Maddelerimiz çeşitli dozlarda %10 serumlu tam besi ortamında binde bir oranında DMSO içinde çözülmüş ve konsantrasyonları etkisi araştırılmıştır. DMSO oranları binde bir oranında ayarlandığı için DMSO kontrol grubuna ihtiyaç duyulmamıştır. Seçilen konsantrasyon aralığı literatür bilgileri dikkate alınarak belirlenmiştir. Test, kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

MCF-7 hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarında  $2 \times 10^4$ /kuyucuk miktarında ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat beklenmiştir. Mirisetinin 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M'lik çalışma konsantrasyonları ve doxorubicinin 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM 1000 nm'lik %10 serumlu tam besi ortamı ile hazırlanmıştır. Kontrol grubuna tam besi yeri içerisinde etken madde olmaksızın uygulanmıştır. Belirlenen konsantrasyon damadelerin uygulaması sonrasında hücre proliferasyonu "Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit (Cat # 20-300-1000-Biological Industries)" ile saptanmıştır. Aynı zamanda zamana bağımlı etkinin araştırılması amacıyla test işlemi 24 ve 48 saatlerde çalışılmıştır. Bu

saatler sonunda her bir kuyucuğa 100 µL besi ortamı koyulduktan sonra 50 µL aktive edilmiş XTT solüsyonu (49 µL XTT ReagentSolusyonu ve 1 µLAktivatör Solüsyonu) eklenmiştir. Madde eklenmesinden 4 saat sonra çalışılan grupların absorbans değerleri (OD) ELISA cihazında (Multiskan GO, Thermo) 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunmuştur. Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplanarak hücre canlılığı (%) oranları belirlenmiştir.

Ölçülen optik dansite değeri:

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Ölçülen optik dansite değeri}}{\text{Kontrol optik dansite değeri}} \times 100$$

IC50 doz oranı online IC50calculator platformu kullanılarak (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>) belirlenmiştir. IC50 dozları belirlendikten sonra kombine uygulamalara geçilmiş ve hücre canlılık oranları belirlenmiştir.

### 3.2. RNA İZOLASYONU

Gen düzeyinde ekspresyon değerlendirmesi yapabilmek amacıyla kontrol ve doz gruplarında RNA izolasyonuTrizolReagent ile gerçekleştirilmiştir.

- $3 \times 10^6$  hücre olacak şekilde 6'lık well plakalara hücre ekimi,
- Kontrol grubu ve mirisetinin XTT ile tespit edilen dozların uygulaması ve inkübasyonu,
- Hücreler 6'lık kültür kaplarından bir plaka başına 500 µl olacak şekilde Trizol ve scraper kazıyıcı ile hücreler tamamen kaldırılıp, ependorf tüplere (1 ml'lik) transferi (dondurulmuş ise yaklaşık 10 dk çözülmesi için inkübasyon),

- Her bir ependorf tüpe 200 µl kloroform eklenip ve iyice pipetlendikten sonra tekrar oda sıcaklığında 15 dk inkübasyon,
- Soğutmalı santrifüj ile +4°C' de 15.000 g'de 20 dk santrifüj ve renksiz olan üst fazın toplanıp, ayrı ependorf tüplere alınması,
- Toplanan üst fazın üzerine 500 µl izopropanol eklenip, pipetlenmesi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyon,
- +4°C'de 15.000 g'de 30 dk santrifüj
- Peletin üzerine %70'lik etanol konulması ve +4°C'de 12.000 g'de 10 dk santrifüj,
- Süpernatant atılıp, pelet kısa bir süre hava ile kurutulması,
- Pellet 40 µl RNase-DNasefree su ile çözünmesi basamaklarını içerir.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı (Thermo) yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Nanodrop ile RNA örneklerinin ölçülmesi işlemi öncelikle uygun konsantrasyonlarda (cihazın ölçebileceği RNA konsantrasyon aralığı 2-3000 ng/µl'dir) sulandırılan RNA örnekleri, 1µl RNasefree su ile Nanodrop cihaz kaidesi üzerine bir damla halinde pipetlenip ve bilgisayardaki program analizi ile kör alındıktan sonra, 1µl olacak şekilde pipetlenip 230, 260, 280 nm'de okunmuştur.

### **3.3. cDNA SENTEZİ**

cDNA, özel bir enzim olan ters transkriptaz ile mRNA'dan oluşturulur. İlk olarak retrovirüslerden izole edilmiştir. mRNA kalıp olarak kullanılır, ters transkriptaz tek zincirli DNA molekülünü sentezler. Bu molekül de daha sonra çift zincirli DNA'yı sentezlemek için kalıp olarak kullanılır.

İzole edilen total RNA'lerden RT-PCR öncesi, cDNA sentezi AppliedBiosystems High-CapacitycDNAReverseTranscription Kit (ABD, Cat.no: 4368814) ile üretici firmanın belirtmiş olduğu prosedür doğrultusunda 96 well plakalar (AppliedBiosystems™ MicroAmp™ Fast Optical 96-Well ReactionPlate) kullanılarak StepOne Plus Real-Time (AppliedBiosystem, ABD) PCR cihazı ile gerçekleştirildi. cDNA sentez karışım prosedürü total RNA son konsantrasyon 2 µg olacak şekilde ayarlandı. cDNA sentez karışımı Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Karışım hazırlandıktan sonra kit protokolü doğrultusunda, cDNA sentezi için 25°C' de 10 dakika, 37°C' de 120 dakika inkübe edilmiş ve süre sonunda, enzimi inhibe etmek için 85°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar, gruplar arasındaki mRNA ekspresyon değişimini tespit etmek amacıyla Real-Time PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1. cDNA sentez karışımı

	Hacim
Total RNA	Değişken
10X Random Primers	2 µl
25X dNTP Karışımı	0,8 µl
10X RT Tamponu	2 µl
RNAaz içermeyen su	Değişken
MultiScribe™ ReverseTranscritase	1 µl
Son Hacim	20 µl

### 3.4. RT-PCR TESTİ

MCF-7 hücre hattında kontrole göre BAX, BCL-2, MDR1 ve STAT3 genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyonları değişimleri Real-Time PCR (AppliedBiosystem, StepOne Plus Real-Time PCR) ile araştırılmıştır. GAPDH normalizasyon amaçlı housekeeping olarak kullanılmıştır. Genlerin reverse ve forward dizileri Çizelge 3.2.'de verilmiştir. Çalışmamızda AmpliconRealQPlus 2X Master Mixgreen (Cat

No: A325402) kullanılmış ve ilgili SyberGreen Master Mix protokolü uygulanmıştır.

Reaksiyon koşulları her bir kuyucukta 5,5 µl sybergreen, 6,5 µl nükleaz içermeyen su, 2 µl (1Reverse+1 forward) primer ve 1 µl cDNA olacak şekilde 96-kuyucuklu plakada kurulmuş ve plakanın yüzeyi şeffaf yapışkan etiketle (AppliedBiosystems™ 96-Well ReactionPlateseal) kapatılmıştır. StepOne Plus gerçek zamanlı PCR cihazına yüklenen plaka, 1 döngü 95°C’de 15 dakika denatürasyon, 40 döngü olacak şekilde, 95°C’de 15 sn ve 60°C’de 30 sn ve 72°C 30 saniye olacak şekilde olarak amplifiye edilmiştir. Reaksiyona ayrıca 1 döngü Meltingcurve basamağı da eklenmiştir (95°C’de 15 saniye ve 60°C’de 1 dakika).

Çizelge 3.2. Çalışmamızda kullanılan genlere ait forward ve reverse sekans bilgileri

Gen	Forward	Reverse
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
BCL-2	TGCACCTGACGCCCTTCAC	AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG
BAX	TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG	TGTGTCCACGGCGGCAATCATC
STAT3	GGCATTCTGGGAAGTATTGTCG	GGTAGGCGCCTCAGTCGTATC
MDR1	GCTCATCGTTTGTCTACAGTTCGT	ACAATGACTCCATCATCGAAACC

RT-PCR kapsamında STAT3, MDR1, BAX, BCL-2 genlerinin mRNA ekspresyon değişimleri araştırılmıştır. Doxorubisinin IC50 değeri, Mirisetin IC50 değeri ve kombine gruptaki (Doxorubisinin IC50 + Mirisetin IC50 53 µM) gruplarındaki gen ekspresyon değişimleri kontrol grubuna göre karşılaştırılmıştır.

### 3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

RT-PCR ile tespit edilen mRNA ekspresyon değişimi ile elde edilen verilerin analizinde  $\Delta\Delta CT$  metodu kullanılmıştır. Web tabanlı “RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Data Analysis“ (<https://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis->

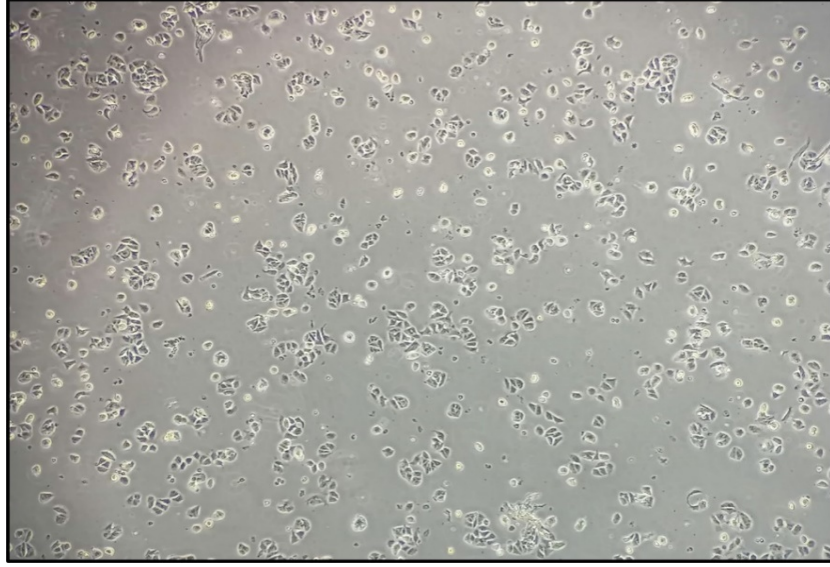
[center-overview-page/](#)) programında ekspresyon değerleri  $\pm 3SD$  karşılaştırılması temeline bağlı olarak analiz edilmiştir ve gruplar arasındaki istatistiksel değişim “Student t-testi” ile karşılaştırılmıştır. Kat değişimi değerleri (Foldchange ve Foldregulation) de  $\Delta\Delta CT$  tabanlı olarak belirlenmiştir.

## BÖLÜM 4

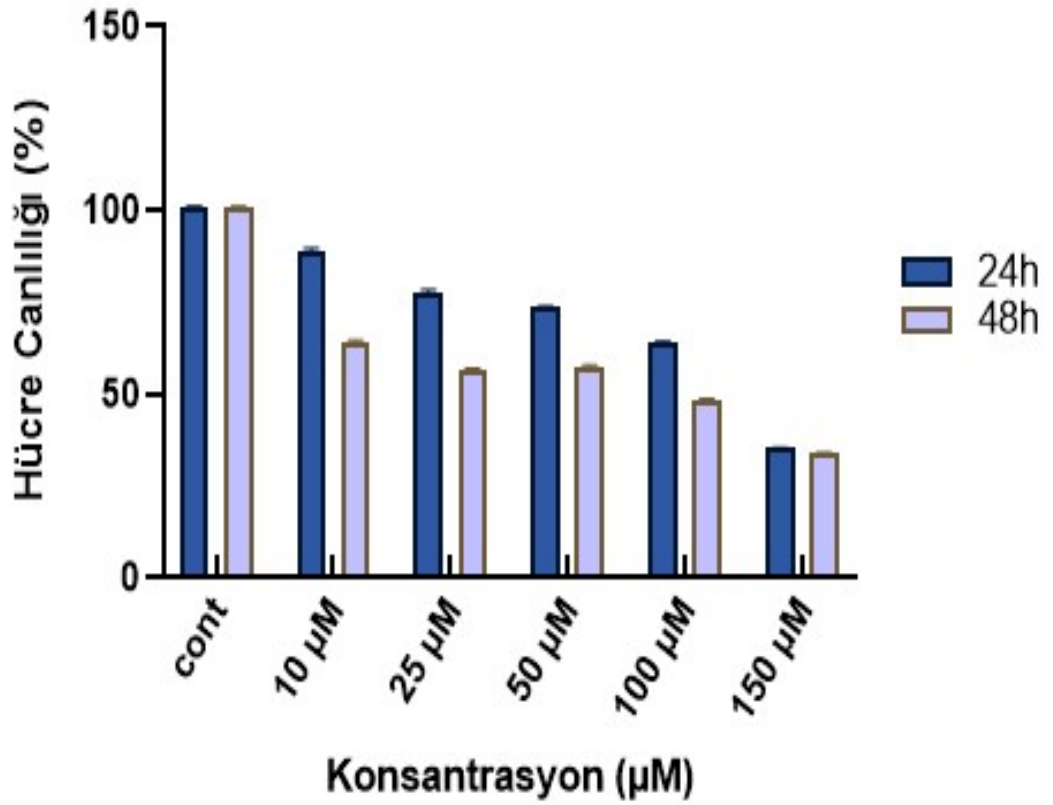
### DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada meme kanseri hücrelerinde mirisetinin kemoterapi duyarlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu araştırma yapılırken mirisetinin, doxorubisinin ve kombine uygulamalarının değişen dozlarda MCF-7 hücrelerine uygulanıp zamana ve doza bağlı olarak hücre canlılığının tespiti ve hücrelerin %50'sinin yaşadığı dozu bulmak için XTT hücre proliferasyon testi kullanılmıştır. Gen düzeyinde ekspresyon değerlendirmesi yapabilmek amacıyla kontrol ve doz gruplarında RNA izolasyonu Trizol Reagent ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı yardımı ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen total RNA'lardan RT-PCR öncesi cDNA sentezi Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit ile 96 well plakalar kullanılarak StepOne Plus Real-Time PCR cihazı ile gerçekleştirilmiştir. MCF-7 hücre hattında kontrole göre BAX, BCL-2, MDR-1 ve STAT3 genlerinin mRNA düzeyindeki ekspresyon değişimleri Real-Time PCR ile araştırılmıştır. RT-PCR ile tespit edilen mRNA ekspresyon değişimi ile elde edilen verilerin analizinde  $\Delta\Delta CT$  metodu kullanılmıştır.

Çalışmamızda mirisetin, doxorubisin ve kombine uygulamalarının değişen dozlarda MCF-7 hücrelerine uygulanmış olup zamana ve doza bağlı hücre canlılığının tespiti amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan MCF-7 hücrelerinin ekim yapılmasını takiben 48 saat sonraki ışık mikroskop görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir. Bu çalışmada mirisetinin 10  $\mu M$ , 25  $\mu M$ , 50  $\mu M$ , 100  $\mu M$ , 150  $\mu M$ 'lik çalışma konsantrasyonları ve doxorubisinin 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM 1000 nM'lik konsantrasyonları %10 serumlu tam besi ortamı ile hazırlanmıştır. Kontrol grubuna tam besi yeri içerisinde etken madde olmaksızın uygulanmıştır.



Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan MCF-7 hücrelerinin 48 saat sonraki ışık mikroskop görüntüsü (4x)

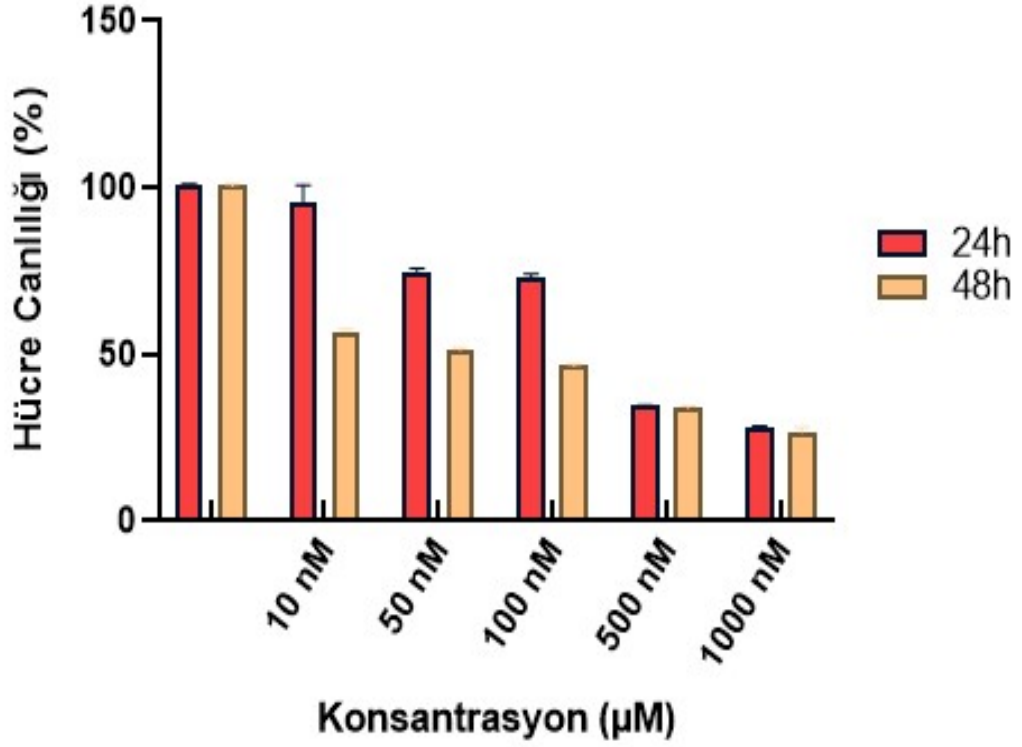


Şekil 4.2. Mirisetinin MCF-7 hücrelerindeki 24 ve 48 saat sonundaki hücre canlılığı üzerine olan etkisi

Mirisetinin MCF-7 hücrelerinde artan doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığı gözlenmiştir. IC50 değeri 24. saat için 141,9 µM, 48.saat için ise 53,3 µM

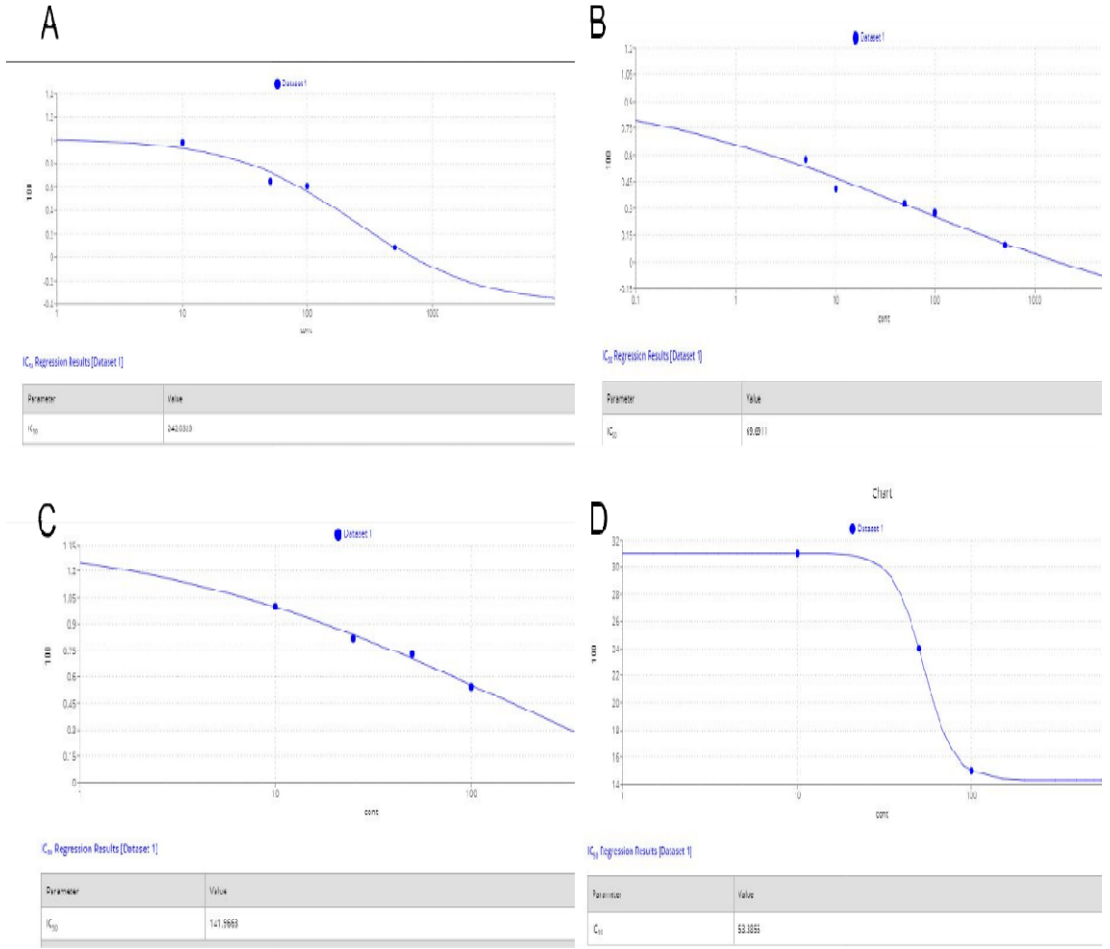


olarak tespit edilmiştir. 48. saatte daha düşük dozda etki gösterdiği için 48. saatteki 53,3  $\mu\text{M}$  doz ve zaman ile çalışmaya devam edilmiştir.



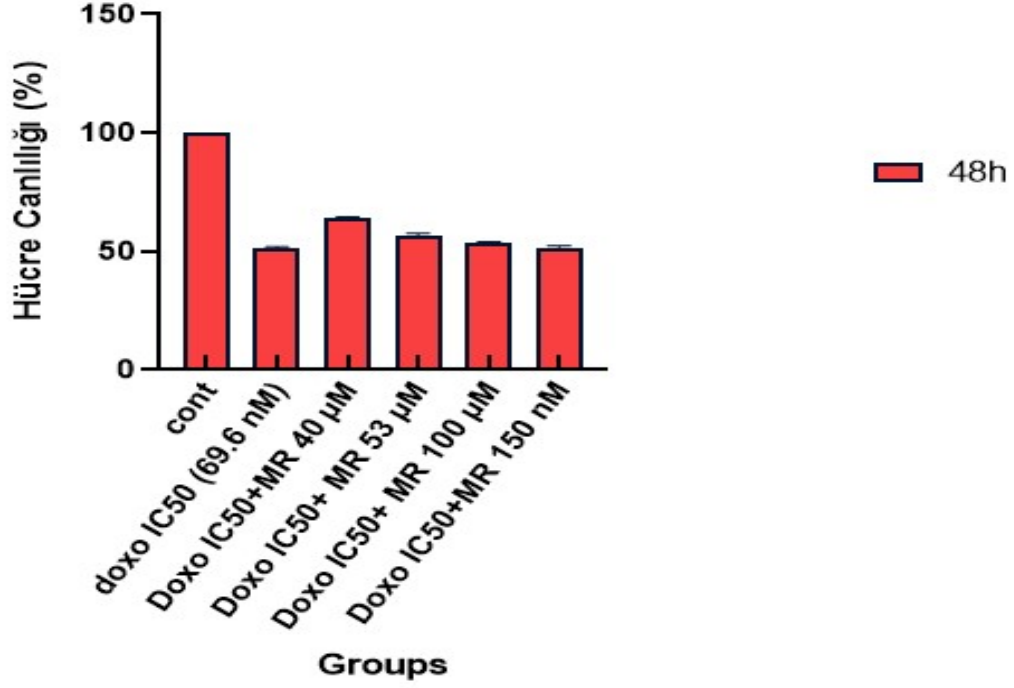
Şekil 4.3. Doxorubisinin MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi

Doxorubisinin MCF-7 hücrelerinde artan doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. IC50 değeri 24 saat için 242,03 nM, 48. saat için ise 69,6 nM olarak tespit edilmiştir. 48. saatte daha düşük dozda etki gösterdiği için 48. saatteki 69,6 nM  $\mu\text{M}$  doz ve zaman ile çalışmaya devam edilmiştir.



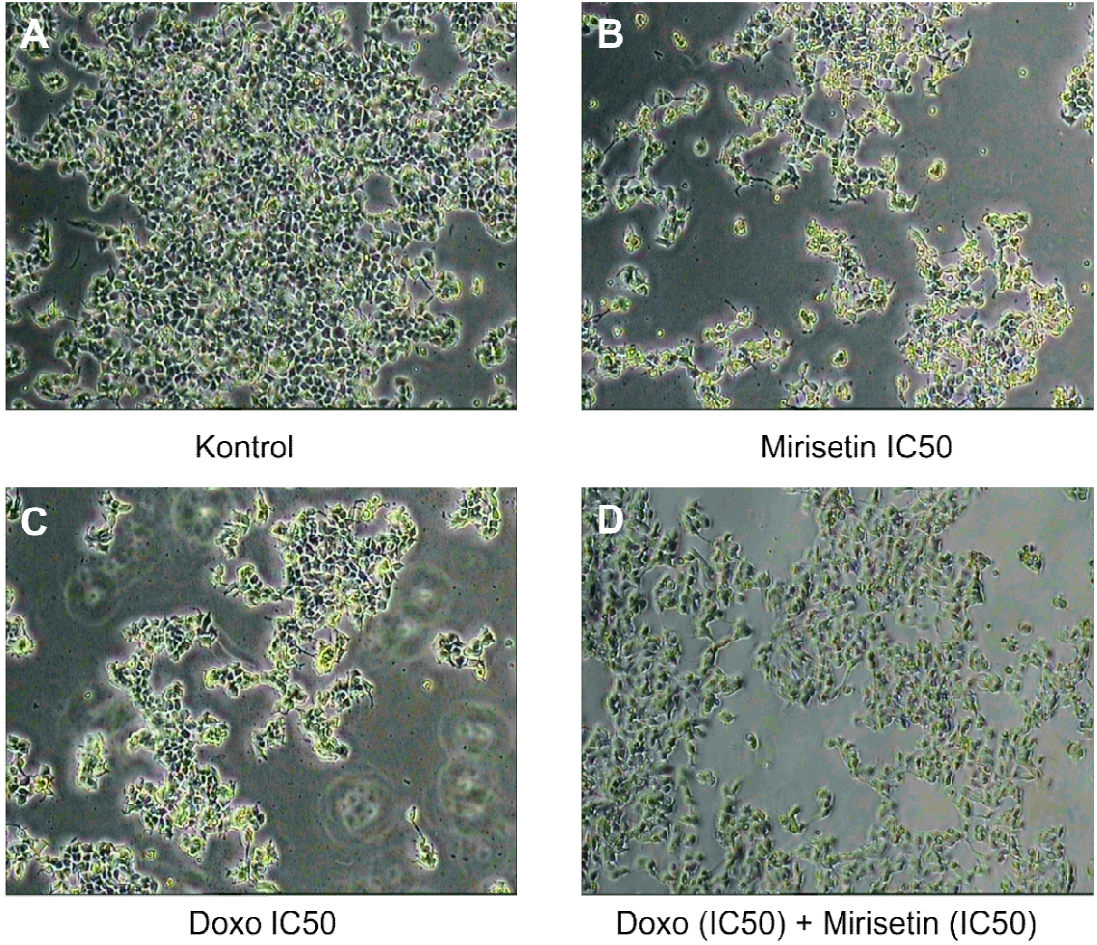
Şekil 4.4. MCF-7 hücrelerinde doxorubisin ve mirisetinin 24 saat ve 48 saatteki IC50 değerlerinin tespit edilmesi. Doxorubisinin 24 ve 48. saat IC50 değerleri sırasıyla 242,0323 nM (A) ve 69,6911 nM (B) ve mirisetinin 24 ve 48. saat IC50 değerleri sırasıyla 141,9663  $\mu$ M (C) ve 53,3855  $\mu$ M (D)

Kombine uygulamalarda, doxorubisinin IC50 69,6 nM dozu ile mirisetinin çeşitli konsantrasyonlarda 48 saat kombine uygulaması ile hücre canlılığının nasıl etkilendiğini belirlemek için XTT testi tekrar yapılmıştır.



Şekil 4.5. Kombine (Doxorubisin IC50 ve Mirisetin dozajları) uygulamaların MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi

Kombine uygulamalarda doxorubisinin IC50 değeri ve mirisetin ile IC50 değerinin altındaki ve üstündeki değerlerde kombine muamelelerde mirisetinin doxorubisin ile sinerjistik etki göstermediği Şekil 4.5’de görülmektedir. Artan mirisetin dozunun doxorubisin etkinliğini değiştirmedığından dolayı kombine grupta her iki maddenin de IC50 (mirisetin 53µM; doxorubisin 69,6 nM) değeri alınarak PCR deneyine kombine grup oluşturulmuştur. Doxorubisin IC50, mirisetin IC50 ve kombine doxorubisin (IC50) ve mirisetin (IC50) uygulanmış MCF-7 hücre deney gruplarının 48. saatteki mikroskop görüntüleri Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



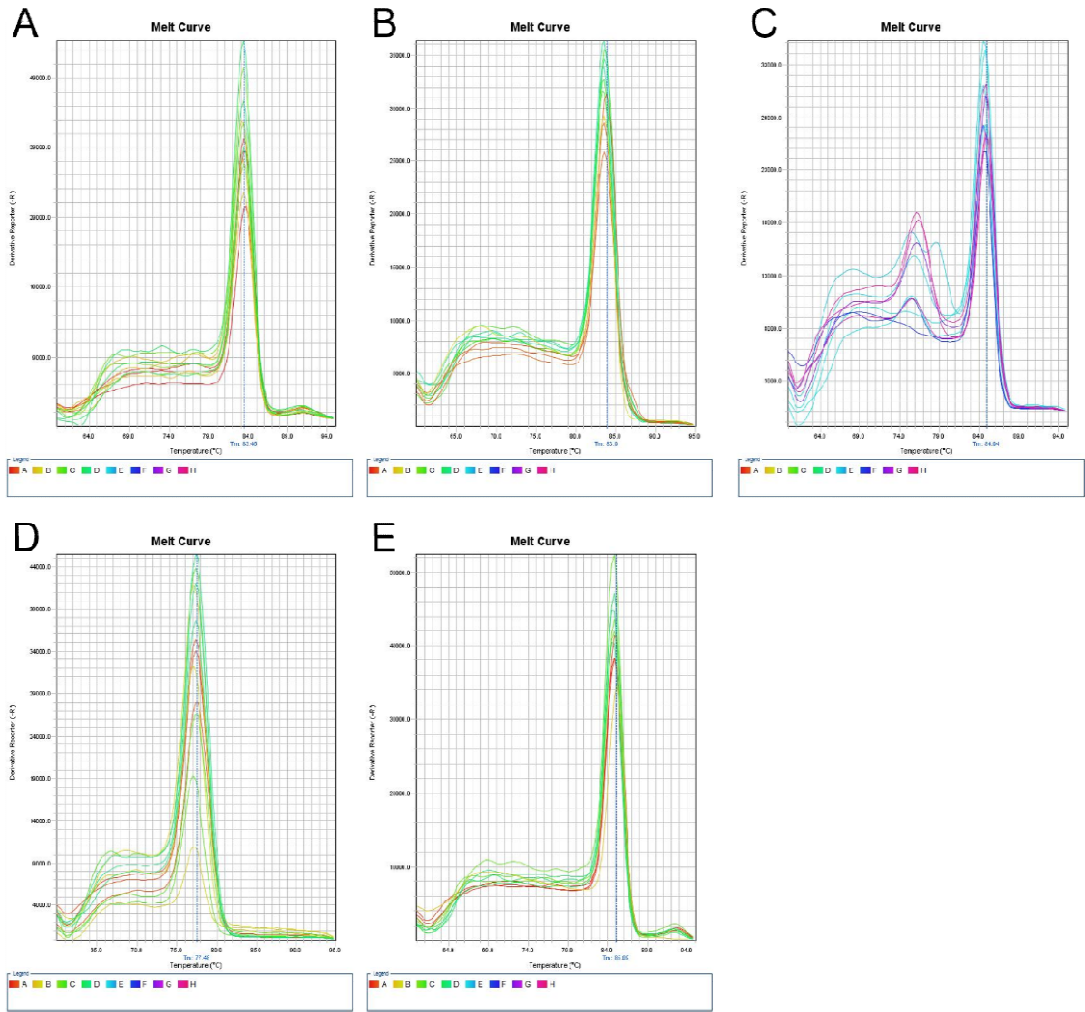
Şekil 4.6. MCF-7 hücrelerinin kontrol (herhangi bir uygulamaya maruz bırakılmamış) (A), mirisetin IC50 değeri 53  $\mu$ M ile muamele edilmiş (B), doxorubisin IC50 değeri 69,6 nM ile muamele edilmiş (C) ve kombine doxorubisin IC50 ve mirisetin IC50 uygulanmış (D) 48. saat 4x mikroskop görüntüleri.

Mirisetin'in değişen dozlara ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerinde etkisi olduğu çalışmamızda görülmüştür. Kemoterapötik ajan doxorubisininde tıpkı mirisetin gibi değişen dozlarda ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azatlığı çalışmamızda tespit edilmiştir. Mirisetin ve doxorubisinin kombine olarak uygulandığı uygulamalarda doxorubisinin etkinliğini arttırıp arttırmadığı incelenmiş ancak elde edilen veriye göre kombine uygulamada doxorubisinin etkinliğinin artmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.1. Doxorubisin IC50, Mirisetin IC50 ve kombine grubun gen ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması

Genler	Doxorubisin IC50		Mirisetin IC50		KOMBINE (DOXO IC50 + MR IC50)	
	Kat Değişimi	P Değeri	Kat Değişimi	P Değeri	Kat Değişimi	P Değeri
<b>BAX</b>	<b>16.9</b>	<b>0.033251</b>	3.00	0.145012	0.13	0.649458
<b>BCL2</b>	0.66	0.932953	0.21	0.084791	0.50	0.709186
<b>STAT3</b>	3.37	0.338456	1.81	0.583510	<b>15.15</b>	<b>0.000695</b>
<b>MDR1</b>	4.64	0.376382	1.51	0.502913	12.70	0.212369

Doxorubicin ve mirisetin IC50 doz konsantrasyonları (sırasıyla 69,6 nM ve 53 µM) tek başlarına uygulandığında ve doxorubisin ve mirisetin kombine uygulandığında belirli gen ifadelerinde yani belirli genlerin mRNA ekspresyonlarındaki değişim Real-Time PCR metoduyla çalışılmış ve kontrol olarak kullanılan GAPDH gen ifadesine göre normalize edilerek  $\Delta\Delta CT$  metodu ile analiz edilmiştir. Çizelge 4.1’de görüleceği gibi doxorubisin tek başına MCF-7 hücrelerine uygulandığında Bax gen ifadesinin 16,9 kat arttığı tespit edilmiştir (p=0.033251). Diğer genlerin (BCL2, STAT3 ve MDR-1) ifadesinde anlamlı bir değişim tespit edilmemiştir. Mirisetin tek başına MCF-7 hücrelerinde uygulandığında BAX ifadesinin 3 kat artmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Diğer genlerin (BCL2, STAT3 ve MDR-1) ifadesinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. MCF-7 hücrelerine Doxorubisin ve mirisetinin IC50 değerleri kombine uygulandığında ise STAT3 gen ifadesinde 15 kat artış gözlenmiş olup, bu artışın ise istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (p=0,000695). Benzer şekilde MDR-1 geninde de 12 kat artış görülse de bu anlamlı bulunmamıştır. Kombine grupta diğer genlerin ifadelerinde (BAX ve BCL-2) de anlamlı bir değişim görülmemiştir. Primerlerin erime eğrileri Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Çalışmada belirli gen ifadelerinin tespiti için kullanılan primerlere ait erime eğrisi analizleri. GAPDH (A), BAX (B), BCL-2 (C), MDR-1 (D) ve STAT3 (E) gen primerlerine ait erime eğrilerinde erime (T<sub>m</sub>) sıcaklıklarının sırasıyla 83,45°C, 83,9°C, 84,94°C, 77,48°C ve 85,09°C olduğu görülmektedir.

Mirisetin antikanser aktivite ile ilişkili olduğu ve türevlerinin telomeraz inhibisyon özelliğine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, mirisetinin intramoleküler telomerik dizisine bağlanmasının, sonuç olarak telomeraz aktivitesinin inhibe edilmesinin, antitümör aktivitesinin makul bir mekanizması olabileceğini bildiren bir çalışmada, insan MCF-7 meme kanseri hücre hattında, TRAP tahlilinde ve Moleküler Dinamik Simülasyonunda artan mirisetin uygulaması üzerine hTERT aktivitesinin azalmasını değerlendirmek için RT PCR bazlı tahlil ile birlikte çeşitli biyofiziksel teknikler yoluyla mirisetinin insan telomerik dizisi ile etkileşimi bildirilmiştir. Sonuç olarak, mirisetinin insan meme adenokarsinomu (MCF-7)

hücrelerinde 24 saatlik tedaviden sonra doza bağlı bir şekilde hTERT ekspresyonunu aktivitesini azalttığı gösterilmiştir [157].

Mirisetin kaynaklı kanser hücresi apoptozunun altında yatan mekanizmalar açıklanmaya devam etmektedir. Mirisetinin mitokondriyal yoldan apoptozu indüklediğini göstermiştir Bununla birlikte apoptoz, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve DNA çift sarmal kırılmaları (DSB'ler) dahil olmak üzere diğer klasik yollarla da indüklenebilir. Mirisetinin apoptozu indüklediğini göstermek amacıyla bu iki klasik apoptotik yolun SKOV3 yumurtalık kanseri hücrelerinde mirisetin kaynaklı hücre ölümüne dahil olup olmadığını göstermek için yapılan bir çalışmanın sonucunda, mirisetin ile tedavinin SKOV3 hücrelerinin canlılığını doza bağlı bir şekilde inhibe ettiğini ortaya koyulmuştur. Söz konusu bu çalışmada SKOV3 hücreleri 24 saat boyunca değişen dozlarda mirisetin ile muamele edilmiştir. Mirisetinin, SKOV3 hücrelerinin canlılığını doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ek olarak, mirisetin tedavisinin ardından SKOV3 hücre morfolojisindeki değişiklikler de belirgin bir şekilde görülmüştür. Mirisetin ile tedavi edilen hücreler, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha yuvarlak ve küçülmüş olduğu belirlenmiştir [158].

Mirisetin insan mesane kanseri hücrelerinde (T24) hem in vitro hem de in vivo potansiyel antikanser aktivitesi inceleyen bir çalışmada insan mesane kanseri T24 hücreleri üzerindeki mirisetin kaynaklı hücre yaşayabilirliğinin etkisi değişen mirisetin konsantrasyonları ile belirlenmiştir. Bu çalışmada hücre canlılığı üzerinde bir etkisi olan en düşük mirisetin konsantrasyonu 48 saat boyunca 20  $\mu\text{M}$ 'dır. Çalışmada 20-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda mirisetin tedavisinden 12 saat sonra hücre canlılığında azalma %2,6 ila %61 arasında değişirken, 24 saat ve 48 saat sonra sırasıyla %2,9 ila %70 ve %3 ila %80 arasında değişmiştir. Bu çalışmada mirisetinin T24 hücrelerinde apoptozu indükleyip indükleyemeyeceğini incelenmiştir. 40 veya 80  $\mu\text{M}$  mirisetin ile muamele edilmiş T24 hücreleri, apoptozun önemli göstergesi olan nükleer parçalanma sergilemiştir. Hücre canlılığının ve morfolojik değişimlerinin mirisetin tarafından inhibisyonu doza ve zamana bağlı olduğu tespit edilmiştir [159].

Mirisetin MDA-Mb-231Br hücre canlılığı, göçü, istilası ve akciğer metastazının fare modelleri üzerindeki etkisini araştırıldığı bir çalışmada, mirisetin ile tedavi edilen fareler, 50 mg/kg mirisetin ile tedaviden sonra kontrol grubu farelerine kıyasla daha küçük tümör nodülleri sergilemiştir. Sonuç olarak mirisetin, bir fare modelinde MMP-2/9 protein ekspresyonunu ve ST6GALNAC5 ekspresyonunu ve ayrıca akciğer metastazını baskılayarak meme kanseri hücrelerinden MDA-Mb-231Br hücrelerinin istilasını önemli ölçüde bloke edebildiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada mirisetinin meme kanseri için potansiyel bir terapötik aday olarak geliştirilmesi gerektiği bildirilmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda (2,5, 5,0, 10,0, 20,0 ve 40,0  $\mu$ M) mirisetin ile 24 ve 48 saat muamele edilen MDA-Mb-231Br hücrelerinin canlılığını ölçen bu çalışmada mirisetinin hücre canlılığını doza bağlı bir şekilde azalttığını göstermektedir. Mirisetin, 20 ve 40  $\mu$ M dozda MDA-Mb-231Br hücrelerinin büyümesini doğrudan inhibe ederken, 0 ila 10  $\mu$ M mirisetin, hücre proliferasyonu üzerinde belirgin sitotoksikite etkisi göstermemiştir. Bu çalışmada mirisetinin *in vivo* antimetastatik potansiyelini değerlendirmek için bir 4T1 fare akciğer metastazı modeli kullanılmıştır. Mirisetin ile tedavi edilen fareler, kontrol grubu farelerine kıyasla 25 ve 50 mg/kg mirisetin ile tedaviden sonra daha az sayıda tümör nodülü sergilemiştir. Mirisetinin meme kanseri metastazını önemli ölçüde azalttığını tespit eden bu çalışmada mirisetin (50 mg/kg) ile tedavinin etkili bir şekilde farelerde meme kanseri akciğer metastazını inhibe ettiği bildirilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada mirisetinin MDA-Mb-231Br hücrelerinin göçünü ve istilasını MMP-2/9 protein ekspresyonunu ve ST6GALNAC5 ekspresyonunu ve ayrıca meme kanserinin akciğer metastazını baskılayarak önemli ölçüde engelleyebileceğini gösterilmiştir [160].

Flavonoidlerin hücre poliferasyon inhibisyonu faktörleri olarak rol oynadığı bilinmektedir. Mirisetinin de dâhil olduğu flavonoid sınıfı üyelerinin antikanser ajan olarak etkileri özellikle kontrolsüz hücre poliferasyonunun baskılanması başta olmak üzere apoptotik yolların kontrol altında tutulmasının sağlanmasından ileri gelmektedir. Mirisetinin meme kanseri hücre hattı MCF-7 üzerine etkilerini gözlemlediğimiz bu çalışmamızda özellikle zamana ve doza bağlı olarak hücre canlılığını azaltma etkileri kanserle ilgili hücre hatlarını baz alan literatürde var olan



çalışmalara benzer şekilde açıkça görülmüştür. Çalışmamızda mirisetin özellikle 48. saatte hücre canlığı üzerinde etkisinin gşl olduğu tespit edilmiştir.

Doxorubisin çok iyi bilinen ve faydalı bir anti-kanser kemoterapi ilacı olmasına rağmen, yan etkileri kullanımını ciddi şekilde kısıtlamaktadır. Ayrıca, kullanılacak doxorubisin dozlarını azaltmak, ilaca bağlı oluşması muhtemel yan etkileri de belirgin şekilde önleyecektir. Çalışmamızda doxorubisinin sitotoksik aktivitesinin, MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde mirisetin ile birlikte tedavide kullanılabilirliğini test ettik. Ancak doxorubisin ve mirisetinin kombine uygulamalarında sitotoksitenin sinerjik bir şekilde artmadığını gözlemledik. Dolayısıyla, mirisetinin, doxorubisinin yan etkilerini azaltabilecek potansiyel bir tedavi olarak kullanılması muhtemel görünmemektedir. Elde ettiğimiz veriler ışığında MCF-7 hücre hattında mirisetinin tespit edilen IC50 değerinin BAX, BCL-2, STAT3, MDR1 genlerinden bazıları için gen ifadelerinde anlamlı değişiklikler sağladığını gözlemledik. Bcl-2 düzeyindeki azalmalar, mitokondriyal bozulmanın aracılık ettiği apoptotik hücre ölümü ile yakından ilişkilidir [161]. Aksine, mitokondride BAX (proapoptotik Bcl-2 ailesinin bir yesi) seviyelerindeki artışlar, apoptotik hücre ölümünün bir göstergesidir [162]. Bu çalışmada, doxorubisinin tek başına uygulanmasının Bcl-2 düzeylerini azatlığını ve BAX düzeylerini arttırdığını gözlemledik (izelge 4.1.). Bu durum doxorubisin tedavisinin, Bcl-2 seviyesini azaltıp BAX'ın mitokondriye translokasyonunu indükleyerek mitokondriyal bütünlüğü bozup hücre ölümüne neden olduğunu düşündürmektedir. Aynı etki mirisetin tek başına uygulandığında ya da kombine uygulamalarda gözlenmemiştir.

Mirisetinin BRCA1-GADD45 yolunu kullanarak MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini uyguladığını gösteren bir çalışmada, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin mirisetin ile tedavisini takiben apoptoz ilişkili genlerin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Çalışmada kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 ve BAX /Bcl-2 oranının ekspresyon seviyeleri ile p53, BRCA1, GADD45 genlerinin ekspresyonu önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir. Bu çalışmada mirisetinin IC50 dozu 54  $\mu$ M olarak tespit edilmiştir. Çalışmada mirisetinin, hem hücre içi hem de hücre dışı yolları harekete geçirerek MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin olduğu ve kaspaz-3, -8 ve -9 genlerinin aşırı ekspresyonunu

sağladığı belirlenmiştir. Bu çalışmanın bulgularına dayanarak mirisetinin, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde apoptozu etkili bir şekilde indüklediği, hem dışsal hem de içsel apoptotik yollara karıştığı, BRCA1-GADD45 yolunu indükleyerek MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin olduğu sonuçlarına varılmıştır. Ayrıca çalışmada, MCF-7 hücrelerinin mirisetin ile muamele edilmesinin ardından BAX geni aşırı eksprese edilirken, Bcl2 ekspresyonu azalarak BAX/Bcl2 oranında bir artışa yol açtığı belirlenmiştir [163]. Bu çalışmanın aksine çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre mirisetinin Bcl-2 ve BAX gen ifadelerinin değişiminde anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Ancak kombine uygulamalarda STAT3 gen ifadesinin anlamlı bir şekilde yükseldiği tespit edilmiştir. STAT3 ifadesinin yükselmiş olması Bax/Bcl-2 apoptotik yolağının inhibe edilmesine neden olmuş olabilir. Ayrıca bizim çalışmaya dahil etmediğimiz kaspaz bağımlı ya da bağımsız diğer apoptotik yolların (death reseptör yolağı, ER stres yolağı gibi) tetiklenmiş olabileceği düşünülmektedir. Doxorubisin ile kombine uygulamalarında özellikle STAT3 üzerindeki etkisi mirisetinin olası sinerjetik etkisinin her gen için benzer olmadığı görüşünü güçlendirmiştir.

STAT3 çok sayıda hücre fonksiyonu düzenleyen pleiotropik bir moleküldür. Tirozin 705 (Tyr705) kalıntısının fosforilasyonu sonucunda STAT3 dimerize olarak çekirdeğe transloke olur ve burada hücre büyümesinde, proliferasyonunda, farklılaşmasında ve hayatta kalmasında rol oynayan özellikle anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu düzenler [164]. STAT3, meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanserde yapısal olarak aktive edilir [165]. Örneğin, IL-6/STAT3 sinyal yolağı, kök hücre benzeri meme kanseri büyümesine katkıda bulunur [166]. Ayrıca STAT3, birkaç mitokondriyal proteinin gen ekspresyonunu azaltarak redoks homeostazını kontrol eder. Bunun sonucunda ise elektron taşıma zincirinin oluşmasını ve aktivitesini azaltır; dolayısıyla da ROS üretimi azalır [167]. ROS seviyelerini düşürüp redoks homeostazını koruyarak, manganez süperoksit dismutaz (Mn-SOD veya SOD2) gibi bazı antioksidan genlerin ekspresyonunu indükler. Bu çalışmada, doxorubisin ve mirisetinin kombine uygulamalarında STAT3 gen ifadesinin anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Doğal polifenol ailesinden çok sayıda bileşik kemoprotektif veya kemopreventif özelliklerini önemli ölçüde kanıtlamıştır. Bunlar arasında bazı moleküller spesifik olarak STAT3'ü hedeflemektedir. Mirisetinin de

direkt olarak STAT3'e bağlanabildiği ve aktivitesini düzenleyebildiği bilinmektedir [168]. Mirisetinin çalışmalarda genel olarak STAT3 aktivitesini inhibe edici özelliğinden bahsedilmiştir [169]. Biz çalışmamızda özellikle kombine uygulamalarda STAT3'ün upregüle olduğunu tespit ettik. Bu da JAK/STAT3/IL-6 yolağındaki upstream ve downstream genlerin (*NF-kB*, *TNF-alfa*, *IL-1β* gibi) ifadelerinin daha detaylı incelenmesi ile daha ileri düzeyde araştırılabilir [170]. Mirisetinin bu etkisinin altında antioksidan özelliğinin bulunması önemli olabilir. Dolayısıyla, MCF-7 hücrelerinde mirisetinin antioksidan aktivitesi test edilerek *SOD*, *GSH*, *iNOS* ve *Cox-2* gibi antioksidan gen ifadelerindeki değişimler analiz edilebilir. Çalışmamız, mirisetinin kanserle ilgili olan gen ifadelerini nasıl etkilediğini tespit etmek amacıyla yapılacak ileri araştırmalara yol gösterici olmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Stratton, M. R., Campbell, P. J. And Futreal, P. A., “The cancer genome”, *Nature*, 458: 719-724 (2009).
2. Vazquez, A., Kamphorst, J. J., Markert, E. K. et al., “Cancer metabolism at a glance”, *Journal of Cell Science*, 129: 3367-3373 (2016).
3. Williams, G. M., “Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment”, *Toxicology*, 166: 3-10 (2001).
4. Luengo, A., Gui, D. Y. And Heiden, M. G. V. “Targeting metabolism for cancer Therapy”, *Cell Chemical Biology*, 24: 1161-1180 (2017).
5. World Health Organization, “Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018”, *IARC Report, Geneva*, 1-3 (2018).
6. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., et al., “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries”, *Cancer Journal for Clinicians*, 68: 394-424 (2018).
7. Bray, F., Jemal, A., Grey, N., et al., “Global cancer transitions according to the human development index (2008-2030): a population-based study”, *Lancet Oncology*, 13: 790-801 (2012).
8. Arem, H. And Loftfield, E., “Cancer epidemiology: A survey of modifiable risk factors for prevention and survivorship”, *American Journal of Lifestyle Medicine*, 12: 200-210 (2018).
9. Torre, L. A., Islami, F., Siegel, R. L., et al., “Global cancer in women: burden and trends”, *American Cancer Society Intramural Research*, 1-41 (2017).
10. Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., et al., “Immunological aspects of cancer chemotherapy”, *Nature Reviews*, 8: 59-73 (2008).
11. Aslan, G., “Tümör immünolojisi”, *Turkish Journal of Immunology*, 15: 7-13 (2010).
12. Alfano, R. R., Das, B. B., Cleary, J., et al., “Light sheds light on cancer-distinguishing malignant tumors from benign tissues and tumors”, *Mediscience Technology Company*, 67: 143-150 (1991).

13. Tuncay, T., “Genç kanser hastalarının hastalık anlatılarının güçlendirme yaklaşımı temelinde analizi”, *Toplum ve Sosyal Hizmet*, 20: 69-87 (2009).
14. Hintistan, S., Pekmezci, H., Nural, N., vd., 30 Mayıs, *Cumhuriyet Hemşirelik Dergisi*, 4 (1): 1-9 (2015).
15. Kutlutürkan, S., Öztürk, E. S., Erdoğan, S. B., vd., 26 Ekim, *Van Tıp Dergisi*, 26 (4): 418-426 (2019).
16. Topal, T., Öter, Ş. ve Korkmaz, A., 30 Eylül, *Genel Tıp Dergisi*, 19 (3): 137-143 (2009).
17. Barbaros, B., Dikmen, M., 4 Aralık, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 31 (4): 177-181 (2015).
18. Özkara, G., Öztürk, O., Aydoğan, H. Y., 20 Mart, *Experimed*, 10 (1): 38-48 (2020).
19. Gökyer, A., Çiçin, İ., Özcan, E., 2 Mart, *Researchgate*, 1-4 (2022).
20. Hanahan, D. and Weinberg, R. A., “Hallmarks of cancer: The next generation”, *Cell*, 144: 646-674 (2011).
21. Yokuş, B., Çakır, D. Ü., *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1 (2): 7-18 (2012).
22. Deniz, E. B., 20 Haziran, *Türkiye Sağlık Okuryazarlığı Dergisi*, 3 (2): 102-111 (2022).
23. Gogola, T. V. and Rosen, J. M., “Modelling breast cancer: one size does not fit all”, *Nature Reviews*, 7: 659-672 (2007).
24. Scully, O. J., Bay, B. H., Yip, G., et al., “Breast cancer metastasis”, *Cancer Genomics & Proteomics*, 9: 311-320 (2012).
25. Açıkgöz, A., Yıldız, E. A., 21 Ocak, *Ergoterapi ve Rehabilitasyon Dergisi*, 5 (1): 45-56 (2017).
26. Jatoi, I., “Breast cancer screening”, *The American Journal of Surgery*, 177: 619-624 (1999).
27. Smith, M. L., Williams, C., “Breast cancer screening and diagnosis”, *National Comprehensive Cancer Network*, 7 (10): 1060-1096 (2009).
28. Warner, E., “Breast cancer screening”, *The New England Journal of Medicine*, 365: 1025-1032 (2011).

29. Wang, D., Khosla, A., Gargeya, R., et al., “Deep learning for identifying metastatic breast cancer”, *Massachusetts Institute Technology*, 1-6 (2016).
30. Harbeck, N., Gnant, M., “Breast cancer”, *Seminar*, 389: 1134-1150 (2017).
31. Winters, S., Martin, C., Murphy, D., et al., “Breast cancer epidemiology, prevention and screening”, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 151: 1-32 (2017).
32. Rojas, K., Stuckey, A., “Breast cancer epidemiology and risk factors”, *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 59 (4): 651-672 (2016).
33. DeSantis, C. E., Ma, J., Gaudet, M. M., et al., “Breast cancer statistics - 2019”, *A Cancer Journal for Clinicians*, 1-14 (2019).
34. Giaquinto, A. N., Sung, H., Miller, K. D., et al., “Breast cancer statistics - 2022”, *A Cancer Journal for Clinicians*, 72: 524-541 (2022).
35. Coughlin, S. S., “Social determinants of breast cancer risk, stage and survival”, *Breast Cancer Research and Treatment*, 177: 537-548 (2019).
36. Ghoncheh, M., Pournamdar, Z., Salehiniya, H., “Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world”, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17: 43-46 (2016).
37. Ghoncheh, M., Hafshejani, A. M., Salehiniya, H., “Incidence and mortality of breast cancer and their relationship to development in Asia”, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16 (14): 6081-6087 (2015).
38. Doğan, N., Toprak, D., “Female breast cancer mortality rates in Turkey”, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15 (18): 7569-7573 (2014).
39. Özmen, V., Özmen, T., Doğru, V., “Breast cancer in Turkey; An analysis of 20.000 patients with breast cancer”, *European Journal of Breast Health*, 15 (3): 141-146 (2019).
40. Aslan, F. E., Gürkan, A., 2007, *Meme Sağlığı Dergisi*, 3 (2): 63-68 (2007).
41. Verma, R., Bowen, R. L., Slater, S. E., et al., “Pathological and epidemiological factors associated with advanced stage at diagnosis of breast cancer”, *British Medical Bulletin*, 103: 129-145 (2012).
42. Lukong, K. E., “Understanding breast cancer – The long and winding road”, *BBA Clinical*, 7: 64-77 (2017).

43. Sonnenschein, C., Soto, A., “Carcinogenesis explained within the context of a theory of organisms”, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 122 (1): 70-76 (2016).
44. Heyden, M. A. G. V. D., Hescheler, J., Mummery, C. L., “Spotlight on stem cells- makes old hearts fresh”, *Cardiovascular Research*, 58: 241-245 (2003).
45. Smalley, M., Piggott, L., Clarkson, R., “Breast cancer stem cells: Obstacles to therapy”, *Cancer Letters*, 338 (1): 57-62 (2013).
46. Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., et al., “Risk factors and preventions of breast cancer”, *International Journal of Biological Sciences*, 13 (11): 1387-1397 (2017).
47. Polyak, K., “Breast cancer: Origins and evolution”, *The Journal of Clinical Investigation*, 117: 3155-3163 (2007).
48. Basse, C., Arock, M., “The increasing roles of epigenetics in breast cancer: Implications for pathogenicity, biomarkers, prevention and treatment”, *International Journal of Cancer*, 1-10 (2014).
49. Lawson, J. C., Blatch, G. L., Edkins, A. L., “Cancer stem cells in breast cancer and metastasis”, *Breast Cancer Research and Treatment*, 118: 241-254 (2009).
50. Sefton, P., 28 November, *JAMA*, 318 (20): 2054 (2017).
51. Cao, A., Huang, L., Shao, Z., “The preventive intervention of hereditary breast cancer”, *Medicine and Biology*, 1026: 41-57 (2017).
52. Maxwell, K. N., Domchek, S. M., “Cancer treatment according to BRCA-1 and BRCA-2 mutations”, *Nature*, 9: 520-528 (2012).
53. Flippini, S. E., Vega, A., “Breast cancer genes: Beyond BRCA-1 and BRCA-2”, *Frontiers in Bioscience*, 18: 1358-1372 (2013).
54. Metcalfe, K. A., Lubinski, J., Gronwald, J., et al., “The risk of breast cancer in BRCA-1 and BRCA-2 mutation carriers without a first – degree relative with breast cancer”, *Clinical Genetics*, 93 (5): 1063-1068 (2018).
55. O’Quigley, J., “Faulty BRCA-1, BRCA-2 genes: How poor is the prognosis?”, *Annals of Epidemiology*, 17: 1047-2797 (2017).
56. Cullinane, C. A., Lubinski, J., Neuhausen, S. L., et al., “Effect of pregnancy as a risk factor for breast cancer in BRCA-1/BRCA-2 mutation carriers”, *International Journal of Cancer*, 117: 988-991 (2005).

57. Schmidt, M. K., Broek, A. J. V. D., Tollenaar, R. A. E. M., et al., "Breast cancer survival of BRCA-1/BRCA-2 mutation carriers in a hospital-based cohort of young women", *Journal of the National Cancer Institute*, 109 (8): 1-10 (2017).
58. Rosen, E. M., Fan, S., Pestell, R. G., et al., "BRCA-1 gene in breast cancer", *Journal of Cellular Physiology*, 196: 19-41 (2003).
59. Ahmed, S., Sami, A., Xiang, J., "HER2-directed therapy: Current treatment options for HER2-positive breast cancer", *Breast Cancer*, 22 (2): 101-116 (2015).
60. Singla, H., Ludhiadch, A., Kaur, R. P., et al., "Recent advances in HER2 positive breast cancer epigenetics: Susceptibility and therapeutic strategies", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 142: 316-327 (2017).
61. Arteaga, C. L., Sliwkowski, M. X., Osborne, C. E., et al., "Treatment of HER2-positive breast cancer: Current status and future perspectives", *Nature*, 9: 16-32 (2012).
62. Witton, C. J., Reeves, J. R., Going, J. J., et al., "Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer", *Journal of Pathology*, 200: 290-297 (2003).
63. Duffy, M. J., Synnott, N. C., Crown, J., "Mutant p53 in breast cancer: Potential as a therapeutic target and biomarker", *Breast Cancer Research and Treatment*, 170 (2): 213-219 (2018).
64. Schon, K., Tischkowitz, M., "Clinical implications of germline mutations in breast cancer: TP53", *Breast Cancer Research and Treatment*, 167: 417-423 (2018).
65. Masciari, S., Dillon, D. A., Rath, M., et al., "Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort", *Breast Cancer Research and Treatment*, 133: 1125-1130 (2012).
66. Valdez, J. M., Nichols, K. E., Kesserwan, C., "Li-Fraumeni syndrome: a paradigm for the understanding of hereditary cancer predisposition", *British Journal of Haematology*, 176 (4): 539-552 (2016).
67. Thomas, C., Gustafsson, J. A., "Estrogen receptor mutations and functional consequences for breast cancer", *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 26 (9): 467-476 (2015).
68. Thomas, C., Gustafsson, J. A., "The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy", *Nature*, 11: 597-608 (2011).



69. Gruvberger, S., Ringner, M., Chen, Y., et al., "Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns", *Cancer Research*, 61: 5979-5984 (2001).
70. Obr, A. E., Edwards, D. P., "The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer", *Molecular and Cellular Endocrinology*, 357: 4-17 (2012).
71. Diep, C. H., Daniel, A. R., Mauro, L. J., et al., "Progesterone action in breast, uterine and ovarian cancers", *Journal of Molecular Endocrinology*, 54 (2): 31-53 (2015).
72. Daniel, A. R., Hagan, C. R., Lange, C. A., "Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer", *Expert Reviews Endocrinology Metabolism*, 6 (3): 359-369 (2011).
73. Proietti, C. J., Cenciarini, M. E., Elizalde, P. V., "Revisiting progesterone receptor (PR) actions in breast cancer: Insights into PR repressive functions", *Steroids*, 133: 75-81 (2017).
74. Brisken, C., "Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight", *Nature*, 13: 385-396 (2013).
75. Takahashi, S., Ito, Y., Hatake, K., et al., "Gene therapy for breast cancer-Review of clinical gene therapy trials for breast cancer and MDR1 gene therapy trial in cancer institute hospital", *Breast Cancer*, 13 (1): 8-15 (2006).
76. Faneyte, I. F., Kristel, P. M. P., Vijver, M. J. V. D., "Determining MDR1/P-Glycoprotein expression in breast cancer", *International Journal of Cancer*, 93: 114-122 (2001).
77. Ieiri, I., "Functional significance of genetic polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2)", *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 27 (1): 85-105 (2012).
78. Taheri, M., Mahjoubi, F., Omranipour, R., "Effect of MDR1 polymorphism on multidrug resistance expression in breast cancer patients", *Genetics and Molecular Research*, 9 (1): 34-40 (2010).
79. Yang, S. X., Lukas, J., Formenti, J. C., et al., "MDR1 gene expression in primary and advanced breast cancer", *Laboratory Investigation*, 79 (3): 271-280 (1999).
80. Gill, P. K., Gescher, A., Gant, T. W., "Regulation of MDR1 promoter activity in human breast carcinoma cells by protein kinase C isozymes  $\alpha$  and  $\mu$ ", *European Journal of Biochemistry*, 268: 4151-4157 (2001).

81. Su, F., Ouyang, N., Zhu, P., et al., "Psychological stress induces chemoresistance in breast cancer by upregulating MDR1", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329: 888-297 (2005).
82. Callagy, G. M., Webber, M. J., Caldas, C., et al., "Meta-analysis confirm BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer", *BMC Cancer*, 8 (153): 1-10 (2008).
83. Thomadaki, H., Talieri, M., Scorilas, A., "Prognostic value of the apoptosis related genes BCL2 and BCL2L12 in breast cancer", *Cancer Letters*, 247: 48-55 (2007).
84. Nahta, R., Esteva, F. J., "Bcl-2 antisense oligonucleotides: A potential novel strategy for the treatment of breast cancer", *Seminars in Oncology*, 30 (5): 143-149 (2003).
85. Hwang, K. T., Woo, J. W., Shin, H. C., et al., "Prognostic influence of BCL2 expression in breast cancer", *International Journal of Cancer*, 131: 1109-1119 (2012).
86. Zhou, M., Liu, Z., Zhao, Y., et al., "MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1)", *The Journal of Biological Chemistry*, 285 (28): 21496-21507 (2010).
87. Crawford, A., Nahta, R., "Targeting BCL-2 in herceptin-resistant breast cancer cell lines", *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 9: 184-190 (2011).
88. Ahmad, A., Banerjee, S., Wang, Z., et al., "Plumbagin-Induced apoptosis of human breast cancer cells is mediated by inactivation of NF-KB and BCL-2", *Journal of Cellular Biochemistry*, 105: 1461-1471 (2008).
89. Yıldırım, İ. H., Azzawri, A. A., Duran, T., "Thymoquinone induces apoptosis via targeting the Bax/BAD and Bcl-2 pathway in breast cancer cells", *Dicle Tip Dergisi*, 46 (3): 411-417 (2019).
90. Er, E., Oliver, L., Cartron, P. F., et al., "Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1757: 1301-1311 (2006).
91. Williams, M. M., Cook, R. S., "Bcl-2 family proteins in breast development and cancer: could Mcl-1 targeting overcome therapeutic resistance?", *Oncotarget*, 6 (6): 3519-3530 (2015).
92. Hu, S., Xu, Y., Meng, L., et al., "Curcumin inhibits proliferation and promotes apoptosis of breast cancer cells", *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16: 1266-1272 (2018).

93. Naresh, A., Long, W., Vidal, G. A., et al., "The ERBB4/HER4 Intracellular domain 4ICD is a BH3-Only protein promoting apoptosis of breast cancer cells", *Cancer Research*, 66: 6412-6421 (2006).
94. Choudhuri, T., Pal, S., Agwarwal, M. L., et al., "Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction", *FEBS Letters*, 512: 334-340 (2002).
95. Reed, J. C., "Bax, apoptosis and breast cancer", *Balancing Cell Life and Death*, 97 (11): 2403-2404 (1996).
96. Xiao, D., Vogel, V., Singh, S. V., "Benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in human breast cancer cells is initiated by reactive oxygen species and regulated by Bax and Bak", *Molecular Cancer Therapeutics*, 5 (11): 2931-2945 (2006).
97. Wagener, C., Bargau, R. C., Daniel, P. T., et al., "Induction of the death-promoting gene Bax- $\alpha$  sensitizes cultured breast cancer cells to drug induced apoptosis", *International Journal of Cancer*, 67: 138-141 (1996).
98. Ma, J., Qin, L., Li, X., "Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer", *Cell Communication and Signaling*, 18: 1-13 (2020).
99. Hsieh, F. C., Cheng, G., Lin, J., "Evaluation of potential Stat3 regulated genes in human breast cancer", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335: 292-299 (2005).
100. Song, H., Wang, R., Wang, S., et al., "A low molecular weight compound discovered through virtual database screening inhibits Stat3 function in breast cancer cells", *PNAS*, 102: 4700-4705 (2005).
101. Lassmann, S., Schuster, I., Walch, A., et al., "STAT3 mRNA and protein expression in colorectal cancer: effects on STAT3 inducible targets linked to cell survival and proliferation", *Journal Clinical of Pathology*, 60: 173-179 (2007).
102. Kettner, N. M., Vijayaraghavan, S., Durak, M. G., et al., "Combined inhibition of STAT3 and DNA repair in palbociclib resistant ER-positive breast cancer", *Clinical Cancer Research*, 25 (13): 3996-4013 (2019).
103. Barrueco, R. R., Yu, J., Cuevas, L. P. S., et al., "Inhibition of the autocrine IL-6-JAK2-STAT3 calprotectin axis as targeted therapy for HR<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup> breast cancers", *Genes & Development*, 29: 1-18 (2015).
104. Gogola, T. V., Rosen, J. M., "Modelling breast cancer: one size does not fit all", *Nature Reviews*, 7: 659-672 (2007).

105. Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., et al., “Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping”, *Journal of Cancer*, 8 (16): 3131-3141 (2017).
106. Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., et al., “Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery”, *Profiling Breast Cancer Lines*, 4 (7): 1-16 (2009).
107. Holliday, D. L., Speirs, V., “Choosing the right cell line for breast cancer research”, *Breast Cancer Research*, 13: 1-7 (2011).
108. Wei, H. C., “Mathematical modeling of tumor growth: the MCF-7 breast cancer cell line”, *Mathematical Biosciences and Engineering*, 16 (6): 6512-6535 (2019).
109. Lee, A. V., Oesterreich, S., Davidson, N. E., “MCF-7 cells changing the course of breast cancer research and care for 45 years”, *Journal of the National Cancer Institute*, 107 (7): 1-4 (2015).
110. Waks, A. G., Winer, E. P., “Breast cancer treatment”, *JAMA*, 321: 288-300 (2019).
111. İnternet: Türkiye Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonu, “Meme Kanserinde Erken Tanı Önemlidir.”, [http://www.kanserleyasamak.org/genel\\_bilgiler.php?content=9#content](http://www.kanserleyasamak.org/genel_bilgiler.php?content=9#content)
112. Hortogbagyi, G. N., “Treatment of breast cancer”, *The New England Journal of Medicine*, 339 (14): 974-984 (1998).
113. Dreizen, S., Daly, T. E., Drane, J. B., et al., “Oral complications of cancer radiotherapy”, *Postgraduate Medicine*, 61 (2): 85-92 (2016).
114. Hassan, M. S. U., Ansari, J., Spooner, D., et al., “Chemotherapy for breast cancer”, *Oncology Reports*, 24: 1121-1131 (2010).
115. Anampa, J., Makower, D., Sparano, J. A., “Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview”, *BMC Medicine*, 13 (195): 1-13 (2015).
116. Rouzier, R., Perou, C. M., Symmans, W. F., et al., “Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy”, *Clinical Cancer Research*, 11 (16): 5678-5685 (2005).
117. O’Shaughnessy, J., “Extending survival with chemotherapy in metastatic breast cancer”, *The Oncologist*, 10: 20-29 (2005).
118. Bergh, J., Jonsson, P. E., Glimelius, B., et al., “A systematic overview of chemotherapy effects in breast cancer”, *Acta Oncologica*, 40: 253-281 (2001).

119. McKnight, J. A., "Principles of Chemotherapy", *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18 (2): 67-72 (2003).
120. Locker, G. Y., "Hormonal therapy of breast cancer", *Cancer Treatment Reviews*, 24: 221-240 (1998).
121. Jones, K. L., Buzdar, A. U., "A review of adjuvant hormonal therapy in breast cancer", *Endocrine Related Cancer*, 11: 391-406 (2004).
122. Rastelli, F., Crispino, S., "Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer", *Tumori*, 94: 370-383 (2008).
123. Dawood, S., Broglio, K., Buzdar, A. U., et al., "Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: An institutional based review", *Journal of Clinical Oncology*, 28 (1): 92-98 (2009).
124. Cicco, P. D., Catani, M. V., Gasperi, V., et al., "Nutrition and breast cancer: A literature review on prevention, treatment and recurrence", *Nutrients*, 11: 1-28 (2019).
125. Giles, E. D., Wellberg, E. A., Astling, D. P., et al., "Obesity and overfeeding affecting both tumor and systemic metabolism activates the progesterone receptor to contribute to postmenopausal breast cancer", *Cancer Research*, 72 (24): 6490-6501 (2012).
126. Fortner, R. T., Katzke, V., Kühn, T., et al., "Obesity and breast cancer", *Cancer Research*, 208: 43-64 (2016).
127. Chajes, V., Romieu, I., "Nutrition and breast cancer", *Maturitas*, 77: 7-11 (2014).
128. Park, E. J., Pezzuto, J. M., "Flavonoids in cancer prevention", *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 12: 836-851 (2012).
129. Nabavi, S. M., Samec, D., Tomczyk, M., et al., "Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering", *Biotechnology Advances*, 38: 1-12 (2018).
130. Shirley, B. W., "Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology", *Plant Physiology*, 126: 485-493 (2001).
131. Lorenzo, C. D., Colombo, F., Biella, S., et al., "Polyphenols and human health: The role of bioavailability", *Nutrients*, 13: 1-30 (2021).

132. Fang, J., “Bioavailability of anthocyanins”, *Drug Metabolism Reviews*, 46 (4): 508-520 (2014).
133. Cassidy, A., Minihane, A. M., “The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids”, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 105 (1): 10-22 (2016).
134. Gonzales, G. B., Smagghe, G., Grootaert, C., et al., “Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: a sequential structure-activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity”, *Drug Metabolism Reviews*, 1-16 (2015).
135. Walle, T., “Flavonoids and isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, metabolism and bioactivity”, *Free Radical Biology & Medicine*, 36 (7): 829-837 (2004).
136. Vizcaino, F. P., Fraga, C. G., “Research trends in flavonoids and health”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 646: 107-112 (2018).
137. Gorlach, S., Fichna, J., Lewandowska, U., “Polyphenols as mitochondria targeted anticancer drugs”, *Cancer Letters*, 366 (2): 141-149 (2015).
138. Neagu, M., Constantin, C., Popescu, I. D., et al., “Inflammation and metabolism in cancer cell – Mitochondria Key Player”, *Frontiers in Oncology*, 9: 1-15 (2019).
139. Ullah, A., Munir, S., Badshah, S., et al., “Important flavonoids and their role as a therapeutic agent”, *Molecules*, 25: 1-39 (2020).
140. Link, A., Balaguer, F., Goel, A., “Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics”, *Biochemical Pharmacology*, 80: 1771-1792 (2010).
141. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., et al., “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 44-84 (2007).
142. Fraga, C. G., Galleano, M., Verstraeten, S. V., et al., “Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols”, *Molecular Aspects of Medicine*, 31: 435-445 (2010).
143. Wong, R. S. Y., “Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment”, *Wong Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30: 1-14 (2011).
144. Abotaleb, M., Samuel, S. M., Varghese, E., et al., “Flavonoids in cancer and apoptosis”, *Cancers*, 11 (28): 1-39 (2019).

145. Garcia, C. R., Quesada, C. S., Gaforio, J. J., “Dietary flavonoids as cancer chemopreventive agents: An updated review of human studies”, *Antioxidants*, 8 (137): 1-23 (2019).
146. Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., et al., “Flavonoids as anticancer agents”, *Nutrients*, 12 (457): 1-24 (2020).
147. Romagnolo, D. F., Selmin, O. I., “Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence”, *Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics*, 31:206-238 (2012).
148. Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. D., “Flavonoids: an overview”, *Journal of Nutritional Science*, 5: 1-15 (2016).
149. Song, X., Tan, L., Wang, M., et al., “Myricetin: A review of the most recent research”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 134: 1-13 (2021).
150. Semwal, D. K., Semwal, D. K., Combrinck, S., et al., “Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities”, *Nutrients*, 8 (90): 1-31 (2016).
151. Felice, M. R., Maugeri, A., Sarro, G. D., et al., “Molecular pathways involved in the anti-cancer activity of flavonols: A focus on myricetin and kaempferol”, *International Journal of Molecular Sciences*, 23: 1-21 (2022).
152. Knickle, A., Fernando, W., Greenshields, A. L., et al., “Myricetin-induced apoptosis of triple-negative breast cancer cells is mediated by the iron-dependent generation of reactive oxygen species from hydrogen peroxide”, *Food and Chemical Toxicology*, 118: 154-167 (2018).
153. Devi, K. P., Rajavel, T., Habtemariam, S., et al., “Molecular mechanisms underlying anticancer effects of myricetin”, *Life Sciences*, 142: 19-25 (2015).
154. Morales, P., Haza, A. I., “Selective apoptotic effects of piceatannol and myricetin in human cancer cells”, *Journal of Applied Toxicology*, 32 (12): 986-993 (2011).
155. Yang, C., Lim, W., Bazer, F. W., et al., “Myricetin suppresses invasion and promotes cell death in human placental choriocarcinoma cells through induction of oxidative stress”, *Cancer Letters*, 399: 10-19 (2017).
156. Javed, Z., Khan, K., Bravo, J. H., et al., “Myricetin: targeting signaling networks in cancer and its implication in chemotherapy”, *Cancer Cell International*, 22 (239): 1-13 (2022).
157. Mondal, S., Jana, J., Sengupta, P., et al., “Myricetin arrests human telomeric G-quadruplex structure: A new mechanistic approach as an anticancer agent”, *Molecular BioSystems*, 12 (8): 2506-2518 (2016).

158. Xu, Y., Xie, Q., Wu, S., et al., “Myricetin induces apoptosis via endoplasmic reticulum stress and DNA double-strand breaks in human ovarian cancer cells”, *Molecular Medicine Reports*, 13: 2094-2100 (2016).
159. Sun, F., Zheng, X. Y., Ye, J., et al., “Potential Anticancer Activity of Myricetin in Human T24 Bladder Cancer Cells Both In Vitro and In Vivo”, *Nutrition and Cancer*, 64 (4): 599-606 (2012).
160. Ci, Y., Zhang, Y., Liu, Y., et al., “Myricetin suppresses breast cancer metastasis through downregulating the activity of matrix metalloproteinase (MMP)-2/9”, *Phytotherapy Research*, 32 (7): 1373-1381 (2018).
161. Martinou, J.C., Youle, R. J., “Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 family Members and Mitochondrial Dynamics”, *Developmental Cell*, 21 (1): 92-101 (2012).
162. Donovan, M., Cotter, T. G., “Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1644: 133-147 (2004).
163. Sajedi, N., Homayoun, M., Mohammadi, F., et al., “Myricetin Exerts its Apoptotic Effects on MCF-7 Breast Cancer Cells through Evoking the BRCA1-GADD45 Pathway”, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 21 (12): 3461-3468 (2020).
164. Kaptein, A., Paillard, V., Saunders, M., “Dominant Negative Stat3 Mutant Inhibits Interleukin-6-induced Jak-STAT Signal Transduction”, *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (11): 5961-5964 (1996).
165. Liu, C. Y., Tseng, L. M., Su, J. C., et al., “Novel sorafenib analogues induce apoptosis through SHP-1 dependent STAT3 inactivation in human breast cancer cells”, *Breast Cancer Research*, 15: 1-14 (2013).
166. Marotta, L. L. C., Almendro, V., Marusyk, A., et al., “The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44+CD24- stem cell-like breast cancer cells in human tumors”, *The Journal of Clinical Investigation*, 121 (7): 2723-2736 (2011).
167. Demaria, M., Giorgi, C., Lebedzinska, M., et al., “A STAT3-mediated metabolic switch is involved in tumour transformation and STAT3 addiction”, *Aging*, 2 (11): 823-843 (2010).
168. Tuponchai, P., Kukongviriyapan, V., Prawan, A., et al., “Myricetin ameliorates cytokine-induced migration and invasion of cholangiocarcinoma cells via suppression of STAT3 pathway”, *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 15 (1): 157-163 (2019).



169. Kumamoto, T., Fujii, M., Hou, D. X., “Myricetin directly targets JAK1 to inhibit cell transformation”, *Cancer Letters*, 275: 17-26 (2009).
170. Wang, F., Song, Z. Y., Qu, X. J., et al., “M10, a novel derivative of Myricetin, prevents ulcerative colitis and colorectal tumor through attenuating robust endoplasmic reticulum stress”, *Carcinogenesis*, 39 (7): 889-899 (2018).

## ÖZGEÇMİŞ

Hediye TEKELİOĞLU ilkokul ve ortaöğretimini Van'da tamamladı. 2011 yılında ise lise öğrenimini Osmaniye ilinde Mehmet Akif Ersoy Lisesi'nde tamamladı. 2016 yılında Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümünü yüksek onur ile bitirdi. Karabük Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda 2019 yılında başlamış olduğu yüksek lisans programını 2022 yılında bitirdi.