ALLİSON PINAR ERONAT

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2019

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

↓

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ; Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

AGRESİF MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA ÇEŞİTLİ POLİFENOLİK BİLEŞENLERİN BİREYSEL VE KOMBİNE ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

ALLİSON PINAR ERONAT

DANIŞMAN
PROF. DR. OĞUZ ÖZTÜRK

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Programında Doktora öğrencisi **Allison Pınar ERONAT** tarafından **Prof. Dr. Oğuz ÖZTÜRK**'ün danışmanlığında hazırlanan "**Agresif Meme Kanseri Hücre Hatlarında Çeşitli Polifenotik Bileşenlerin Bireysel ve Kombine Etkilerinin Moleküler Düzeyde Araştırılması"** başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 24/12/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı
Prof. Dr. İlhan YAYLIM
İ.Ü.Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri (Danışman)
Prof. Dr. Oğuz ÖZTÜRK
İ.Ü.Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri
Prof. Dr. Hülya YILMAZ AYDOĞAN
İ.Ü.Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri
Prof. Dr. Murat KARTAL
Bezmialem V.Üni.Ecz. Fak.
Farmakognozi A.D.

Jüri
Doç. Dr. Tülin ÖZTÜRK
İ.Ü. Cerrahpaşa CTF Patoloji A.D.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Allison Pınar ERONAT

İTHAF

Tezimi desteklerini benden esirgemeyen sevgili Anne ve Baba'ma ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım'a,

Doktora eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, değerli fikirleri ve yönlendirmeleriyle her konuda bana destek olan saygıdeğer hocam İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Oğuz Öztürk'e,

Doktora eğitimim boyunca tez çalışmamın ötesinde her konuda benden desteğini esirgemeyen değerli hocam Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hülya Yılmaz- Aydoğan'a,

Yardımları ve destekleri için anabilim dalımızın tüm değerli öğretim üyelerine,

Hem tez çalışmamın tamamlanmasındaki desteğiyle hem de dostluğuyla her zaman yanımda olan yeri doldurulamaz değerli arkadaşım MSc. Ayşe Begüm Ceviz'e,

Tez çalışmamın tamamlanmasında büyük emekleri olan ve her konuda desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım MSc. Gonca Candan, PhD. Gülçin Özkara, Dr. Öğr. Fatih Seyhan, MSc. Ayça Diren, Dr. Mete Bora Tüzüner ve M.Sc. Funda Pehlivan'a,

Tüm destekleri için sevgili anne ve babama teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 22858

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİİ
ÖZET ..... XVİİ
ABSTRACT ..... XVİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Meme Kanseri 4
2.1.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi 4
2.1.2. Meme Kanseri Alt tipleri 5
2.1.2.1. Luminal Alt tipler 5
2.1.2.2. HER2 Pozitif 6
2.1.2.3. Bazal Benzeri/ triple negatif 7
2.2. Hücre Döngüsü 8
2.2.1. Hücre döngüsü regülatör proteinleri 9
2.2.2. Hücre döngüsü aşamaları 10
2.2.2.1. G1 fazı 10
2.2.2.2. S-fazı 12
2.2.2.3. Replikasyonun tekrarlanmasının önlenmesi 13
2.2.2.4. Replikasyon kontrol noktası 14
2.2.2.5. G2 fazı 15
2.2.2.6. M-fazı 16
2.3. Apoptoz 18
2.3.1. İntrinsik yol 19
2.3.2. Ekstrinsik yol 19

2.4. Polifenolik bileşenler 21
2.4.1. Flavonoidlerin antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri 23
2.4.2. ROS ve kanser gelişimi 24
2.4.3. Flavonoidlerin biyoyararlanımı 26
3. GEREÇ VE YÖNTEM 28
3.1. Gereçler 28
3.1.1. Cihazlar 28
3.1.2. Kimyasal Maddeler 28
3.1.3. Sarf Malzemeleri 28
3.1.4. Çözeltiler 28
3.1.4.1. MDA-MB-231 Medium 28
3.1.4.2. SK-BR-3 Medium 29
3.1.4.3. Dondurma (Stok) Solüsyonu 29
3.1.4.4. Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate Buffered Saline (PBS)) 29
3.1.4.5. ETOH 29
3.1.4.6. Doğal Maddeler 29
3.2. Hücre Kültürü Uygulamaları 29
3.2.1. Hücre Çözme 30
3.2.2. Hücre ekimi 30
3.2.3. Hücre Pasajlama 30
3.2.4. Hücre Stoklama 30
3.2.5. Hücre Sayımı 31
3.3. WST-1 Yöntemi ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi 31
3.4. Annexin V ve 7-AAD Boyaları Kullanılarak Hücrelerin Apoptotik Durumunun Belirlenmesi 32
3.5. Apoptoz ve Hücre Döngüsü Yolaklarındaki Ekspresyon Değişimlerinin Belirlenmesi 32
3.5.1. RNA izolasyonu 32
3.5.2. RNA'ların Spektrofotometrik Ölçümü ve Eşitlenmesi 33
3.5.3. cDNA çevrimi 33
3.5.4. Real Time PCR Uygulamaları 34
3.6. İstatistiksel Analizler 35
4. BULGULAR 36

4.1. WST-1 Bulguları 36
4.1.1. Çeşitli polifenolik maddelerin SK-BR-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri 36
4.1.1.1. Resveratrol uygulaması 36
4.1.1.2. Apigenin uygulaması 37
4.1.1.3. Quercetin uygulaması 38
4.1.1.4. Curcumin Uygulaması 39
4.1.1.5. CAPE uygulaması 40
4.1.2. Çeşitli polifenolik maddelerin MDA-MB-231 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri 41
4.1.2.1. Resveratrol uygulaması 41
4.1.2.2. Apigenin uygulaması 43
4.1.2.3. Quercetin uygulaması 44
4.1.2.4. Curcumin uygulaması 45
4.1.2.5. CAPE uygulaması 46
4.1.3. Polifenol kokteylinin hücre hatları üzerindeki etkisi 47
4.1.3.1. SK-BR-3 hücre hattı üzerindeki etkisi 47
4.1.3.2. MDA-MB-231 hücre hattı üzerine etkisi 48
4.2. Annexin V /7-AAD Apoptoz analizi bulguları 49
4.2.1. SK-BR-3 hücre hattı 49
4.2.2. MDA-MB-231 hücre hattı 51
4.3. PCR Array Bulguları 52
4.3.1. SK-BR-3 hücre hattı 53
4.3.2. MDA-MB-231 hücre hattı 62
5. TARTIŞMA 72
KAYNAKLAR 89
HAM VERİLER 104
FORMLAR 105
ETİK KURUL KARARI 106
PATENT HAKKI İZNİ 107
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 108
ÖZGEÇMİŞ 109

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Neoplazmda hücre döngüsü regülatörleri 17
Tablo 4-1: Resveratrol'ün saatlere göre SK-BR-3 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması 37
Tablo 4-2: Apigenin'in saatlere göre SK-BR-3 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması 38
Tablo 4-3: Quercetin'in saatlere göre SK-BR-3 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması 39
Tablo 4-4: Curcumin'in saatlere göre SK-BR-3 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması 40
Tablo 4-5: CAPE'in saatlere göre SK-BR-3 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması 41
Tablo 4-6: Resveratrol'ün saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması 42
Tablo 4-7: Apigenin'in saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması 43
Tablo 4-8: Quercetin'in saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması 44
Tablo 4-9: Curcumin'in saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması 45
Tablo 4-10: CAPE'in saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması 46
Tablo 4-11: PKnın saatlere göre SKBR3 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması 48
Tablo 4-12: PKnın saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması 49
Tablo 4-13: Farklı dozlarda PK uygulanmış SK-BR-3 hücre hatları apoptoz analizi 50
Tablo 4-14: Farklı dozlarda PK uygulanmış MDA-MB-231 hücre hatları apoptoz analizi 52
Tablo 4-15: SKBR-3 Apoptoz paneli ekspresyon değişimleri 53
Tablo 4-16: SKBR-3 Hücre döngüsü paneli ekspresyon değişimleri 57

Tablo 4-17: MDA-MB-231 Apoptoz paneli ekspresyon değişimleri..... 62
Tablo 4-18: MDA-MB-231 Hücre döngüsü paneli ekspresyon değişimleri..... 67

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Meme kanseri patogenezi, histolojisi ve moleküler alttipleri 8
Şekil 2-2: Hücre döngüsü boyunca görevli Siklin-CDK kompleksleri (Poon, 2016) 10
Şekil 2-3: Restriksiyon noktası regülasyonu 11
Şekil 2-4: S fazı regülasyonu..... 13
Şekil 2-5: Flavonoid alt grupları..... 22
Şekil 4-1: Resveratrol'ün SK-BR-3 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi 36
Şekil 4-2: Apigenin'in SK-BR-3 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi..... 37
Şekil 4-3: Quercetin'in SK-BR-3 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi..... 38
Şekil 4-4: Curcumin'in SK-BR-3 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi..... 39
Şekil 4-5: CAPE'in SK-BR-3 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi..... 40
Şekil 4-6: Resveratrolün'in MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi 42
Şekil 4-7: Apigenin'in MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi..... 43
Şekil 4-8: Quercetin'in MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi..... 44
Şekil 4-9: Curcumin'in MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi..... 45
Şekil 4-10: CAPE'nin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi 46
Şekil 4-11: PKnın SK-BR-3 hücre hattı üzerindeki etkisi..... 47
Şekil 4-12: PKnın MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki etkisi 48
Şekil 4-13: MDA-MB-231 hücre hattında PK apoptoz analizi sonuçları dot plot görüntüleri 50
Şekil 4-14: SK-BR-3 hücre hattında PK apoptoz analizi sonuçlarının kontrol ile karşılaştırılması..... 50
Şekil 4-15: MDA-MB-231 hücre hattında PK apoptoz analizi sonuçları dot plot görüntüler**i** 51
Şekil 4-16: MDA-MB-231 hücre hattında PK apoptoz analizi sonuçlarının kontrol ile karşılaştırılması..... 52
Şekil 5-1: MDA-MB-231 hücre hattında PK uygulaması ile apoptoz yolağında indüklenen ekspresyon değişimleri .....**Error! Bookmark not defined.**
Şekil 5-2: SKBR-3 hücre hattında PK uygulaması ile apoptoz yolağında indüklenen ekspresyon değişimleri .....**Error! Bookmark not defined.**
Şekil 5-3: Hücre döngüsü regülasyonu..... 82

Şekil 5-4: MDA-MB-231 hücre hattında PK uygulaması ile hücre döngüsü yolağında indüklenen ekspresyon değişimleri 84
Şekil 5-5: SKBR-3 hücre hattında PK uygulaması ile hücre döngüsü yolağında indüklenen ekspresyon değişimleri 85

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ER	Östrojen Reseptörü
PR	Progesteron Reseptörü
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
TP53 (P53)	Tümör Proteini 53
GATA 3	Gata Bağlayıcı Protein 3 (Gata Binding Protein 3)
MAP3K1	Mitojen Aktive Protein Kinaz Kinaz Kinaz 1 (Mitogen Activated Protein Kinaz Kinaz Kinaz 1)
MKI67	Proliferasyon Belirteci Ki-67 (Marker Of Proliferation Ki-67)
AURKA	Aurora Kinaz A
HNF-3 ALFA (FOX A1)	Hepatosit Nükleer Faktör 3 Alfa (Forkhead Box Protein A1)
MAPK	Mitojen Aktive Protein Kinaz 1 (Mitogen Activated Protein Kinase)
PI3K	Fosfotidil İnozitol 3 Kinaz
GRB 7	Büyüme Faktör Reseptör Bağlı Protein 7 (Growth Factor Receptor Bound Protein 7)
FOX C1	Forkhead Box Protein C1
ESR1	Östrojen Reseptörü 1
PIK3CA	Fosfotidil İnozitol 4,5 Bifosfat 3 Kinaz Katalitik Ünite Altbirim Alfa
APO BE 3B	Apolipoprotein B Mrna Düzeltici Enzim Katalitik Alt Birim 3b (Apolipoprotein B Mrna Editing Enzyme Catalytic Subunit 3b)
BRCA1	Meme Kanseri Proteini Tip 1 (Breast Cancer Type 1)

PARP	Poli Adp-Riboz Polimeraz 1 (Poly Adp-Ribose Polymerase 1)
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz (Cyclin Dependent Kinase)
APC	Adenomatozis Polipozis Koli (Adenomatosis Polyposis Coli)
CIP/KIP	Siklin bağımlı-CDK inhibitör ailesi, CDK ile etkileleşime giren protein (CDK-interacting protein)
E2f	Elongasyon faktör 2f
Rb	Retinoblastoma proteini
ATM	Ataksi Telenjiektazi Geni (Ataxia Telangiectasia Mutated)
ATR	Ataksi Telenjiektazi Ve Rad3 İlişkili Protein (Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related Protein (ATR))
CHK1	Kontrol Noktası Kinaz Protein 1 (Checkpoint Kinase 1)
MDM2	Mouse Double Minute 2 Homolog
CDC6	Hücre Bölünmesi Kontrol Protein 6 (Cell Division Control Protein 6)
CDT1	Chromatin Licensing And DNA Replication Factor 1
ASK1	Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 (Apoptosis signal regulating kinase 1)
SCF	Skp-Cdc53-F-Box Ubiquitin Ligase Complex (Kök Hücre Faktörü)
GSK-3β	Glikojen Sentaz Kinaz 3β
ORC	Orjin Tanıma Kompleksi (Origin Recognition Complex)
Pre-RC	Replikasyon Başlangıç Kompleksi (Pre-replication Complex)
TOPBP1	DNA Topoizomeraz 2 Bağlayıcı Protein 1
Emi1	Erken Mitotik İnhibitör (Early Mitotic İnhibitör)
Evi5	Eko-Tropik Viral İntegrasyon Bölgesi 5 (Eco Tropic Viral İntegration Site)

Pin1	Peptidil Prolil Cis/Trans İzomeraz NIMA- İlişkili Protein 1
Rab11	Ras İlişkili Protein
Yes	Tirozin Protein Kinaz
YAP	Yes İlişkili Protein 1 (Yes Associated Protein 1)
INCENP	Sentromer Proteini (Inner Centromere Protein)
CPC	Kromozomal Geçiş Kompleksi (Chromosomal Passenger Complex)
PCK	Fosfoenolpiruvat Karboksikinaz
Smac	Mitokondriyal Aktivatör 2 (Second mitochondrial derived activator caspases
AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör (Apoptosis Inducing Factor)
Enfo G	Endonükleaz G
Bid	BCL-2 Etkileşim Domaini
Bax	Bcl-2 İlişkili Protein X
Bak	Bcl-2 Homolog Antagonist
APAF1	Apoptotik Proteaz Aktive Eden Faktör-1
IAP	Apoptoz İnhibe Eden Protein (inhibitor of apoptosis proteins)
AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör
TNF-R1	Tümör Nekroz Faktör Reseptör 1 (TNF-reseptör 1)
FAS/APO1	FAS/Apoptoz antijen-1
DR3	Ölüm Reseptörü 3
DR4	Ölüm Reseptörü 4
DR5	Ölüm Reseptörü 5
DR6	Ölüm Reseptörü 6
TRAIL	Tümör nekroz faktör (TNF) ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand
DD	Ölüm Domaini
FasL/FasR	Fas Ligantı/Fas Resöptörü
TNFα/TNFR-1	Tümör Nekroz Faktör Alfa/Tümör Nekroz Faktör Reseptör 1
APO3L/DR3	Apo3 Ligant/Ölüm Reseptörü 3

FADD	Fas İlişkili Ölüm Domaini
TRADD	TNF-R1 İlişkili Ölüm Domaini
RIP	Ribozom inaktive edici protein/RNA İmmunopresipitasyon
DED	Ölüm efektör domaini
DISC	Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
tBID	Kesilmiş BID (truncated)
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
EGCG	Epigallokateşingallat
NFkβ	Nükleer Faktör Kappa B
MAPK	MAP Kinaz (Mitojen Aktive Protein Kinaz)
ERK	Hücre Dışı Sinyal ile Regüle Kinaz (extracellular-signal-regulated kinase)
FBS	Fetal Bovin Serum
PBS	Fosfat Dengeli Salin Solüsyonu
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
WST-1	Suda çözünen tetrazolyum tuzları-1 (Water soluble tetrazolium salts)
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
7AAD	7-Aminoaktinomisin D

ÖZET

Eronat, A.P. (2019). Agresif meme kanseri hücre hatlarında çeşitli polifenolik bileşenlerin bireysel ve kombine etkilerinin moleküler düzeyde araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul

Kadınlarda en sık görülen kanser tipi olan meme kanserinin en agresif alt tipleri özellikle 45 yaş altı kadınlarda görülmektedir. Bu tiplerde hedefe yönelik tedavi bulunmamakta veya kısa sürede tedaviye direnç gelişmektedir. Tedaviyi zorlaştıran bir diğer etmen ise tümör içi heterojenitesi veya tedaviye cevap olarak tümörün etkinlik gösterdiği yolakları değiştirebilmesidir. Bu nedenle hedefe yönelik tedavi bulunmayan veya tedaviye direnç gösteren farklı tip kanserlerde etkili olabilecek ve yan etki göstermeyecek tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç vardır. Polifenolik bileşikler birçok farklı yolak üzerinden etkinlik gösterebildiğinden ve yan etki göstermediğinden farklı tip agresif tip kanserlerde etkili bir polifenolik madde kokteylinin hazırlanması amaçlanmıştır. Triple negatif meme kanserlerini temsil eden MDA-MB-231 ve ER/PR-HER2+ meme kanserlerini temsil eden SKBR-3 hücre hatlarında çeşitli polifenolik bileşiklerin sitotoksik etkileri farklı saat ve dozlarda uygulanarak WST-1 assay ile belirlenmiş ve bir karışım oluşturulmuştur. Bu karışımın sitotoksik ve apoptotik etkileri de bu hücre hatlarında WST-1 ve Annexin V- 7AAD assayleri ile gösterilmiştir. Polifenolik madde karışımının %20'lik dozunun hücrelerde 0. ve 48. saatlerde hangi apoptotik mekanizmalar ve hücre döngüsünde rol oynayan yolak ve anahtar gen üzerinden indüklediği ise RT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Ekspresyonel değişimler B2M endojen kontrol kullanılarak belirlenmiş ve ardından 0. ve 48. saatlerdeki değişimleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Her iki hücre hattında da hem apoptotik hem de hücre döngüsünde etkili kilit genlerin ekspresyonlarında değişimler gözlemlenmiştir. Uygulanan polifenolik madde karışımının her iki hücre hattında da farklı yolaklar üzerinden etkili olduğu ve uygun polifenolik madde karışımlarının kanser tedavisinde etkin ve/veya tamamlayıcı bir yaklaşım olabileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler : polifenolik bileşikler, meme kanseri, hücre döngüsü, apoptoz, gen ekspresyonu

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 22858

ABSTRACT

Eronat, A.P. (2019). Molecular investigation of the individual and combined effects of polyphenolic components on breast cancer cell lines of aggressive types. PhD thesis. Istanbul.

Breast cancer is the most common cancer of women with the most aggressive subtypes being highly observed among younger women. There may be no targeted therapies available or resistances commonly occur. Another challenge in treatment is intra-tumoral heterogeneity or the ability of tumors substituting the active pathways in order to survive. Therefore, novel therapeutic approaches effective on various subtypes and subtypes unresponsive to therapy without showing adverse effects are essential. Since polyphenolic compounds can impact a wide range of pathways without inducing any side effects, it was aimed to compose a phenolic compound cocktail (PK) effective on different aggressive cancer types. The cytotoxic impacts of various phenolic compounds on triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231 and ER/PR-HER2+ cell line SKBR-3 were investigated in a time and dose dependent manner using WST-1 assay, and a cocktail was composed accordingly. The cytotoxic and apoptotic effects of the PK were demonstrated utilizing WST-1 and Annexin V-7AAD assays. Which apoptotic mechanisms and cell cycle related pathways with the application of the 20% dose of the PK were induced at the 0^{th} and 48^{th} hours was determined utilizing the RT-PCR method. Expressional alterations were calculated using B2M as an endogenous control and the fold changes between the 0^{th} and 48^{th} hours were compared. Expressional alterations in apoptotic and cell cycle related key genes were observed in both cell lines. Applied PK was found effective on both cell lines. Therefore it can be suggested that utilization of appropriate phenolic compound mixtures may be beneficial.

Key Words: Phenolic compounds, breast cancer, cell cycle, apoptosis, gene expression

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 22858

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri kadınlarda kanser kaynaklı ölüm nedenlerinin başında gelmektedir (Bray ve ark., 2018). Tümörün özelliklerini belirleyen yüzey reseptörlerinin ekpresyon seviyeleri ise kullanılacak tedavi yaklaşımında belirleyici rol oynamaktadır. Birçok alt tipiyle multifaktöriyel bir hastalık olan meme kanseri alt türlerinden triple negatif meme kanseri (TNBC), östrojen (ER), progesteron (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin (human epidermal growth factor receptor, (HER2)) ekspresyonlarını göstermediğinden bu adı almaktadır. Bir diğer alt tip ise ER/PR(-), HER2(+) meme kanseridir. Bu iki tip de östrojen ve progesteron reseptörlerini eksprese etmediğinden, hormona duyarlı olmayan meme kanseri alttipleri olarak adlandırılmakta ve agresif özellikleri ile bilinmektedirler. HER2+ tümörlerde, transtuzumab gibi anti-HER2 antikorları kullanılırken triple negatif tümörlerde hedefe yönelik tedaviler bulunmadığından konvensiyonel yöntemler ile tedavi denenmektedir (Khan ve ark., 2012; Schnitt ve ark., 2010). Öte yandan agresif kanser tedavilerinin yan etkileri, ilaca karşı gelişebilen direnç ve terapötik ajanların tümör hücrelerine selektif olarak etki göstermeyişleri de tedavideki zorlukların başında gelmektedir (Wang ve ark., 2017).

Agresif meme kanseri alttipleri olarak adlandırılan HER2+ ve triple negatif meme kanserleri özellikle 45 yaş altı genç kadınlarda görülmektedir (Lee ve Han, 2014; Gabriel ve Domchek, 2010). Kötü prognoz ile ilişkilendirilen bu tiplerde tedavi yaklaşımları ve başarısı da oldukça kısıtlıdır. Ayrıca tümör içinde farklı alt tiplerin bir arada bulunabilmesi, tümör tipinin tedavi süresince değişebilmesi gibi sebepler de birçok alt tipe etki edebilecek ve yan etki göstermeyecek ajanların arayışını doğurmuştur (Hoag, 2015). Bu agresif tiplerde tedavi etkinliğinin geliştirilmesi ihtiyacı ve polifenollerin belirtilen özellikleri birçok araştırmacının dikkatini çekmiş ve bu doğrultuda çeşitli fenolik maddelerin etkisi araştırılmıştır.

Besin kaynaklı ajanlar tek bir biyolojik yanıttansa etkilerini çeşitli yollarla göstermekte olduğundan malign transformasyonu sırasındaki tüm süreçlerde etkili olabilecekleri belirtilmektedir (Sarkar ve ark., 2009). Bazı araştırmacılarca 'birçok zayıf vuruş ile kompleks sistemi şaşırtma' (Agoston ve ark., 2004; Csermely, 2004) hipotezi öne atılmış, pleitropik etkileri nedeniyle polifenollerin meme dokusunda karsinojenik süreç ile savaşabileceği fark edilmiştir (Varinska ve ark., 2015; Yang ve ark., 2009).

Farklı polifenol türlerinin hücreler üzerinde farklı biyolojik etkileri mevcuttur

(Yordi ve ark., 2012). Polifenollerin antioksidan aktiviteleri serbest radikal süpürücü etki, metal yakalama kapasitesi, çeşitli oksidazların inhibisyonu ve antioksidan özellikteki enzimlerin stimülasyonu olarak özetlenebilir (Nijveldt ve ark., 2001). Buna ek olarak, polifenollerin pro-oksidan mekanizmaları ise apoptotik hücre ölümü ilişkili olan mitokondrial disfonksiyona neden olan reaktif oksijen radikalleri oluşumu (Sandoval-Acuna ve ark., 2014) ve oksidatif DNA ile de ilişkilendirilmiştir (Perron ve ark., 2011).

Bitki sekonder metabolitlerini insanoğlu değişken ilaçlar, antibiyotikler ve herbisitler olarak kullanmaktadır (Fantini ve ark., 2015; Crozier ve ark., 2006). Sekonder bitki metabolitlerinin uzun süreli kullanımının kanser, kardiyovasküler hastalıklar, tip II diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar üzerinde olumlu yönde etkinliği olduğu belirlenmiştir (Crozier ve ark., 2006; Manach ve ark., 2004; Lall ve ark., 2015; Li ve ark., 2014). Polifenoller, meyve, sebze, baharat, tahıl, kuruyemiş, çay, kahve veya şarap gibi ürünlerde bulunan ve güçlü antioksidan özellikleri ile fark edilmiş maddelerdir (Fantini ve ark., 2015; Crozier ve ark., 2006; Manach ve ark., 2004).

Bu polifenollerden biri olan curcumin ve türevlerinin meme kanseri hücre hatlarında proliferasyonun inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Rowe ve ark., 2009; Yodkeeree ve ark., 2010; Hua ve ark., 2010). En agresif tip olan triple negative MDA-MB-231 hücre hattında hücre proliferasyonu hücre döngüsü regülatörü siklin D ve NF-κB'nin ekspresyonlarının down regüle ederek gösterdiği, buna ek olarak MMP-1 down regülasyonu ile de metastazı inhibe ettiği görülmüştür (Liu ve ark., 2009). Üzüm çekirdeği ekstraktlarından elde edilen resveratrol de benzer şekilde siklin E ve siklin D1 regulator proteinleri üzerinden hücre döngüsü tutulumuna neden olmaktadır. Ayrıca, tumor supresör genleri p21Cip1/WAF1, p53, pro-apoptotik protein Bax ve apoptotik Kaspaz sinyallerinin up regülasyonu ve Bcl-2, Bcl-XL ve survivin anti apoptotik proteinlerinin down regülasyonu ile apopotozu indüklemektedir (Hayashibara ve ark., 2002; Aggarwal ve ark., 2004; Harikumar ve ark., 2010). Bu mekanizmaların dışında polifenolik maddeler, kanser gelişiminde önemli rol oynayan adhezyon moleküllerinin ekpresyonlarını veya aktivitelerini etkileyerek de göstermektedirler (Nebe ve ark., 2006; Kim ve ark., 2009).

Fitokimyasalların düşük biyoyararlanımları göz önüne alındığında, tek başlarına uygulandıklarında hücrelerde ancak yüksek dozlarda etki göstermesi ancak farklı polifenolik maddenin bir arada uygulanması halinde birçok farklı hücresel yolak

üzerinden etkinlik görüldüğünden kombine uygulamaların hücre proliferasyonunun önlenmesinde düşük dozlarda oldukça etkili olduğu görülmüştür (Ouhtit ve ark., 2013). Bu çalışmaların en güçlü yanı ise bu etkinliklerini kanser hücrelerinde gösterip sağlıklı hücrelerde herhangi bir toksisite göstermemeleridir.

Tez projemizde bu amaçla HER2+ ve triple negatif meme kanseri hücre hatlarında bireysel etkileri gözlemlenen polifenolik maddelerden her iki hücre hattında da etki gösterecek bir polifenol kokteyli oluşturularak ekspresyon seviyesinde etki mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

2.1.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri 2018 yılı GLOBOCAN istatistiklerine göre dünya genelinde kadınlarda 2 milyonun üzerinde yeni vaka ile en sık görülen kanser türü ve kanser ilişkili ölüm sebebi iken tüm kanserler arasında ikinci sıradadır (%11.6) (Bray ve ark., 2018). Meme kanseri normal yaşam beklentisi olan her 8 kadından birinde görülmekle beraber dünya genelinde insidansının ve mortalite oranlarının önümüzdeki 5-10 yılda artması beklenmektedir (Greaney ve ark., 2015). Gelişmekte olan ülkelerde çok daha yüksek olan bu oranların önümüzdeki 15 yılda, %55 daha yüksek insidans ve %58 daha fazla mortaliteye ulaşmasının beklendiği bildirilmiştir (Villarreal-Garza ve ark., 2013). Erken tanı ile mortalite oranları düşmüş olsa da, metastatik kanserlerde ortalama sağkalım oldukça düşüktür (≈ 24 ay) (Greaney ve ark., 2015).

ABD'de her yıl meme kanseri teşhisi alan kadınların %4-5'ini oluşturan 40 yaşın altındaki ortalama 10.000 kadına invazif meme kanseri teşhisi konulmaktadır. Batıda meme kanseri teşhisi alan kadınların <%4'ü 35 yaş altı, Asya'da ise %13'ü 40 yaş altı, %5'i ise 35 yaş altıdır. Bu kadar genç yaşta ortaya çıkan meme kanseri vakaları ileri yaşlarda çıkanlara göre çok daha agresif seyirlidir (Lee ve Han, 2014; Gabriel ve Domchek, 2010). Araştırmalar daha agresif ve invaziv meme kanseri alt tiplerinin genç kadınlarda daha yaygın olduğunu ve hatta daha karmaşık biyolojik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (Kim ve ark., 2011; Ferzoco ve Ruddy, 2015; Verigos ve Magklara, 2015).

Günümüzde meme kanseri tedavisinde cerrahi müdahale, kemoterapi veya radyoterapi çeşitli kombinasyonlarla kullanılmaktadır. Devam eden araştırmalar tedavi yaklaşımlarının daha kişiselleşmesi, yan etkilerin azaltılması ve genel sağkalımın arttırılması yönündedir (Fredholm ve ark., 2009).

Tedaviye direnç hala çok büyük bir problem olarak karşımıza çıkarken araştırmacılar sağkalım oranlarını artırmayı hedeflemektedir. Son yıllarda meme kanseri araştırmalarında oldukça yol kat edilmiş olsa da anlaşılamayan karmaşık tip ve agresif tip meme kanserlerine karşı savaş devam etmektedir (Eisenstein, 2015).

Kanser terapisi alanındaki son gelişmelere rağmen bu alanda ilerlemenin yavaş olduğu görülmektedir. Metastatik hastalarda sınırlı hedefe yönelik tedavi yaklaşımları nedeniyle sağkalımın sadece birkaç ay attırılabildiği görülmektedir. Bunun nedenleri hedefe yönelik tedavilerde mevcut olan ve kazanılan direncin tedavinin antitümör etkisini kısıtlaması ile tümör içindeki ve hastalar arasındaki heterojenitenin değerlendirilmemesidir (Hoag, 2015). Bu nedenle kanser tedavilerinde daha spesifik yaklaşımların geliştirilmesi gerekmektedir.

2.1.2. Meme Kanseri Alt tipleri

Meme kanseri oldukça heterojenik bir moleküler yapıya sahiptir. 2000'li yılların başlangıcında yapılan çalışmalarda meme kanserinin klinik olarak anlamlı en az 4 alt tipi olduğu belirlenmiştir, ancak ileri genetik araştırmalar en az 10 alt tipin olabileceğini belirtmektedir (Perou ve ark., 2000; Sørlie ve ark., 2001; Curtis ve ark., 2012).

Formalin ile fikse edilmiş parafin bloklarda saklanan tümör dokularında genetik testler veya imminohistokimyasal boyamalar ile steroid hormon reseptörleri (östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR)), insan epidermal büyüme faktörü reseptörleri (human epidermal growth factor receptor, HER2) ve Ki67 proliferasyon belirteci düzeyleri belirlenerek alt tiplere karar verilmektedir. Alt tipler bu belirteçlere göre Luminal A, Luminal B, HER2 pozitif veya bazal benzeri olarak adlandırılmaktadır. Uygulanacak sistematik tedaviye de öncelikle bu belirlenen alt tiplere göre karar verilir.

2.1.2.1. Luminal Alt tipler

Luminal A alttipinde hormon reseptörleri pozitif (ER/PR+), HER2 negatif ve proliferasyon düşüktür. Meme kanseri hastalarının %50'den fazlası Luminal A tip tümöre sahiptir. Düşük histolojik evreye ve %80 oranında 5 yıllık sağkalım ile en iyi prognoza sahiptir. (Van Diest ve ark., 2004; Williams ve ark., 2015; Merino Bonilla ve ark., 2017).

Luminal B alt tipinde hormon reseptörleri pozitif (ER/PR+) iken HER2 negatif veya pozitif olabilir, ancak proliferasyon yüksektir. Ortalama insidansı %15 ve 5 yıllık sağkalım oranı %40'tır (Merino Bonilla ve ark., 2017).

Hücre döngüsünün aktif fazlarında nükleusta bulunan bir antijen olan Ki67

klinikte proliferasyon belirteci olarak kullanılır. %10'un altındaki Ki67 değerleri düşük risk, %20-29 arasındaki değerler ise yüksek proliferasyon için minimum değerler olarak kabul edilse de net bir ayrım yapmak güç olabilmektedir (Scholzen ve Gerdes, 2000; Harbeck ve Gnant, 2017). Günlük klinik uygulamalar da Luminal A ve B arasındaki en büyük ayrım Ki67 seviyelerinin belirlenmesi ile gerçekleştirilmektedir.

DNA seviyesinde Luminal A tümörlerde Luminal B tümörlere kıyasla genom boyunca daha düşük sayıda mutasyon, kromozomal kopya sayısı değişimi, TP53 mutasyonu (%13 ve %5) görülürken, benzer oranlarda GATA3 mutasyonu (%14 ve %15) ile daha fazla PIK3CA (%45 ve %29) ve MAP3K1 mutasyonu (%13 ve %5) görülür (Cancer genome atlas, 2012). Luminal A tümörler ile karşılaştırıldığında, Luminal B tümörlerde proliferasyon/hücre döngüsü ilişkili genlerde (ör. MKI67 ve AURKA) daha yüksek ve PR ile hepatosit nükleer faktör 3 alfa (HNF3α, diğer adıyla FOXA1) gibi luminal ilişkili gen veya proteinlerde daha düşük ekspresyon görülür (Kuong ve Loeb, 2013). ER ekspresyonları ise benzerdir (Prat ve ark., 2013). DNA seviyesinde ise bir grup Luminal B tümörlerinin hipermetile olduğu görülmüştür (Cancer genome atlas, 2012). Luminal A tipinde genellikle endokrin terapi uygulanırken (Harbeck ve Gnant, 2017) Luminal B tip endokrin terapiye Luminal A tip tümörlere göre daha az cevap verebilir ve kemoterapiye cevabı değişkendir. Luminal B tip tümörlerin prognozu da Luminal A tipi tümörler kadar iyi değildir.

2.1.2.2. HER2 Pozitif

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörleri (human epidermal growth factor receptors, EGFR'ler veya HER'ler) 1-4 normal dokularda ve bir çok kanser tipinde eksprese edilen tirozin kinaz reseptör ailesi üyesi proteinlerdir. Diğerleri gibi HER2 da bir ekstraselüler ligand bağlama bölgesi, transmembran bölgesi ve intraselüler bölgesi olan bir tirozin kinaz reseptörüdür. Aktif formunda HER2 diğer moleküllerle dimer oluşturarak birçok hücresel yolak üzerinden farklı hücresel fonksiyonları etkileyebilme özelliğini kazanır. Ligand bağlanması ile gerçekleşen dimerizasyon intraselüler bölgedeki tirozin rezidülerinin fosforillenmesini sağlayarak mitojen aktive protein kinaz (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) ve fosfatidilinositol 4,5 bifosfat 3 kinaz (PI3K) gibi meme tümörogenezinde büyük rol oynayan yolakları aktive edebilmektedir (Feng ve ark, 2018).

HER2 pozitif alttipte HER2 yüksek ekspresyonu görülürken hormon reseptörleri negatiftir. HER2 pozitif tip tüm meme kanserlerinin %20'sini oluşturmaktadır. Meme kanseri olan 5600 40 yaş altı kadının dahil edildiği Kaliforniya Kanser Kaydı çalışmasında genç kadınlarda HER2 pozitif tümörlerin daha sık görüldüğü belirlenmiştir (Keegan ve ark., 2012). Bu tip tümöre sahip kişilerde standart tedavi olarak HER2 spesifik bir monoklonal antikor olan Transtuzumab kullanılmaktadır (Lianos ve ark., 2014). Ancak Transtuzumab'ın etkinliğine rağmen hastaların %70'i de novo transtuzumab-dirençlidir ve bu tedaviye cevap veren hastaların da büyük çoğunluğu bir yıl içinde tedaviye direnç geliştirir. Nüks oranları yüksektir ve metastaza meyillidir (Wang ve ark., 2017).

Bu alttipte RNA ve protein seviyesinde HER2 ilişkili ve proliferasyon ilişkili genlerin yüksek (ör. ERBB2/HER2 ve GRB7), luminal ilişkili genlerin (ör. ESR1 ve PGR) ortalama düzeyde ve bazal ilişkili genlerin (keratin 5 ve FOXC1) düşük ekspresyonu görülür. DNA seviyesinde bu tümörler genom boyunca en yüksek sayıda mutasyonu taşır. HER2 pozitif tümörlerin %72'sinde TP53, %39'unda PIK3CA mutasyona uğramıştır ve sıklıkla APOBEC3B ilişkili mutasyonlar taşırlar. Bir sitidin deaminaz alt grubu üyesi olan APOBEC3B, sitozinin urasile dönüştürülmesinden sorumludur ve birçok kanser tipinde mutasyon oluşma sebebi olarak gösterilmektedir (Kuong ve Loeb, 2013).

2.1.2.3. Bazal Benzeri/ triple negatif

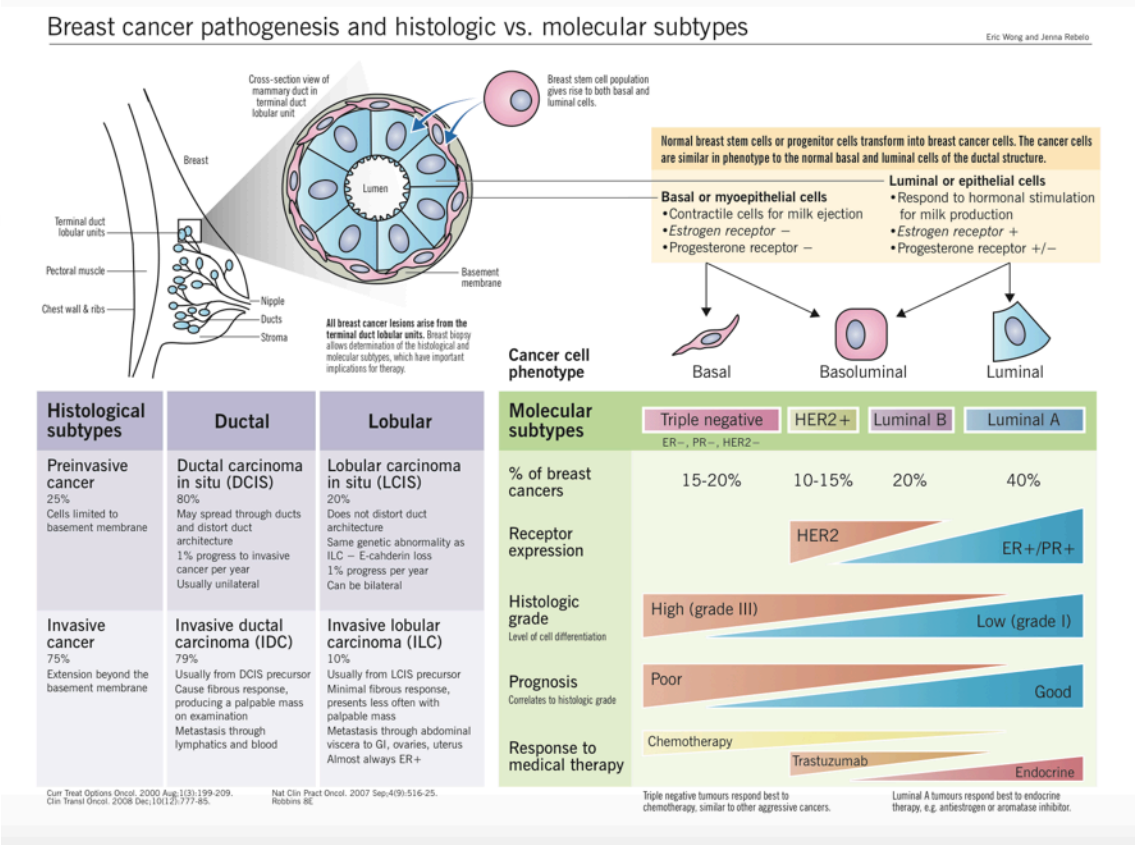
Bu tip hem ER/PR negatif hem de HER2 negatif olduğundan triple negatif olarak da adlandırılır. Meme kanserlerinin %12-17'sini oluşturmasına rağmen agresif yapısı nedeniyle meme kanseri bağlantılı ölümlerin büyük çoğunluğundan sorumludur (Merino Bonilla ve ark., 2017). Tanı sırasında 50 yaş altı olan meme kanseri 3340 kadın üzerine yapılan bir çalışmada, kadınların %7'sinin BRCA1 mutasyonu taşıdığı ve bu kişilerin daha genç ve sıklıkla triple negatif tümörlere sahip olduğu belirlenmiştir (Huzarski ve ark. 2013). BRCA1 mutasyonu bazal benzeri tip ile ilişkilendirilmektedir (Prat ve ark., 2013).

Bazal benzeri alttip proliferasyon ilişkili genlerin (MKI67) ve genellikle derinin bazal katmanı tarafından sentezlenen keratinlerin (keratin 5, 14 ve 17) yüksek, HER-2 ilişkili genlerin ortalama ve luminal ilişkili genlerin çok düşük ekspresyonu görülür. DNA seviyesinde bu tümörler genom boyunca ikinci en yüksek mutasyon oranına

sahiptir. Çoğu hipermetiledir, %80'i TP53 ve %9'u da PIK3CA mutasyonu taşır (Prat ve ark., 2015).

Endokrin tedaviye veya trastuzumab'a cevap vermez. Platin grubu kemoterapiye ve PARP inhibitörlerine duyarlıdır (Eliyatkın ve ark., 2015).

Meme kanseri patogenezi, histolojisi ve moleküler alttipleri Şekil 2-1 'de özetlenmiştir.



Şekil 2-1: Meme kanseri patogenezi, histolojisi ve moleküler alttipleri

(http://www.pathophys.org/breast-cancer/)

2.2. Hücre Döngüsü

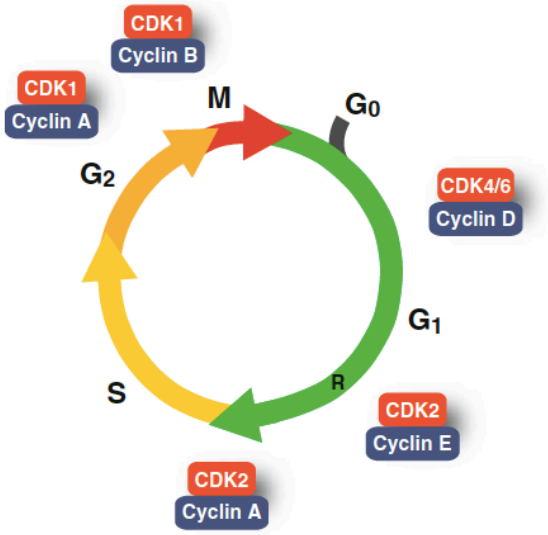
Bir hücrenin çoğalabilmesi, karmaşık bir regülasyon süreci içeren hücre döngüsü ile gerçekleşir. Hücre döngüsü, genomun replikasyonu ve ardından gelen genetik replikanın yavru hücrelere dağıtılmasını koordine eder. Böylece hücreler logaritmik olarak çoğalabilir. Hücre kültürü çalışmaları, kanserde sıklıkla kontrol noktalarında meydana gelen mutasyonlardan kaynaklı bozulan hücre döngüsünün

araştırılması için model sistem oluşturulmasına olanak sağlamıştır.

Hücreler G0 adı verilen durgun hallerinden çeşitli uyaranlarla aktif hale geçtiklerinde hücre döngüsüne katılırlar. Hücre döngüsü sırasıyla meydana gelen dört ana fazdan oluşur. Bunlar DNA sentezi ön hazırlığını yapıldığı G1 fazı, DNA replikasyonun yapıldığı S fazı, hücrenin bölünmeye hazırlandığı G2 fazı, kromozomların yoğunlaşıp mitozun gerçekleştiği M fazı (profaz, metafaz, anafaz ve telofaz) dır (Lodish ve ark., 2008).

2.2.1. Hücre döngüsü regülatör proteinleri

Regülatör proteinler tarafından kontrol edilen kontrol noktalarında, DNA sentezi ve mitozun gerçekleşebilmesi için tüm gerekliliklerin sağlandığı belirlenene kadar S ve M fazlarına giriş engellenir. Hücre döngüsünün regülasyonunda protein fosforilasyonu ve ubiquitin-aracılı degradasyon olmak üzere iki major mekanizma etkindir. Regülatör proteinler siklinler, siklin-bağımlı kinazlar (CDK) ve CDK inhibitörleri olmak üzere 3 molekül sınıfıdır. Siklinler regülatör uniteler, CDKlar ise katalitör ünitelerdir ve fonksiyon gösterebilmeleri için etkileşim içinde olmaları gerekir. Hücrelerin her fazda ilerleyişine karar veren Siklin-CDK kompleksleri ise G1 ortasında siklin D-CDK4 ve 6, G1 sonlarında siklin E-CDK2, S fazında siklin A-CDK2, G2'de siklin A-CDK1 ve M fazında ise siklin B-CDK1'dir (Şekil 2-2). Hücrenin S veya M fazından çıkabilmesi için siklinlerin anafaz uyarıcı kompleks (anaphase promoting complex, APC) aktivitesi ile degrade olmaları gerekmektedir (Lodish ve ark., 2008).



Şekil 2-2: Hücre döngüsü boyunca görevli Siklin-CDK kompleksleri (Poon, 2016)

CDK inhibitörleri ağırlıklı olarak G1'de etkinlik gösterir. cip/kip (CDK etkileşimli protein/ kinaz inhibitörü protein)(CDK interacting protein/ Kinase inhibitory protein) ailesi ve INK4a/ARF (Kinaz4 inhibitörü/alternatif okuma çerçevesi) (Inhibitor of Kinase4/Alternative Reading Frame) ailesi olmak üzere iki ana protein ailesinin üyeleridirler. p21, p27 ve p57 genleri cip/kip ailesinde yer alır. CDK4 ve p19ARF'a bağlanan ve p53'te degredasyonunu engelleyen ve böylece p21'in devamlılığını sağlayan p16INK4a ise INK4a/ARF ailesindendir (Heber-katz et al , 2012).

2.2.2. Hücre döngüsü aşamaları

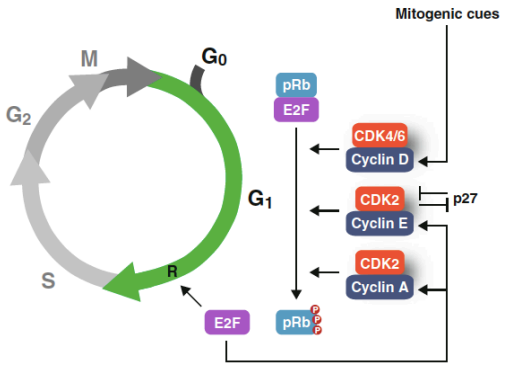
2.2.2.1. G1 fazı

Büyüme faktörleri hücrelere öncelikli olarak G0 ve G1 fazlarında etki ederler. Hücrelerin artık büyüme faktörü uyaranlarının çekilmesine cevap vermediği G1 fazındaki noktaya restriksiyon noktası denir. Büyüme faktörleri hücrenin durağan olduğu G0'dan hücre döngüsüne katılması için hücreleri indükler. G1'in erken evrelerinde büyüme faktörlerinin yokluğu hücrenin tekrar G0'a dönmesine sebep olur. Ancak G1'in ileri fazlarında hücreler restriksyion noktasını geçtiyse hücreler büyüme faktörlerinin yokluğuna rağmen S fazına devam eder. Bu nedenle hücrelerin hücre döngüsüne girmeye kararlı olduğu nokta restriksiyon noktasıdır (Morgan ve Pledger,

1989).

Bu büyüme faktörleri, önceden var olan transkripsiyon faktörlerini aktive ederek c-Fos ve c-Jun gibi erken cevap genlerinin transkripsiyonunu indükler. Bu erken cevap genleri de orta ve geç dönem G1 ile S-fazı siklin-CDKlarını kodlayan geç cevap genlerini ve DNA sentezinde görevli genleri aktive edecek olan E2F transkripsiyon faktörünü aktive eder. CDKlar G1'in büyük çoğunluğunda CDK inhibitörleri olan p21, p27 ve p57 ile hipo-fosforile haldeki retinoblastoma (Rb) proteinine bağlı halde olduğundan bir transkripsiyonel repressor olarak davranan E2F tarafından inhibe edilmiş halde bulunurlar. Restriksiyon noktasında siklin-CDK konsantrasyonu CDK inhibitörlerini doyuracak seviyeye ulaşır. Siklin-CDK konsantrasyonu daha da yükseldiğinde Rb hiper-fosforilasyon ile inhibe olur. Böylece ayrılan E2F, DNA sentezinde görevli 800den fazla genin transkripsiyonunu aktive eder. E2F aynı zamanda G1-S geçişinde görevli, CDK2 ile etkileşime girecek ve S-fazı siklinlerinin transkripsiyonunu tetikleyecek olan siklin-E transkripsiyonunu indükler. Hücreler S-fazına geçmeden önce DNA hasarı, oksidatif stres veya diğer DNA hasarı oluşturabilecek olaylar p53 proteinini aktive edebilir. P53'ün majör hedeflerinden biri, Rb fosforilasyonunu engelleyerek ve dolayısı ile DNA hasarı düzeltilene kadar S- fazı geçişini önlemek amacıyla siklin-CDK2 kompleksine bağlanan $p21_{Cip1/Waf1}$'dir (el-Deiry ve ark., 1993; Xiong ve ark., 1993)

.



Şekil 2-3: Restriksiyon noktası regülasyonu

(Poon, 2016)

DNA hasarı PI3K-ilişkili protein kinazlar olan ATM ve ATR'nin aktivasyonunu sağlar. Bu proteinler de kontrol noktası kinazları CHK1 ve CHK2'yi aktive eder.

ATM/ATR, CHK1/CHK2 ve diğer DNA hasarı ile aktive olan protein kinazlar p53'ü N-terminal bölgesinden fosforile eder. Bu bölgelerin fosforilasyonu MDM2-p53 etkileşimini ayırarak p53 seviyesinin ve transkripsiyonel aktivitesinin artmasını sağlar. P53 transkripsiyonel hedeflerinden biri CDK inhibitörü $p21_{Cip1/Waf1}$ 'dir. Biriken $p21_{Cip1/Waf1}$ daha sonra siklin A/E-CDK2 'ye bağlanarak inhibe eder. Bu pRB fosforilasyonunu kaldırarak hücre döngüsünün G1 fazında durmasına neden olur. P53 yolağının bir diğer önemli kontrolü CDK inhibitörü $p16_{INK4A}$ ve $p14_{ARF}$ proteinlerini kodlayan INK4A geni üzerinden gelir. P53'ün MDM2 tarafından inhibisyonu, MDM2 $p14_{ARF}$ tarafından nukleustan uzak tutulması nedeniyle kesilir. INKA4 geni genellikle onkogenik stres ile aktive olur. ardından gelen $P16_{INK4A}$ seviye artışı siklin D-CDK4/6 aktivitesini düşürürken $p14_{ARF}$ artışı p53 seviyesini arttırır. Her iki olay da pRB fosforilasyonunu baskılayarak G1 tutulumuna neden olur (Heber-katz ve ark., 2012).

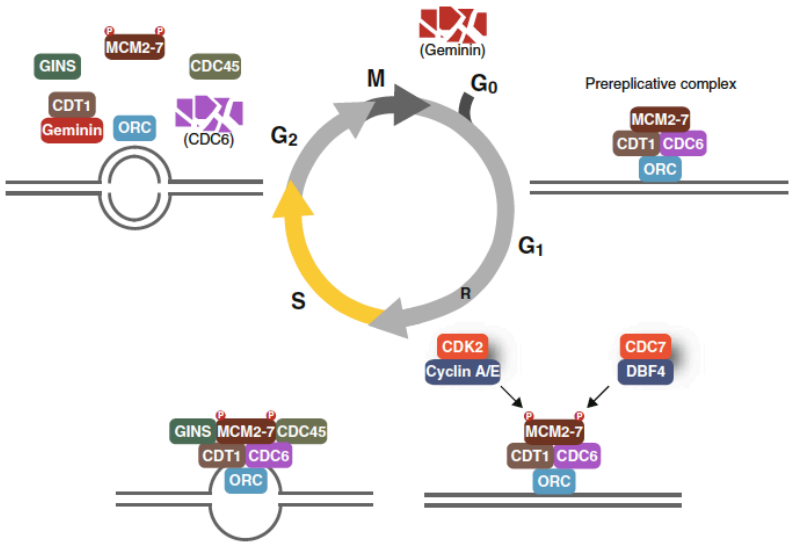
2.2.2.2. S-fazı

DNA sentezi sırasında, S-fazı siklin A-CDK kompleksleri, G1 sırasında bir araya gelen pre-replikasyon komplekslerini ve DNA replikasyonu ilişkili çeşitli enzimleri fosforile ederek aktive eder.

S fazı regülasyonunun anahtar konuları, DNA replikasyonunun nasıl sadece S fazında gerçekleşmesi ve replikasyonun bir döngü boyunca nasıl sadece bir kere başlatıldığıdır. Sentrozom duplikasyonu da S fazında gerçekleşir ve DNA replikasyonunu kontrol eden mekanizma ile birlikte çalışır. Replikasyon kontrol noktası replikasyon çatallarının yavaşlatılması ile S fazının ilerleyişini ve mitozu engellemekten sorumludur.

DNA replikasyonunun replikasyon orijini olarak bilinen kromozom bölgelerinde başlatılır. Orijin tanıma kompleks (origin recognition complex, ORC 1-6), CDC6 ve CDT1 gibi çeşitli proteinler G1 sırasında replikasyon orijinlerine yerleşirler. Böylece MCM2-7 kor helikazın ikili hekzamerlerinin yüklenmesi sağlanarak pre-replikasyon kompleksini (pre-replication complex, pre-RC) oluşturur. G1-S geçişi sırasında orijinler CDK2 ve CDC7 tarafından aktive edilir. CDK2 siklin A ve siklin E tarafından, CDC7 ise ASK1 tarafından aktive edilir (Matthews ve ark., 2013). Siklin-CDK çiftlerine benzer olarak CDC7 hücre döngüsü boyunca kısmen sabit kalırken ASK1 seviyeleri değişkendir; G1 sırasında bulunmazken S ve G2 fazlarında

artmaktadır. ASK1 transkripsiyonu, siklin A ve siklin E gibi geç G1 ve S fazı sırasında E2F tarafından aktive edilir. CDK2 ve CDC7 MCM2-7 dahil olmak üzere pre-RC komponentlerini fosforilleyerek helikaz koaktivatörleri olan CDC45 ve GINS'in çağırılmasını tetikler. MCM2-7 helikaz böylece aktive olarak orijinin açılmasını sağlar. Ardından tek zincirli DNA replikasyon proteini A (replication protein A, RPA) bağlanması ile stabilize edilir. Son olarak çözülmüş DNA, DNA polimerazların ve DNA sentez sistemindeki diğer komponentlerin toplanarak DNA sentezinin başlatılmasına olanak sağlar. Aynı zamanda Siklin A/E-CDK2 de DNA replikasyonunu ve sentrozom döngüsünü kontrol eder (Hinchcliffe ve ark., 2001). Sentrozom nukleusa yakın bulunur ve interfaz stoplazmik mikrotübül ağının ve bipolar mitotik spindle oluşmasında önemli roller oynayan bir mikrotübüllerin organizyonu merkezi taşır (Şekil 2-4).



Şekil 2-4: S fazı regülasyonu

(Poon, 2016)

Hücre bölünmesi sonrasında her yavru hücre sadece tek bir sentrozom alacağından sentrozom sıradaki mitoz öncesinde duplike olmalıdır. Sentrozom duplikasyonu da siklin A/E-CDK2 ile ilişkili olarak S fazı sırasında gerçekleşir.

2.2.2.3. Replikasyonun tekrarlanmasının önlenmesi

Genome replike olduktan sonra pre-RC bir sonraki hücre bölünmesine kadar birçok mekanizma tarafından inhibe edilir. Siklin E S fazından sonra ubiquitin ligaz

SCF_{FBW7} tarafından degrade ederek siklinE-CDK kinaz aktivitesini sonlandırır. SCF_{FBW7} tarafından tanınan fosfodegron CDK2-bağımlı otofosforilasyon ve GSK-3β tarafından oluşturulur. Öte yandan DBF4/ASK1 APC/C tarafından mitoz sonrasında degrade edilir. Geç G1, S ve G2 sırasında CDK aktivitesinin artması bazı mekanizmalarla pre-RC'nin tekrar biraraya gelmesi önlenir. Siklin E S fazı sırasında degrade edilmesine rağmen siklin A ekspresyonu mitoza kadar devam eder. CDK-bağımlı fosforilasyon ile MCM2-7 nükleusun dışında tutulur, CDT1 ve CDC6 degrade olur ve ORC kromatinden ayrılır. Ayrıca, S ve G2 fazları sırasında geminin birikimi, sıkı bir geminin-CDT1 kompleksinin oluşumunu ve böylece CDT1'in pre-RC'ye yüklenmesinin önlenmesini sağlar.

Siklin A-CDK2 aynı zamanda E2F1 ve E2F3'ü de fosforilleyerek DNA bağlama kapasitelerini düşürür ve S fazı kontrolüne katılan genlerin transkripsiyonlarını durdurur (Dynlacht ve ark., 1997; Krek ve ark., 1995). S ve G2 fazları sırasında E2F1'in SCF_{SKP2}- bağımlı degredasyonu da S fazı sonrasındaki E2F aktivitesini kısıtlar (Marti ve ark., 1999). E2F ailesindeki E2F7 ve E2F8 transkripsiyonal baskılayıcılardır. G1-S sonrasında, bu transkripsiyon baskılayıcı E2Fler daha önce E2F1-3 tarafından aktive edilmiş genlerin transkripsiyonunu düşürür. Aynı zamanda doğrudan E2F1 gibi transkripsiyonal aktivatör E2Flerin ekspresyonunu baskılar (Chen ve ark., 2009). Bu mekanizmalar birarada çalışarak G1-S sonrasında E2F aktive edici genlerin ekspresyonunu engeller.

Mitoz sırasında siklin A ve siklin B'nin yıkılması ile düşük CDK aktivitesi olan bir ortam sağladığından pre-RC'nin toplanması erken G1 de tekrar gerçekleşebilmektedir. Gemininin mitoz sırasında APC/C tarafından proteolizi de aynı zamanda CDT1'in Pre-RC oluşturmak üzere salınımını sağlar. Dolayısı ile APC/C önceki döngüden baskılanan replikasyon mekanizmaları yeniden başlatır.

2.2.2.4. Replikasyon kontrol noktası

Bekletilen replikasyon çatalları ATR'yi içeren bir kontrol noktasını aktive eder (Friedel ve ark., 2009). Replikasyon çatalının ilerleyişi ya yetersiz miktardaki nukleotidlerden veya problemlerden dolayı bozulur ve DNA'ya engel oluşturur. ATRIP, Claspin ve TopBP1 gibi çeşitli proteinler ATR'nin bekletilen replikasyon çatalındaki tek zincir DNA'ya ulaşmasında görevlidir. ATR özellikle tek zincir bağlanma proteini RPA kaplı tek zincirli DNA'ya bağlanarak aktive olur. Aktive olan ATR ardından

CHK1'i fosforilleyerek aktive eder. Sonuç olarak CDKları inhibe eden fosforilasyon durumlarını değiştirerek hem replikasyonda hem de mitoza geçişte görev alan siklin-CDK komplekslerinin inhibisyonuna doğru dengeyi kaydırır. Böylece replikasyon kontrol noktası orijinin ateşlenmesi, replikasyon çatalının ilerlemesini kontrol ederken zamansız mitozun gerçekleşmesini önler. Bu mekanizmalar replikasyon çatallarının onarılması veya tekrardan oluşturulması için hücreye zaman tanır. Bu kontrol noktası ekzojen stress yokluğunda dahi düzgün ilerleyen bir S fazı için de gereklidir.

2.2.2.5. G2 fazı

DNA sentezinin tamamlanması ile hücreler geçici olarak ikinci bir kontrol amacıyla G2'de tutulur. Bu kontrol noktasında amaç M fazına geçmeden önce tamir edilmesi gereken DNA hasarı varsa belirlenmesi veya tamir edilemeyecekse de apoptoz yolağının aktive edilmesidir. Emi1 (erken mitotik inhibitör 1- early mitotic inhibitor 1) ve Evi5 (ekotropik viral integrasyon faktörü 5- ecotropic viral integration factor 5) propteinleri M fazına erken geçişi engeller. Bu proteinlerin ekspresyonları G1/S geçişi sırasında E2F tarafından uyarılır ve proteinler sentrozoma birikirler. Emi1 Cdc20 ile etkileşime girip E3 ligaz APC'yi inhibe ederek APC substratlarının, siklin A ve B'nin ubikutinasyonunu ve degradasyonunu engelleyen bir F-box proteinidir. Bu sayede hücre G2 fazında kalır. Emi1 bulunmayan hücrelerde replikasyon stresine bağlı olarak DNA hasarı görülür ve hücre apoptoza girer (Verschuren et al. 2007). Interfazda yani kesilmeden önce Evi5, Emi1 ve siklin A'yı stabilize eden 110kDa'luk bir proteindir. İkinci bir protein Pin1'in de Emi1 stabilizasyonunu sağladığı gösterilmiştir (Bernis et al. 2007).

Evi5 aynı zamanda küçük GTPaz vezikülü trafiği yapan Rab11'i inaktive eden bir GTPaz aktive edici protein (GTPase Activating Protein, GAP) olarak görev yapar (Dabbeekeh et al. 2007 ; Westlake et al. 2007.) Vezikül trafiği Yes bağlantılı protein (Yes-Associated Protein (YAP))'ın sitozolden nukleusa translokasyonunu kontrol ederek Hippo yolağını regüle eder. YAP nukleusta Smad-7 ko-aktivatörü olarak davranarak E2F ve survivin gibi hücre döngüsü ilişkili genleri aktive eder (Zhao et al. 2011). Evi5, Rab11 inhibisyonu yaparak hücrelerinin mitoza girmesi engelleyebilir,

böylece fosforile (inaktif) YAP'ın nükleusa geçişini ve orada mitotik ve farklılaşma sinyali oluşturmasını engelleyerek hücrenin farklılaşmamış durumda kalmasını sağlayabilir.

2.2.2.6. M-fazı

Evi5 mitoz boyunca mevcuttur, ancak geç mitoz ve sitokinez sırasında kesime uğrar (Faitar et al. 2006). Profaz sırasında kesilmiş Evi5 hücre boyunca taşınır, ancak metafazda mitotik spindle'daki a-tubulin ile kolokalize olur. Anafaz sırasında orta kısımda yer alarak aurora B kinaz, INCENP, survivin, ve borealin'i içeren kromozomal geçiş kompleksine (chromosomal passenger complex, CPC) katılır (Ruchaud et al. 2007). Geç telofaz ve sitokinez sırasında Evi5 CPC'den ayrılır ve yeni membran oluşumunun iki yavru hücreye ayrılacağı bölgede iki paralel disk benzeri yapı oluşturur. Yapılan çalışmalar Evi5 yokluğunda sitokinezin gerçekleşmediğini göstermiştir (Faitar et al. 2006). Evi5'in yeni hücre membranı oluşumunu GTPaz aktivitesi dışında bir mekanizma ile regüle ettiği gösterilmiştir (Westlake et al. 2007).

Hücresel algılama mekanizmaları, DNA hasarının onarılması gibi mitoz için tüm gerekliliklerin sağlandığını gördüğünde Emi1 ve Evi5'in Polo-benzeri kinaz 1 (Polo-like kinase 1, PLK1) tarafından fosforillenir. Bu durum Emi1'in degredasyonunu ve böylece siklin A ve B'nin APC tarafından degredasyonuna ve böylece profaz, metafaz ve anafaz süreçlerinden geçişi sağlar (Eldridge et al. 2006).

Hücre tutulumu intrinsik veya ekstrinsik çeşitli sebeplerden kaynaklanabilir ve çeşitli kontrol noktalarını etkileyebilir. İntrinsik faktörlerden biri hücrenin büyüklüğü olabilir. Ekstrinsik faktörler ise hücrenin hücre döngüsünde ilerleme hızını belirleyen hücre besinidir. Kültüre edilen hücreler açlık durumlarında sıklıkla hücre döngüsünden çıkarak durgun hale yani G0 fazına geçerler. Tüm hayvanlarda açlık çeşitli organların hücre küçülmesi ve kaybından kaynaklı atrofisine sebep olur. Bu hücreler tekrar besine ulaşabildikleri zaman ancak hücre döngüsüne geri dönebilirler (Shambaugh ve ark., 1996).

DNA hasarı kontrol noktalarını tetikleyerek G1 ve G2'de tutuluma neden olur. Hücreler S fazında da tutulabilir ve yavaşlamış DNA sentezi nedeniyle süreç uzayabilir. G1 tutulumu DNA replikasyonu öncesinde tamire izin verirken, G2 tutulumu mitozda

kromozom ayrılması öncesinde tamiri sağlar (Maity ve ark., 1994). G1 tutulumu p53 bağımlıdır, p53 geni olmayan hücreler iyonize radyasyon sonucu ortaya çıkan DNA hasarına cevap olarak G1 tutuluumu yapmazlar (Little ve ark., 1995).

P53 proteininin G1 tutulumu ile ilişkili birden fazla fonksiyonu bulunmaktadır. P53, tek zincir DNA hasarı, insersiyon/delesyon yanlış eşleşmeleri ve serbest DNA uçları gibi çeşitli DNA hasarlarını tanır ve bağlanır (Bakalkin ve ark., 1995; Lee ve ark., 1995; Oberosler ve ark., 1993). Bunlara ek olarak p53 dizi spesifik DNA bağlanması ve transkripsiyonel aktivitesi bulunur (Wu ve ark., 1993; Zambetti ve ark., 1992). DNA hasarının ardından p53 p21 transkripsiyonunu stimüle eder ve p21 proteini de G1 CDKları inhibe eder. Ayrıca p53 proteininin, mdm-2 onkogenini aktive ederek kendi inhibisyonunu sağladığı bir oto-regülatör geri bildirim sistemi mevcuttur (Wu ve ark., 1993). Bunlara ek olarak DNA hasarı sonrası p53-bağımlı bir apoptoz indükleme mekanizması bulunur (Clarke ve ark., 1994).

Neoplasm tanımı bir büyüme sinyali yokluğunda normalden daha hızlı bir şekilde hücresel proliferasyon ile bir dokunun anormal büyümesi olarak tanımlanır. Dolayısı ile onkogenler ve tümör supresör genler mitotik sinyal transdüksiyonunda veya kontrol noktalarındaki görevleri ile hücre döngüsünde büyük önem taşırlar (Spraycar, 1995). Mitojenik sinyal transdüksiyonu, hücre dışına salınan büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, sitoplazmik sinyal transdüksiyonu kaskadları ve transkripsiyon faktörleri gibi çeşitli onkoproteinleri içerir. Bu onkoproteinler normal bir hücrede bir sinyali hücre yüzeyinden nükleusa taşıyarak transkripsiyonu ve hücre döngüsünün başlatılmasını indükler. Transforme olmuş hücrelerde bu sinyal transdüksiyonu yolakları her zaman açık halde veya inhibitör mekanizmaları kapalı haldedir. Bu regülatörler çoğunlukla G1 kontrol noktasının p53 ve pRb olmak üzere iki önemli yolağında yer alır. Tablo' da bazı bu genlerin görevleri özetlenmiştir.

Tablo 2-1: Neoplazmda hücre döngüsü regülatörleri

Onkoprotein/ Tümör süprasör	Hücre döngüsündeki normal fonksiyonu	Onkojenik değişimi
p53	DNA hasarı sonrası G1 tutulumunu indükler	Mutasyon
pRb	Restriksiyon noktası regülatörü	Delesyon
Mdm-2	p53 transkripsiyonel aktivitesini inhibe eder	Gen amplifikasyonu veya artış mRNA translasyonu

p16	G1 siklin-cdk komplekslerini inaktive eder	Delesyon
Siklin D1	Hücre döngüsünü başlatır	Gen amplifikasyonu
Cdc25A, Cdc25B	G1/S CDK'larını aktive eder	Aşırı ekspresyon

(SCHAFER, 1998)

P53 mutasyonları malignitelerin %50'sinde tanımlanmıştır (Greenblat ve ark., 1994). P53 molekülündeki tek aminoasit değişimleri çoğunlukla fonksiyonel değişimlere sebep olarak fonksiyonunda önemli etkilere sahip olabilmektedir. P53 mutasyonlarının sebep olabileceği bir diğer etki ise stabilitesinin artması yıkımının azalamasından kaynaklı hücre içi oranlarının yükselmesidir. P53 DNA hasarı kontrol noktasında kritik rol oynar. DNA hasarının ardından p53 stabilize olur ve p21 transkripsiyonunu başlatır. Bu durum G1 fazı tutulumuna neden olur. P53 bulunmayan veya p53 geni susturulmuş hücrelerde bu kontrol noktası fonksiyon göstermemektedir. Bu nedenle bu hücreler, DNA hasarına rağmen hücre döngüsüne devam ettiğinden mitoz öncesi DNA hasarının onarılması gerçekleşemediğinden hasar mitoz sonrasında genom içerisinde onarılır.

2.3. Apoptoz

Çok hücreli organizmalarda homeostaz, artık ihtiyaç duyulmayan veya hasar görmüş hücrelerin eliminasyonuna olanak sağlayan, kontrollü hücre ölümünü indükleyen apoptoz yolağı ile sağlanmaktadır. Bozulmuş bir apoptotik hücre ölüm mekanizması bir çok hastalık için patolojik faktor teşkil etmektedir. Apoptoz, büyüme, immün sistem ve neoplastik gelişimde kritik rol oynadığından, tümör süpresyonu görevi de yapan bu yolağın düzgün çalışmaması kanser gelişimi ve ilerleyişinde önemli bir noktadır. Her ne kadar kanser hücreleri apoptatik süreçten kaçmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmiş olsa da çeşitli moleküler müdahalelerle kanser hücreleri apoptoza yönlendirilebilmektedir (Elmore, 2007).

Apoptoz ATP bağımlı bir süreçtir ve iki farklı yolak üzerinden indüklenmektedir; (1) intrinsik veya mitokondrial yol, (2) ekstrinsik yol. Her iki yolakta da özelleşmiş proteazların hiyerarşik aktivasyonu sonucunda kaspaz enzimlerinin özel morfolojik ve

biyokimyasal değişimleri başlatarak plazma membranının tomurcuk oluşturarak küçülmesi, kromatin kondenzasyonu ve internukleozomal DNA fragmantasyonu meydana gelir (Sayers, 2011).

2.3.1. İntrinsik yol

Mitokondri hücrenin hem yaşamı hem de ölümünde rol oynar. Hücre enerjisini ATP formunda sağlarken bir yandan da ölüm sinyaline cevap olarak mitokondri dış membranı geçirgen hale gelerek pro-apoptotik moleküllerin stoplazmaya geçişini sağlar (sitokrom c, Smac, apoptosis-inducing factor (AIF) and endonuclease G (Endo G)).

İntrinsik yol radyasyon veya kemoterapi kaynaklı DNA hasarı gibi hücre içi stres sinyalleri ile veya ölüm reseptörlerin aktive olması ve Bid'in kaspaz-8 aracılı kesimi ile aktive olur. Kesilmiş Bid (tBid) ve/veya diğer pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri Bax/Bak proteinlerinin mitokondrial membrana translokasyonunu indükler. Böylece sitokrom C ve ikinci mitokondri-aracılı kaspaz aktivatörü (second mitochondria-derived activator of caspase, SMAC/DIABLO) sitozole geçer. Sitokrom C, kaspaz 9 ve APAF-1 ile apoptozom adı verilen kompleksi oluşturur ve böylece kaspaz 9 aktivasyonunu sağlar. Kaspaz 9 ölüm kaspazları olan kaspaz -3,-6 ve -7'yi aktive ederek hücre ölümünü indükler (Zaman ve ark., 2014). Bcl-2 ve Bcl-XL sitokrom C'in mitokondriye salınımını önleyerek apoptozu inhibe edebilir. Apoptoz inhibitörü proteinler (inhibitor of apoptosis, IAP) (örneğin, cIAP1/2, XIAP ve survivin) kaspaz aktivasyonunu engeller. SMAC, bu IAP proteinlerini ayırarak apoptozu indükler.

Apoptoz sürecinde mitokondriden salınan AIF'nin kaspaz bağımsız bir yol ile nükleer DNA'ya hasar verdiği öne sürülmektedir. Apoptotik proteaz aktive eden faktör 1 (Apoptotic protease activating factor 1, Apaf1) normalde hücrede inaktif formda iken mitokondriden sitokrom C salınması ile aktive edilir (Elmore, 2007).

2.3.2. Ekstrinsik yol

Apoptozu indükleyen ekstrinsik yol transmembran reseptör aracılı etkileşimleri içerir. İnflamatuvar sinyalleri veya apoptozu indükleyen ölüm sinyalleri ölüm

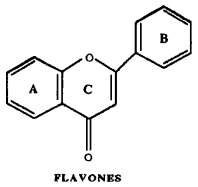
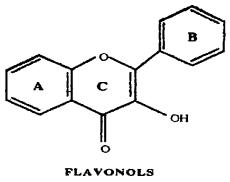
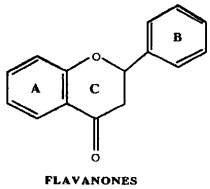
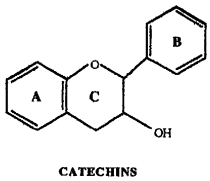
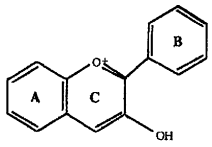
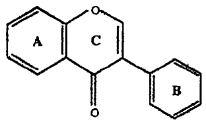
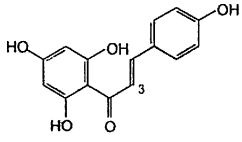
ligandlarının ölüm reseptörlerine bağlanması aracılığıyla iletilir. Ölüm reseptörleri olan TNF-R1, TNF-R2, Fas/APO-1 ile DR3, DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2) ve DR6 olarak adlandırılan Tümör nekroz faktörü ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)) reseptörleri Tümör nekroz faktörü (tumour necrosis factor (TNF)) reseptör süper ailesi üyeleridir. Bu reseptör ailesinin üyeleri sisteince zengin benzer ekstraselüler domainler ve ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden intraselüler sinyal yolaklarına aktarılması için kritik rol oynayan 80 aminoasitlik bir sitoplazmik ölüm domaini (death domain-DD) içerir. Bugüne kadar en iyi tanımlanmış ligandlar ve karşılık gelen ölüm reseptörleri FasL/FasR, TNF-α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5' dir.

Ölüm reseptörleri, kendilerine özgü ligandlarının bağlanması sonucu reseptörün trimerizasyonu ve adaptör proteinlerin bir araya gelmesiyle aktive edilerek, reseptörün sitozolik bölgesinde ölüm kümesi (cluster) oluşumu sağlanır.

Apoptozun ekstrinsik fazı en iyi FasL/FasR and TNF-α /TNFR1 yolakları ile açıklanmıştır. Ligand bağlanmasının ardından stoplazmaik adaptör proteinler bir araya gelir ve karşılık gelen ölüm domainlerini ortaya çıkarır. Fas ligandın fas reseptör ile bağlanması adaptör protein ölüm domaini olan fas ilişkili protein (Fas-associated protein with death domain (FADD))'ın, ve TNF ligandın TNF reseptör ile bağlanması adaptör protein tümör nekroz faktör ilişkili ölüm domaini (tumour necrosis factor associated death domain protein (TRADD)'ın ve ardından FADD ve RIP'in bağlanmasını / aktivasyonunu sağlar. FADD üzerindeki C-terminal ölüm domaini (DD) trimer reseptöre bu DD-DD etkileşimi ile bağlanır. FADD N-terminal bölümünde yer alan ölüm efektör domaini (death effector domain (DED)) ise kaspaz-8'in aynı bölgedeki pro-domainine bağlanır. Böylece meydana gelen ölüm indükleyen sinyal kompleksi (death inducing signaling complex (DISC)) proteoliz ile kaspas 8'in otoaktivasyonunu ve sitozole salınımını sağlar. Aktif kaspaz 8 ölüm kaspazları olan kaspaz -3,-6,-7'yi aktive eder ve sonuç olarak efektör kaspazlar apoptoz sürecini tamamlar. Böylece meydana gelen ölüm indükleyen sinyal kompleksi (death inducing signaling complex (DISC)) proteoliz ile kaspas 8'in otoaktivasyonunu ve sitozole salınımını sağlar. Bazı hücrelerde intrinsik ve ekstrinsik yolaklar kaspaz-8 aracılı BID'ın tBID'a trunkasyonu üzerinden etkileşime girer. tBID BAK/BAX oligomerizasyonunu aktive eder ve mitokondriyal yolaktan apoptozu indükler (Elmore, 2007).

2.4. Polifenolik bileşenler

Doğal bitkisel ürünlerin sağlığa faydaları spesifik olarak ayrıştırılmadan önce bile bilinmekteydi. Besin kaynaklı flavonoidler meyve, sebze, çiçek, çikolata, çay ve diğer bitki kaynakladında bulunan en yaygın polifenollerdir (Chahar ve ark., 2011; Katyal ve ark., 2014; Harris ve ark., 2016). Polifenoller arasında stilbenler, lignanlar, flavonoidler ve fenolik asitler yer alır. Etkileri en çok çalışılmış polifenoller flavonoidlerdir. Çoğunluğu çiçeklerin, meyvelerin ve yaprakların çekici renklerinde sorumlu olan 4000'den fazla flavonoid çeşidi tanımlanmıştır (de Groot ve Rauen, 1998). 9000den fazla üyesi bulunan bu aile halka yapıları ve saturasyon oranları ile flavonlar, flavanoller, izoflavonlar, flavonoller, flavanonlar ve flavanonoller olarak altgruplara ayrılır (Si ve ark., 2010; Nema ve ark., 2015). Bu molekül ailesinin tamamının ortak özelliği 3'lü karbon köprüsü ile bağlı iki benzen halkası (C6-C3-C6) taşımalarıdır (Hodek ve ark., 2002) (Şekil 2-5).

Main structure	Flavonoids	Chemical structure	Samples
$C_6C_3C_6$	Flavones	 FLAVONES	Cinencetin, nobiletin, tangeritin, isocinencitin, luteolin, apigenin
	Flavonols	 FLAVONOLS	Quercetin, kaempferol
	Flavanones	 FLAVANONES	Hesperidin, naringenin
	Flavanols (catechins)	 CATECHINS	(+)-catechin, (−)-epicatechin, (+)-gallocatechin, (−)-epigallocatechin
	Anthocyanins	 ANTHOCYANIDINS	Peonidin, delfinidin, petunidin, cyanidin
	Isoflavones	 ISOFLAVONES	Daidzein, genistein
	Chalcones	 Chalcones	Phloretin, arbutin, chalconaringenin

Şekil 2-5: Flavonoid alt grupları

(Roberts et al., 1999; Morton et al., 2000; Aherne and O'Brien, 2002)

Bir flavonol olan quercetin soğan, elma, brokoli ve dutsu meyvelerde bulunur. İkinci grup olan flavanonlar ise çoğunlukla turunçgillerde bulunur. Bu gruba ait flavonoidlerin başında naringin gelir. Kateşin (flavanol) grubuna ait flavonoidler,

çoğunlukla yeşil veya siyah çayda ve şarapta bulunur (de Groot ve Rauen, 1998). Antasiyoninler ise çilek ve diğer dutsu meyvelerde, üzüm, şarap ve çayda bulunur. Soyada bolca bulunan isoflavanonlar daidzein ve genisteindir. Flavonoidlerin bilininen hiçbir önemli yan etkisi olmaması ile oldukça iyi bir güvenlik profilleri vardır (140g/gün 'e kadar toksisite görülmez) (Hertog ve ark., 1993). Flavonoidlerin farmakolojik özellikleri arasında antioksidan, anti-inflamatuvar, kardiyoprotektif, hepatoprotektif, antimikrobiyal, antiviral ve antikanser etkileri yer almaktadır (Gontijo ve ark., 2016; Kumar ve Pandey, 2013).

2.4.1. Flavonoidlerin antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri

Tüm flavonoid alt gruplarında en iyi tanımlanan özelliklerin başında antioksidan özellikleri yer almaktadır. Flavonlar ve kateşinler reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı vücudu korumakta en güçlü olanlardır. Hücre ve dokular sürekli olarak normal oksijen metabolizması ile ortaya çıkan serbest radikaller ve ROS tarafından hasara uğrama riski altındadır (de Groot, 1994; Grace, 1994). Serbest radikallerin en önemli etkilerinden biri lipid peroksidasyonu sonucu meydana gelen membran hasarıdır. Bu durum hücrenin yükünü değiştirerek osmatik dengesinin bozulmasına ve hücrenin şişerek ölümüne sebep olmaktadır. Serbest radikaller genel inflamasyon ve doku hasarına sebep olan çeşitli inflamatuvar mediyatörleri çeker. Bu nedenle organizmaların kendilerini ROS hasarından korumak için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir (Halliwell, 1995). Enzimatik antioksidan savunma mekanizmaları arasında superoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksit yer alırken non-enzimatik olarak da glutatyon, askorbik asit ve a-tokoferol bulunmaktadır. Hasar sırasında ROS üretiminin artması endojen süpürücü bileşiklerin tüketilmesine ve yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Flavonoidler en az 3 farklı radikal üreten sistem ile etkileşmesinin yanında endojen antioksidanların fonksiyonunu da arttırmaktadır. Flavonoidler hidroksil gruplarının yüksek reaktivitesi sayesinde ROS'lar ile reaksiyona girerek reaktif radikalleri stabilize eder ve daha az reaktif hale gelmelerini sağlar (Korkina ve Afanas'ev, 1997).

Demir varlığında ROS'lar lipid peroksidasyonu yaparlar (Nelson ve ark., 1992). Bazı flavonoidler demir şelasyonu yaparak serbest radikal oluşumunu önleyebilmektedir (Ferrali ve ark., 1997). Örneğin Quercetin'in demir şelasyon ve demir stabile edici

özellikleri bulunmaktadır. Belirli flavonoidler kompleman sistem aktivasyonunu indirgeyerek inflamatuvar hücrelerin endotele adhezyonunun ve dolayısı ile genel anlamda inflamatuvar cevabın azalmasına neden olur (Friesenecker ve ark., 1995). Aynı zamanda flavonoidler peroksidaz salınımını da azaltırlar. Bu azalma da α-antitripsin aktivasyonuna müdehale ederek nötrofiller tarafından gerçekleştirilen ROS üretimini baskılar (Middleton ve Kandaswami, 1992). Flavonoidlerin enzim sistemleri üzerindeki bir diğer etkisi ise araşidonik asit metabolizmasının inhibisyonudur (Ferrandiz ve Alcaraz, 1991). Bu özellik flavonoidlere antiinflammatuvar ve antitrombotik özellikler de kazandırmaktadır. Araşidonik asit salınımı genel inflamatuvar cevabın başlangıç noktasıdır. Quercetin'in hem siklooksigenaz hem de lipogenaz aktivitesi ile inflamatuvar metabolitlerin oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Robak ve Gryglewski, 1996; Kim ve ark., 1998).

2.4.2. ROS ve kanser gelişimi

Kanserlerde antioksidan sistemler genellikle yetersizdir ve ROS kaynaklı hasarın kanser gelişiminde rol aldığı bildirilmektedir (loft ve ark., 1997; pryor,1997). ROS DNA hasarına yol açabilir ve hatalı veya eksik onarım ile hücre bölünmesi sırasında mutasyonlara neden olabilmektedir. Bu mutasyonların onkogen veya tümör supresör genlerde meydana gelmesi de kanser gelişimini ve ilerleyişine sebep olmaktadır. Ayrıca ROS hücre sinyal ve büyüme mekanizmaları ile ilişkili doğrudan etkileşim gösterebilir. ROS kaynaklı hücresel hasar mitozu indükleyebilir, hasarlı DNA kaynaklı mutasyon riski artar ve DNA'nın mutajenelere maruziyet riskini arttırabilir. Bu nedenle flavonoidlerin güçlü antioksidanlar olarak karsinogenezi inhibe edebileceği öne sürülmüştür (Stefani ve ark., 1999). Fisetin, apigenin ve luteolin hücre proliferasyonunun güçlü inhibitörleridir (Fotsis ve ark., 1997).

Artan epidemiyolojik çalışmalar ve laboratuvar çalışmaları besin kaynaklı flavonoid tüketiminin çeşitli kanser türlerinin gelişme riskini düşürdüğü belirtilmiştir (Neuhouser, 2004). Silimarin, genistein, quercetin, daidzein, luteolin, kaemferol, apigenin ve epigalla kateşin 3- gallat (EGCG) gibi bazı flavonoidlerin antiproliferatif (Ohga ve ark., 2009; Bermudez-Soto ve ark., 2007) ve koruyucu etkileri prostat (Vue ve ark., 2016), kolorektal (Wenzel ve ark., 2000), meme (Dal-Ho ve ark.,2001) ve tiroid

(Yin ve ark., 1999) gibi çeşitli kanserlerde gösterilmiştir (Petrick ve ark., 2015; Cibin ve ark., 2010; Rossi ve ark., 2010). Bu bileşiklerin kemopreventif etkinlikleri (1) yeni kanser hücrelerinin gelişiminin inhibe edilmesi, (2) karsinojenlerin aktivasyon bölgelerine ulaşmaların engellenmesi ve (3) belirli bileşiklerin metabolizmalarının inhibe edilerek toksisitelerinin azaltılması aracılığı ile gerçekleşmektedir (Surh, 2003; Tsyrlov ve ark., 1994; Manthey ve ark., 2001). Büyük bir klinik çalışmada quercetin tüketimi ve akciğer kanseri insidansı arasında ters bir ilişkili gösterilmiştir (Knekt ve ark., 1997). Quercetin ve apigenin farelerde melanoma büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Caltagirone ve ark., 2000).

Flavonoidlerin antikanser ve önleyici etkilerini gösterme mekanizmları arasında (1) apoptozun indüklenmesi (Wenzel ve ark., 2000; Iwashita ve ark., 2000; Lee ve ark., 2002), (2) CDKlar gibi kilit hücre döngüsü düzenleyicilerinin inhibe edilmesi ile G1 veya G2/M fazlarında tutuluma neden olmaları (Konig ve ark., 1997; Wang, 2000), (3) başta sitokrom P450 ailesi olmak üzere metabolize edici enzimlerin inhibe edilerek çeşitli karsinojenik bileşiklerin aktivasyonunun engellenmesi (Le Marchand ve ark., 2000), (4) faz II metabolize edici enzimlerin aktivasyonu ile ROS oluşumunun inhibisyonu (Lee ve ark., 2002; Sun ve ark., 1998; Bu-Abbas ve ark., 1998) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor, VEGF) ile basit fibroblast büyüme faktörü (basic fibroblast growth factor, b-FGF) aracılı angiyogenezin inhibisyonu (Fotsis ve ark., 1997; Kim, 2003; Schindler ve Mentlein, 2006) yer almaktadır. Bunlara ek olarak flavonoidlerin nükse ve kemoterapi başarısızlığına neden olan çoklu ilaç direncini ciddi ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir (Kioka ve ark., 1992; Shapiro ve Ling, 1997). Öte yandan bazı flavonoidlerin, flavonoid ailesine karakteristik olmayan spesific etki mekanizmaları da bulunmaktadır. Örneğin, genistein ve diadzein gibi izoflavonların spesifik olarak kanser büyümesi ve proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Lee ve ark., 2012; Adjakly ve ark., 2013; Hwang ve Choi, 2015). Bu flavonoidlerin östrojen ile yapısal benzerliği nedeniyle meme kanserine karşı farklı etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Martin ve ark., 1978; Peterson ve Barnes, 1996; Jaskulski et al., 2017). Bir diğer flavonoid olan silibin ise antioksidan ve hepatoprotektif etkinlik göstermektedir (Biedermann ve ark., 2014; Zarrelli ve ark., 2015; Comelli ve ark., 2007). Ayrıca son 10 yılda gerçekleştirilen in vitro ve in vivo pre-klinik çalışmalar, silibin'in antiproliferatif etkileri olduğunu gösterdiğinden faz I ve faz II çalışmaları da gerçekleştirilmiştir (Deep ve Agarwal, 2010; Hoh ve ark., 2006; Flaig ve ark.,2010).

Silibin'in antikanser etkilerini açıklayabilecek farmakolojik özellikleri arasında (1) TNF-kaynaklı NF-κB aktivasyonu inhibisyonu (Manna ve ark., 1999), (2) tirozin kinaz inhibisyonu (Ahmad ve ark., 1998), androjen reseptörleri inhibisyonu (Zhu ve ark., 2001) ve epitel-mezenkimal dönüşüm embriyonik yolaklarının inhibisyonu (Li ve ark., 2010; Surai, 2015; Bang ve ark., 2008; Wu ve ark., 2010) yer almaktadır.

Quercetin'in kolon kanseri ve nörogliomlardaki antikanser etkinliği otofaji (tip II programlı hücre ölümü) yolağının aktivasyonu ve mitojen aktive protein kinaz (MAPK veya ekstraselüler sinyal ilişkili kinaz (ERK)) sinyal yolağının aktivasyonu üzerinden gerçekleşmektedir (Zhao ve ark., 2016; Wang ve ark., 2016; Lou ve ark., 2016). Dolayısıyla yapılan çeşitli çalışmalar flavonoidlerin kanser tedavisi ve önlenmesindeki potansiyel rolünü desteklemektedir (Chahar ve ark., 2011). Günümüzde, deve dikeni ve kızıl yonca ekstraktları gibi çeşitli flavonoid formulasyonları gıda takviyesi olarak bulunabilmektedir (Egert ve Rimbach, 2011). Ancak belirtilen flavonoidlerin hiçbiri klinik kullanım için onaylanmamıştır.

2.4.3. Flavonoidlerin biyoyararlanımı

Günlük ortalama flavonoid tüketimi Finlandiya'da en düşük (2.6mg) ve Japonya'da en yüksek (68.2 mg) olmak üzere ülkeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir (Hertog ve ark., 1995; Friesenecker ve ark., 1995; Haenen GR, Bast 1999). Quercetin elma ve soğanlar aracılığı ile flavonoid tüketiminde en önemli yeri tutmaktadır (Knekt ve ark., 1997).

Flavonoidlerin absorbsiyonu, metabolizması ve atılımı ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bazı çalışmalar en çok çalışılmış flavonoid olan quercetin'in ciddi oranlarda emildiğini göstermiştir (Hollman ve ark., 1997; Young ve ark., 1999). Flavonlar doğal hallerinde aglikon formları yerine ağırlıklı olarak glikozile formlarıda bulunurlar. Flavonoidlerin mevcut formaları da emilimleri üzerinde büyük etkiye sahiptir. Quercetin'in glikozide formunun aglikon formundan çok daha yüksek oranda emildiği belirtilmişse de (Hollman ve ark., 1999) diğer araştırmacılar tarafından tartışılmaktadır (Manach ve ark., 1997). Flavonoid glikozidasyonunun emilimi kolaylaştırması kateşinlerin doğal formlarında yüksek oranda emilmesinden dolayı sorgulanmaktadır (Okushio ve ark., 1996).

Flavonoidlerin (kateşinler) konjugasyon yolağı ince barsakta glukuronid grubu ile konjugasyonu ile başlar. Flavonoidler ardından albumine bağlanarak karaciğere

taşınır (Manach ve ark., 1995; Piskula ve Terao, 1998). Karaciğerde flavonoid konjugasyonu sülfat, metil veya her iki grubun birlikte eklenmesi ile ilerletilebilir. Bu grupların eklenmesi dolaşım eliminasyon zamanını arttırmakta ve büyük olasılıkla toksisiteyi azaltmaktadır. Flavonoid iskeleti üzerinde konjugatların bağlanması için birkaç muhtemel lokasyon bulunmaktadır. Konjugatın tipi ve lokasyonu enzim inhibisyon kapasitesini, antioksidan aktivitesini veya her ikisini de etkiliyor olabilir. Son çalışmalar düzenli flavonoid tüketiminin ağırlıklı olarak birkaç konjugat oluşumu ile sonuçlandığını ve daha yüksek aktivite göstermelerine neden olabileceğini göstermiştir. Düzenli flavonoid verilen ve verilmeyen farelere yüksek doz quercetin uygulandığında, düzenli flavonoid tüketen grupta quercetinin izorhamnetin konjugatının daha yüksek oranlarda oluştuğu görülmüştür (Manach ve ark., 1995). İzorhamnetin, bir oksijen serbest radikalleri kaynağı olan ksantin oksidazı quercetin aglikon formundan daha etkili biçimde inhibe etmektedir (Nagao ve ark,.1999).

Akdeniz ülkelerindeki kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölümlerin düşük olduğu düşünüldüğünde flavonoidlerin ara sıra tüketilmesi tek başına ve biyoaktif konjugatlarının konsantrasyonlarının yeterince yükselmemesine neden olabilir. Konjuge flavonoidlerin yarı ömrünün 23-28 saat kadar uzun sürelere ulaşması (Okushio ve ark., 1996) düzenli kullanım ile birlikte birikim sağlanmasına, dolayısı ile flavonoid konsantrasyonlarının yeterli seviyelere ulaşmasını sağlayabilir.

Yakın zamanda yapılan in vivo çalışmalar lquercetin de dahil olmak üzere flavonoidlerin antimutojenik etkileri olduğunu göstermiştir (Formica ve Regelson,1995; Kato ve ark., 1984; Plakas ve ark., 1985). Yaklaşık 10.000 kadın ve erkeğin 24 yıl boyunca izlediği bir klinik çalışmada quercetin gibi flavonoidlerin tüketiminin akciğer kanseri ile ters ilişkisi olduğu görülmüştür. Sonuç olarak flavonoidlerin kanser hücrelerine karşı toksik ancak normal hücrelere karşı toksik olmadığı veya çok düşük toksisite gösterdiği ve bu nedenle kanser gelişiminin önlenmesinde etkili olabilecekleri belirtilmiştir (Middleton, 1998).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Cihazlar

Laminar hava akımlı kabin, CO2 inkübatör (Thermo Electron Corporation), Işık mikroskobu (Olympus CKX41), Hücre sayım cihazı (Beckman Coulter Vi Cell XR), Santrifüj (Hettich, Rotina 38), Vortex (VELP Scientifica), Sıcak su banyosu, Sıvı azot tankı (-196°C), Buz dolabı (+4°C, -20°C, -80°C), Spektrofotometre (Thermo Multiscan Spectrum), Muse® Cell Analyzer (Millipore Corporation), RT-PCR (Roche 480 II Light Cycler).

3.1.2. Kimyasal Maddeler

DMEM (Gibco), DMEM F12 (Gibco), McCoy's 5A (Gibco), Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrome), Tripsin /EDTA % 0,25 (Gibco), Penisilin/Streptomisin (Gibco), Fosfatlanmış tuz solüsyonu (PBS) (Gibco), steril deiyonize su, %60 alkol, Vi-Cell Reagents (Beckman Coulter), Dimetil sülfoksit (Sigma), Muse Dead Cell kit (Muse), Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche),

3.1.3. Sarf Malzemeleri

96 well plates (Greiner), Cell Culture Flasks 75 cm² (Greiner), 1000µl mikropipet ucu, 100µl mikropipet ucu, 10µl mikropipet ucu, 10ml serolojik pipet, medium filtresi (Millipore Express™ Plus), cryovial

3.1.4. Çözeltiler

3.1.4.1. MDA-MB-231 Medium

440ml DMEM F12 Medium'a 50 ml FBS (%10), 5ml 1 L-glutamin (%1) ve 5ml Penicilin/Streptomisin (%1) eklenmiştir. 0,22µm por çalplı filtreden geçirilerek strilizasyonu sağlanan medium +4°C'de saklanmıştır. Çoğaltma mediumu olarak %10 FBS içeren medium kullanılırken, deneyler %3'lük medium kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.4.2. SK-BR-3 Medium

440ml McCoy 5A Medium'a 50 ml FBS (%10), 5ml 1 L-glutamin (%1), 5ml Penicilin/Streptomisin (%1) ve 50µl (100ng/ml) Koleratoxin eklenmiştir. 0,22µm por çalplı filtreden geçirilerek strilizasyonu sağlanan medium +4°C'de saklanmıştır. Çoğaltma mediumu olarak %10 FBS içeren medium kullanılırken, deneyler %3'lük medium kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.4.3. Dondurma (Stok) Solüsyonu

Çoğaltılan hücrelerin bir bölümü ileri çalışmalar için kullanmak üzere dondurulmuştur. Stok solüsyonu dondurulacak hücrenin mediumu ile hazırlanmıştır ve %10 DMSO ve %20 FBS içermektedir. -20°C'de saklanmıştır.

3.1.4.4. Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate Buffered Saline (PBS))

500ml steril deiyonize suda 5 PBS tableti çözülerek 500ml PBS solüsyonu hazırlanmış ve +4°C'de saklanmıştır.

3.1.4.5. ETOH

Gereken oranlarda saf alkol ve distile su karıştırılarak elde edilmiştir. Hücre kültürü ortamları için %70, incelenen liyofilize maddelerin çözülmesinde ise %60 ETOH kullanılmıştır.

3.1.4.6. Doğal Maddeler

Çalışılan tüm fenolik bileşikler ve bitki ekstraktları WST-1 ve Annexin V uygulamalarında kullanılmak üzere ana stok son konsantrasyonları 500 µg/ ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Örneğin 5mg madde (Apigenin) tartılmış ve 10ml %60'lık EtOH'da çözülmüştür. Hazırlanan karışımın hücre soyları üzerindeki ekspresyonel değişimlerini incelemek üzere total hacmin 10ml olarak kullanıldığı T75 flasklarda doz verebilmek için ise ana stok 2000 µg/ ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Örneğin 5mg madde (Apigenin) tartılmış ve 2,5ml %60'lık EtOH'da çözülmüştür.

3.2. Hücre Kültürü Uygulamaları

Çalışmamızda kullanılan ER/PR (-) HER2 (+) meme kanseri hücre hattı SK-BR-3 ve triple negatif (ER/PR (-) HER2 (-)) meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 American Type Culture Collection (ATCC)'dan temin edilmiştir.

3.2.1. Hücre Çözme

Sıvı azotta (-196 ºC) 1 ml kriyovial içerisinde bulunan hücreler (≈2 milyon hücre) çıkarılarak 37°C su banyosunda hızlı bir şekilde eritilmiştir. Hücrelere büyütüldükleri mediumlardan 2ml eklenerek DMSO'nun zararlı etkileri minimalize edilerek hücreler 1500 rpm'de 5dk santrifüj edilmiştir. DMSO içeren süpernatantlar aspire edilerek hücreler büyüme mediumlarında tekrar çözülmüştür.

3.2.2. Hücre ekimi

Kendi mediumlarında çözülen hücreler T75 flasklara alınmış ve son hacim 10ml olacak şekilde büyüme mediumları eklenmiştir. Flasklar hücrelerin çoğalmaları için gerekli olan 37°C ve % 5 CO_2 ortamını sağlayan inkübatöre alınmıştır. Hücreler invert mikroskop altında incelenerek 2-3 günde bir mediumları tazelenerek çoğaltılmıştır.

3.2.3. Hücre Pasajlama

İnvert mikroskop altında takip edilen hücre hatları, %90 konfluent olduklarında (flaskın %90'ını kapladığında) pasaja alınmıştır. Pasajlanacak hücrelerin mediumları aspire edilerek mediumda bulunan ve tripsin inhibitörleri içeren serum kalıntısı kalmaması için PBS ile yıkanmıştır. PBS'in uzaklaştırılmasının ardından hücrelere özellikleri göz önüne alınarak ihtiyaç duydukları miktarlarda tripsin-EDTA (% 0.25, phenol red) uygulanmıştır. Tripsin'in işlevini yerine getirebilmesi için hücreler 5dk süre ile inkübatöre alınmıştır. İnvert mikroskop altında tüm hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı doğrulandıktan sonra tripsinin inaktive edilmesi için eklenen tripsinin iki katı miktarında, serum içeren medium eklenmiştir. 15ml'lik falkonlara alınan hücreler 1500 rpm'de 5dk santrifüj edilmiş ve tripsin içeren süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücreler 2ml medium ile sulandırılarak Beckman Coulter Vi-Cell Otomatik Hücre Sayım cihazında sayılmıştır. Elde edilen hücre sayısına göre her T75 flaskta 2-3 milyon hücre olacak şekilde flasklara bölünmüştür. Flasklar büyüme ortamlarını sağlayan inkübatöre alınmıştır.

3.2.4. Hücre Stoklama

Flasktaki medium aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Hücreler serumdan arındırılmak için PBS ile yıkanmıştır. PBS aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Hücreler inkübatörde tripsinle yaklaşık 5 dakika inkübe edilmiştir. Tripsin, hacminin en az iki katı serumlu medium ile inhibe edilmiştir. Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu

haline getirilip ve bir falkon tüpe aktarılmıştır. Hücre süspansiyonu santrifüjlenip (1500 rpm 5 dakika) süpernatant uzaklaştırılmıştır. Beckman Coulter Vi-Cell Otomatik Hücre Sayım cihazında sayılan hücreler ml'de yaklaşık 2 milyon hücre olacak sekilde %20 DMSO içeren stok solüsyonu (dondurma solüsyonu) ile süspanse edilerek 1'er ml 1,5 ml'lik kriyovial tüplere alınmıştır. -20°C birkaç saat tutulan hücreler, -80°C bir gece bırakıldıktan sonra sıvı azot tankına aktarılmıştır.

3.2.5. Hücre Sayımı

Hücre süspansiyonu santrifüjlenip (1500 rpm 5 dakika) ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücreler 2-3 ml besiyerinde sulandırılmıştır. Ölçme kabına 400 µl taze besiyeri konulmuştur. Hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak hücre ölçme kabına aktırılarak 1:5 oranında sulandırılmıştır. Beckman Coulter Vi-Cell Otomatik Hücre Sayım cihazında hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Cihaz tarafından verilen canlı hücre sayısı dilüsyon faktörü olan 5 ve toplam ml ile çarpılarak toplam hücre sayısı elde edilmiştir.

3.3. WST-1 Yöntemi ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

Bir tetrazolyum tuzu olan WST-1, mitakondride solunum zinciri enzimlerinden biri olan süksinat tetrazolyum redüktaz tarafından formazana çevrilmektedir. Bu enzim sadece canlı hücrelerde çalışmaktadır. Bu şekilde hücre sayısındaki bir artış, formazan oluşumunu da arttırmakta ve kültürdeki hücre sayısı ile direk bir korelasyona sahip olmaktadır.WST-1 deneyi için hücreler 100 µl'de $1x10^4$ hücre/kuyu olacak şekilde 96-kuyu platelere ekilmiştir. Daha sonra hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması için 24 saat beklenilmiştir. Uygun koşullara gelmiş hücreler mikroskopta gözlemlendikten sonra, flavonoidler farklı ve belirli dozlarda hücrelere uygulanmıştır. Hücre proliferasyonu, Cell Proliferation Reagent WST-1 kiti (Roche) kullanılarak analiz edilmiştir. Her kuyucuğa 10 µl WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium sodium salt) bileşiği eklenerek 37°C'de 3 saat inkübasyondan sonra, 24'üncü, 48'inci ve 72'nci saatlerdeki 450 nm (referans dalgaboyu 620 nm) ölçümleri Multiscan pektrofotometre cihazından alınmıştır (Roche WST-1 protokolü).

Agresif tip meme kanseri hücre hatları üzerinde etkili maddelerin ve dozlarının belirlenmesi amacı ile SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde çeşitli saf flavonoid maddeler ve bitki ekstraktları denenmiştir.

3.4. Annexin V ve 7-AAD Boyaları Kullanılarak Hücrelerin Apoptotik Durumunun Belirlenmesi

En etkin dozların hücre üzerindeki sitotoksik etkisinin apoptotik/nekrotik değerlendirmesi için Annexin-V 7-AAD metodu kullanılmıştır. Hücrenin apoptotik sürece girdiğinin göstergelerinden biri çift tabakalı hücre zarı yapısının iç tarafında yer alan fosfotidilserin fosfolipidlerinin hücre zarının dış yüzeyine hareketidir. Annexin-V fosfotidilserine yüksek afinite ile bağlanan Ca++ bağımlı bir fosfolipid bağlayıcı proteindir. Florokrom ile işaretlenmiş Annexin-V, flow sitometri cihazı ile dış yüzeye taşınmış fosfotidilserin moleküllerini belirlemektedir. Ayrıca bu yöntem ile hücrelerin nekroza uğradığını belirlemek amacıyla 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) boyası kullanılmaktadır. 7-AAD, nekrozda bütünlüğünü kaybetmiş hücre membranlarından hücre içine girebilmekte ve boyanmaktadır. Apoptoz deneyi Muse Cell Analyzer cihazıyla, Muse Annexin V Dead Cell Kit kullanılarak tespit edilmiştir.

Bunun için her hücre hattı tripsinizasyon işlemi ile flasklardan kaldırılıp Vi-Cell cihazı ile sayılarak 6 kuyulu platelere 250.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin tutunması ve farklılaşması için 24 saat beklendikten sonra %3 serum içeren herbir hücre hattına özgü medium platelerden çekilerek %20 ve %35 polifenol kokteyli ile muamele edilmiş ve 48 saat beklenmiştir. 48 saat sonra hücreler tripsinizasyon ile toplanarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatant uzaklaştırılıp pelet üzerine en az %1 FBS içeren medium eklenerek hücreler falkon dibinden hafif vorteks ile kaldırılmıştır. Süspanse hale gelen hücre karışımından 100 µL alınarak üzerine 100 µL Annexin V & Dead Cell Reagent eklenmiş ve 20 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası Muse Cell Analyzer ™ cihazı ile okuma yapılmıştır

3.5. Apoptoz ve Hücre Döngüsü Yolaklarındaki Ekspresyon Değişimlerinin Belirlenmesi

3.5.1. RNA izolasyonu

Her bir hücre hattı üç tekrarlı olacak şekilde 4 x 10^6 sayıda hücre T_{25} flasklara ekilmiştir. 24 saat sonra medium flasklardan uzaklaştırılarak kontrol hücrelerine taze medium, deney grubuna ise %20 oranında polifenolik kokteyl eklenerek inkübatöre kaldırılmıştır. 0 ve 48. saatlerde hem kontrol grubu hem de deney grubu flasklarından medium uzaklaştırılarak flasklara 350 µL Lysis Buffer eklenmiş ve flask yüzeyine yayılması sağlanmıştır. Scraper ile flask tabanı iyice kazındıktan sonra lizat, mikro

santrifüj tüplerine transfer edilmiştir. Üzerine 200 µL %96-100 etanol eklenerek 10 saniye vortekslenmiş ve kolona 600 µL'ye kadar lizat eklenerek 3500 x g'den yüksek hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolonda kalan lizat tekrar aynı santrifüj koşulunda tekrar santrifüj edilmiştir. Ardından kolona 400 µL Wash Solution eklenerek 14.000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve bu basamağın iki kere tekrarı yapılmıştır. Son olarak 14.000 x g'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra kolon, 1,5 mL'lik mikro santrifüj tüpüne yerleştirilerek üzerine 50 µL Elution Buffer eklenmiş ve önce 200 x g'de 2 dakika ardından 14.000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen RNA örnekleri kullanılıncaya dek -80 ^{o}C'de saklanmıştır.

3.5.2. RNA'ların Spektrofotometrik Ölçümü ve Eşitlenmesi

RNA'ların Nanodrop cihazı ile spektrofotometrik ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bunun için izole edilip -80 °C'de saklanan RNA'lar -80°C'den çıkartılarak buz üzerinde çözündürülmüştür. Nanodrop 2000 (Thermo Fisher) cihazı kullanılarak ilk olarak RNA'ların elute edildiği solüsyon 1 µl ölçülerek blank alınmıştır. Ardından tüm örnekler tek tek cihazda ölçülerek 260 nm'deki OD oranı ile RNAların saflık derecesi bulunmuştur. RNA saflığı 260/230 değerinin ≅2.0 aralığında olan örnekler çalışmaya dahil edilmiş ve örnekler 1000 ng/ul'ye eşitlenmiştir.

3.5.3. cDNA çevrimi

Her hücre hattının kontrol ve deney grupları için RNA miktarları eşitlendikten sonra BIO-RAD iScript cDNA Synthesis kit kullanılırak ters transkriptaz enzimi ile RNA'ların komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürülme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için kit protokolüne uygun olarak aşağıda verilen reaksiyon karışımı hazırlanarak 0.2 µl hacimli pcr tüplere dağıtılmış ardından gereken hacimde RNA'lar eklenmiştir.

İçerik	Reaksiyon başına hacim
• 5x iScript Reaction Mix	4 µl
• iScript Reverse Transcriptase	1 µl
• Nuclease-free water	değişken
• RNA template (100 fg–1 µg total RNA)*	değişken
Toplam hacim	20 µl

Sonrasında ise PCR cihazında kitte verilen protokol uygulanarak cDNA çevrim gerçekleştirilmiştir.

5 dk 25°C

20 min at 46°C

1 min at 95°C

3.5.4. Real Time PCR Uygulamaları

cDNA çevirimi gerçekleştikten sonra Apoptosis ve Cell Cycle PCR Panelleri kullanılarak yolaklarla ilgili 88'er genin ekspresyon değişimleri gözlemlenmiştir.

Bunun için 96 kuyucuklu stok plate ile gelen primerlere 40 µl DNAase RNAase free steril dH_2O eklenerek primerler çözündürülmüştür (10µM). Ardından 20 µl ana stok platetinden çekip üzerine 180 µl DNAase RNAase free steril dH_2O ekleyerek ara stok plate'i (1 µM) hazırlanmış ve Real Time PCR reaksiyonda bu konsantrasyondaki primerler kullanılmıştır. Hazırlamış olduğumuz 20 µl cDNA'lara 780 µl su ekleyerek cDNA'lar sulandırılmıştır. Reaksiyona hazır hale gelen primer ve cDNA'lar ile iTaq Universal SYBR Green Supermix kit protokolüne uygun şekilde reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Kit içerisindeki donmuş bileşenler çözünüdürülüp oda sıcaklığına getildikten sonra vortekslenip spin yapılarak ışıktan koruyacak şekilde buz üzerinde tutulmuştur.

İçerik	Reaksiyon başına hacim
iTaq Universal SYBR Green Supermix (2x)	5 µl
Forward and reverse primers	1 µl
cDNA	4 µl
Toplam hacim	10 µl

Roche 480 II Light Cycler cihazına özel plate'lere örnekler yüklendikten sonra aşağıda belirtilen protokol izlenmiştir.

• Denatürasyon	95 °C	5 dk
• Amplifikasyon	95 °C	10 sn
(45 siklus)	60 °C	45 sn
	72 °C	25 sn
• Soğutma	40 °C	20 sn

Reaksiyon sonrası Cp değerleri cihaz tarafından belirlenmiştir. ΔCp değerini belirlemek için ilk olarak yolakta yer alan tüm hedef genlerin Cp değeri, housekeeping gen olarak seçilen B2M Cp değerinden çıkarılmıştır. ΔΔCp değerini hesaplamak için ise PK ile müdahale edilmiş deney grubunun ΔCp değerinden, PK verilmemiş kontrol grubunun ΔCp değeri çıkarılmıştır. Azalan artan ekspresyon değişimleri (fold change) $2^{-\Delta\Delta Cp}$ formülü ile hesaplanarak belirlenmiştir.

3.6. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için Graphpad Prism 6.0 programı kullanılmıştır. WST-1 ve Annexin V- 7AAD analizleri için çift yönlü anova testi uygulanmıştır. P değeri 0.05'ten küçük olan değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

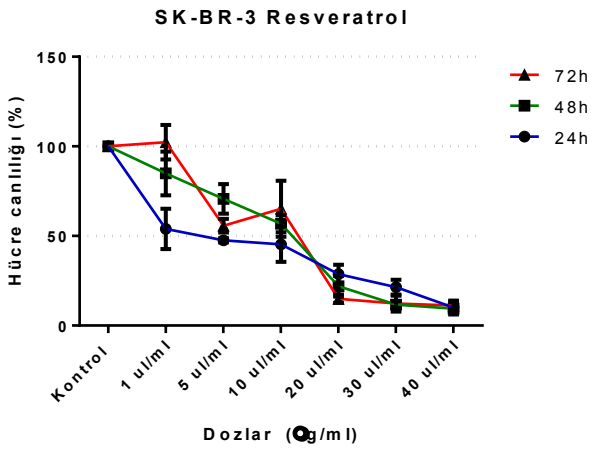
4.1. WST-1 Bulguları

SK-BR-3 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına çeşitli konsantrasyonlarda bireysel ve kombine olarak polifenol kokteyli uygulanmıştır. Hücrelerin ilgili maddelere olan duyarlılığı bireysel uygulamalarla belirlendikten sonra polifenol kokteyli hazırlanmış ve kombine olarak etkileri incelenmiştir. Önceki çalışmalarımızda hormon duyarlı meme kanseri hücre hatlarında etkisi belirlenen flavonoid karışımımız agresif tip meme kanseri hücre hatlarında da etki gösterecek farklı polifenolik maddeler ile zenginleştirilmiştir. Patent aşamasında olan polifenol kokteyli içeriğinde yer alan çeşitli maddelerden bazılarının bireysel etkileri ve kombine olarak agresif tip meme kanseri hücre hatları üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği WST-1 bulguları aşağıdaki gibidir.

4.1.1. Çeşitli polifenolik maddelerin SK-BR-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri

4.1.1.1. Resveratrol uygulaması

SK-BR-3 hücre hattında çeşitli dozlarda resveratrol uygulandığında 1µg/ml dozu dışında tüm doz ve saatlerde hücre canlılığında anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir (Şekil 4-1; Tablo 4-1).



Şekil 4-1: Resveratrol'ün SK-BR-3 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

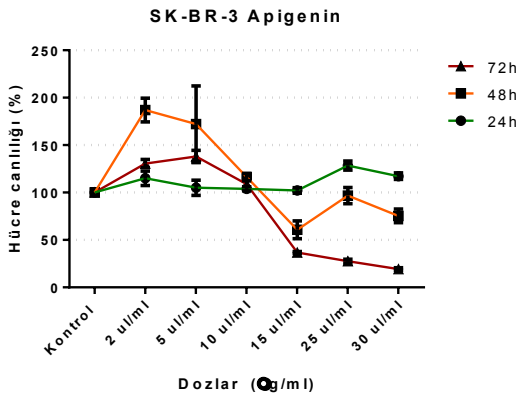
Tablo 4-1: Resveratrol'ün saatlere göre SK-BR-3 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

Resveratrol Doz	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
1 µg/mL	53,93 ± 11,30	<0,0001*	84,89 ± 12,23	0,0194	102,34 ± 9,65	0,9913
5 µg/mL	47,60 ± 1,11	<0,0001*	70,69 ± 8,24	<0,0001*	55,74 ± 3,81	<0,0001*
10 µg/mL	45,37 ± 9,79	<0,0001*	56,82 ± 4,72	<0,0001*	65,21 ± 15,6	< 0,0001*
20 µg/mL	28,69 ± 5,23	<0,0001*	21,89 ± 5,75	<0,0001*	14,98 ± 2,34	< 0,0001*
30 µg/mL	21,46 ± 4,08	<0,0001*	11,69 ± 1,85	<0,0001*	12,25 ± 4,42	< 0,0001*
40 µg/mL	10,06 ± 3,86	<0,0001*	9,41 ± 0,71	<0,0001*	11,22 ± 1,94	< 0,0001*

*istatistiksel anlamlılık, p<0.05

4.1.1.2. Apigenin uygulaması

SK-BR-3 hücre hatta apigenin uygulaması sonucunda 24. Saatte hücre canlılığında sadece 25 µg/mL dozunda artış dışında anlamlı fark görülmezken, 48. ve 72. Saatlerde 10µg/ml'dan düşük dozlarda hücre canlılığında artış, daha yüksek dozlarda ise özellikle 72.saatte anlamlı düşüş görülmüştür. Apigeninin SK-BR-3 hücre hattında daha yüksek dozlarda ve geç dönemde etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4-2; Tablo 4-2).



Şekil 4-2: Apigenin'in SK-BR-3 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

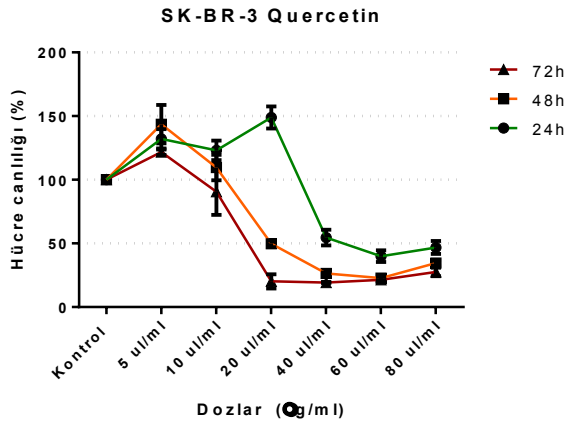
Tablo 4-2: Apigenin'in saatlere göre SK-BR-3 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

Apigenin Doz	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
2 µg/mL	115,05 ± 7,63	0,1132	186,97 ± 12,58	<0,0001*	130,60 ± 4,23	0,0004*
5 µg/mL	105,00 ± 8,04	0,937	172,27 ± 40,10	<0,0001*	138,04 ± 6,43	<0,0001*
10 µg/mL	103,95 ± 2,17	0,9784	116,26 ± 3,79	0,0752	108,92 ± 5,95	0,5737
15 µg/mL	102,21 ± 2,94	0,9982	60,74 ± 9,4	<0,0001*	36,72 ± 1,07	<0,0001*
25 µg/mL	128,39 ± 4,78	0,0004*	96,77 ± 8,6	0,9924	27,7 ± 2,05	<0,0001*
30 µg/mL	117,28 ± 3,49	0,052	75,38 ± 7,16	0,0023*	19,36 ± 1,4	<0,0001*

*istatistiksel anlamlılık, p<0.05

4.1.1.3. Quercetin uygulaması

SK-BR-3 hücre hattına quercetin uygulandığında düşük dozlarda tüm saatlerde hücre canlılığında anlamlı artış görülürken, erken dönemde 40 µg/ml daha geç dönemde ise 20 µg/ml dozundan itibaren anlamlı düşüş görülmüştür (Şekil 4-3; Tablo 4-3).



Şekil 4-3: Quercetin'in SK-BR-3 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

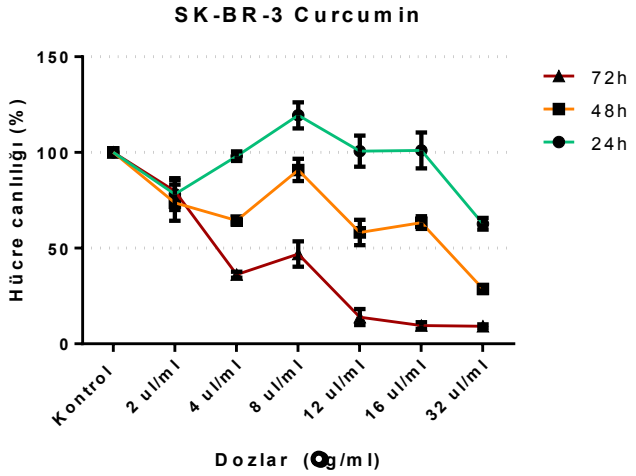
Tablo 4-3: Quercetin'in saatlere göre SK-BR-3 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

Quercetin Doz	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
5 µg/mL	132,16 ± 7,65	<0,0001*	143,64 ± 15,08	<0,0001*	121,67 ± 2,15	0,0002*
10 µg/mL	123,08 ± 7,73	<0,0001*	109,61 ± 9,99	0,2057	90,58 ± 18,15	0,2215
20 µg/mL	148,95 ± 8,65	<0,0001*	49,82 ± 2,78	<0,0001*	20,19 ± 5,52	<0,0001*
40 µg/mL	54,57 ± 6,18	<0,0001*	26,43 ± 0,89	<0,0001*	19,28 ± 0,41	<0,0001*
60 µL/mL	39,98 ± 4,62	<0,0001*	22,72 ± 1,55	<0,0001*	21,46 ± 1,64	<0,0001*
80 µL/mL	46,81 ± 5,08	<0,0001*	34,62 ± 1,91	<0,0001*	27,6 ± 3,36	<0,0001*

*istatistiksel anlamlılık, p<0.05

4.1.1.4. Curcumin Uygulaması

Bu hücre hattına curcumin uygulandığına tüm saatlerde benzer değişimler görülmüştür. Ancak hücre canlılığında anlamlı düşüşün geç dönemde görüldüğü söylenebilir (48.saat 8 µg/mL dozu dışında) (Şekil 4-4; Tablo 4-4).



Şekil 4-4: Curcumin'in SK-BR-3 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

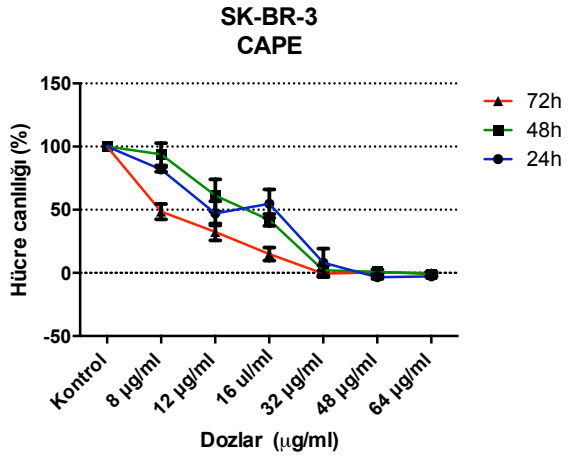
Tablo 4-4: Curcumin'in saatlere göre SK-BR-3 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

Curcumin Doz	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
2 µg/mL	78,24 ± 8,33	<0,0001*	73,75 ± 9,41	<0,0001*	79,79 ± 5,74	<0,0001*
4 µg/mL	98,07 ± 2,54	0,9882	64,48 ± 0,91	<0,0001*	36,19 ± 1,56	<0,0001*
8 µg/mL	119,39 ± 6,77	<0,0001*	90,87 ± 5,76	0,0656	46,96 ± 6,63	<0,0001*
12 µg/mL	100,7 ± 8,15	0,9997	58,21 ± 6,66	<0,0001*	13,99 ± 4,19	<0,0001*
16 µg/mL	101,08 ± 9,41	0,9996	63,34 ± 3,31	<0,0001*	9,52 ± 1,74	<0,0001*
32 µg/mL	62,71 ± 3,04	<0,0001*	28,64 ± 2,03	<0,0001*	9,16 ± 0,99	<0,0001*

*istatistiksel anlamlılık, p<0.05

4.1.1.5. CAPE uygulaması

Bu hücre hattına kafeik asit fenil ester (Caffeic acid phenyl esther, CAPE) uygulandığında 8 µg/ml dozundan itibaren tüm doz ve saatlerde anlamlı bir düşüş görülmektedir, 32 µg/ml dozuna gelindiğinde ise canlı hücre kalmamıştır (Şekil 4-5; Tablo 4-5).



Şekil 4-5: CAPE'in SK-BR-3 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

Tablo 4-5: CAPE'in saatlere göre SK-BR-3 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

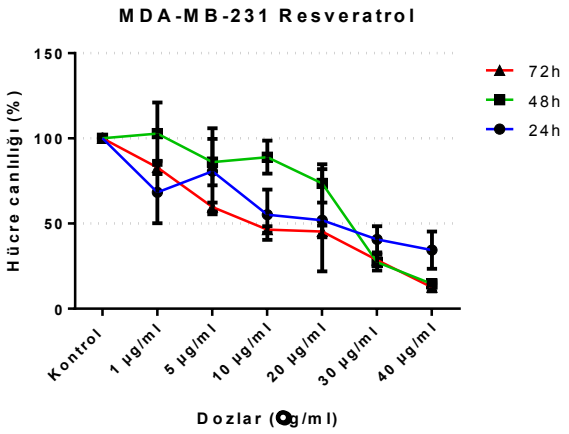
CAPE Doz	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
8 µg/mL	81.91 ± 1.25	0.0006*	93.85 ± 8.84	0.4563	48.57 ± 6.08	<0,0001*
12 µg/mL	47.16 ± 9.64	< 0.0001*	61.33 ± 12.82	<0,0001*	32.40 ± 6.67	<0,0001*
16 µg/mL	54.81 ± 11.25	< 0.0001*	41.86 ± 4.68	<0,0001*	14.88 ± 5.13	<0,0001*
32 µg/mL	8.09 ± 11.20	< 0.0001*	2.12 ± 3.80	<0,0001*	-0.66 ± 2.36	<0,0001*
48 µg/mL	-3.46 ± 1.29	< 0.0001*	0.85 ± 1.95	<0,0001*	0.34 ± 0.22	<0,0001*
64 µg/mL	-2.70 ± 0.67	<0,0001*	-0.93 ± 1.91	<0,0001*	-0.10 ± 0.64	<0,0001*

*istatistiksel anlamlılık, p<0.05

4.1.2. Çeşitli polifenolik maddelerin MDA-MB-231 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri

4.1.2.1. Resveratrol uygulaması

MDA-MB-231 hücre hattına resveratrol uygulandığında 24. Saatte 10 µg/ml dozundan itibaren, 48. Saatte 20 µg/ml dozundan itibaren, 72. saatte ise 5 µg/ml dozundan itibaren hücre canlılığında anlamlı düşüş gözlemlenmiştir (Şekil 4-6; Tablo 4-6).



Şekil 4-6: Resveratrolün'in MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

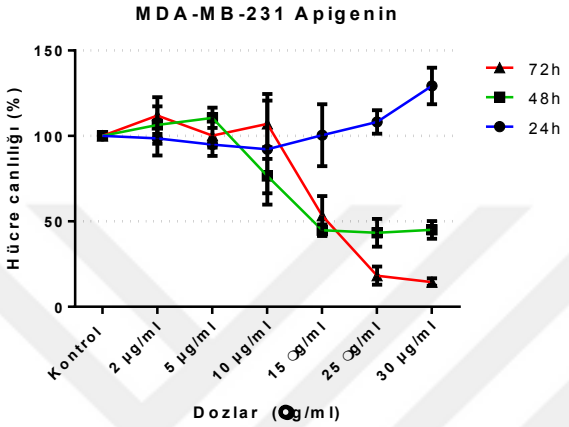
Tablo 4-6: Resveratrol'ün saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

Resveratrol Doz	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
1 µg/mL	76,57 ± 9,45	0,0002*	94,30 ± 8,81	0,748	82,97 ± 3,86	0,0037*
5 µg/mL	92,84 ± 8,51	0,5442	80,7 ± 10,21	0,0022*	59,66 ± 2,63	<0,0001*
10 µg/mL	61,66 ± 8,74	<0,0001*	88,95 ± 9,69	0,1042	46,47 ± 1,96	<0,0001*
20 µg/mL	66,1 ± 12,06	<0,0001*	73,61 ± 11,26	<0,0001*	45,33 ± 3,44	<0,0001*
30 µg/mL	40,73 ± 7,67	<0,0001*	27,37 ± 4,96	<0,0001*	28,59 ± 3,16	<0,0001*
40 µg/mL	34,38 ± 10,98	<0,0001*	14,60 ± 0,96	<0,0001*	12,58 ± 2,33	<0,0001*

*istatistiksel anlamlılık, p<0.05

4.1.2.2. Apigenin uygulaması

MDA-MB-231 hücre hattına çeşitli dozlarda apigenin uygulandığında 24. Saat 30 µg/ml dozunda anlamlı bir hücre artışı, 48. ve 72. Saatlerde ise 15 µg/ml dozundan itibaren anlamlı hücre canlılığı düşüşü gözlemlenmiştir. Bu hücre hattında apigeninin geç dönemde sitotoksik etki gösterdiği söylenebilir (Şekil 4-7; Tablo 4-7).



Şekil 4-7: Apigenin'in MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

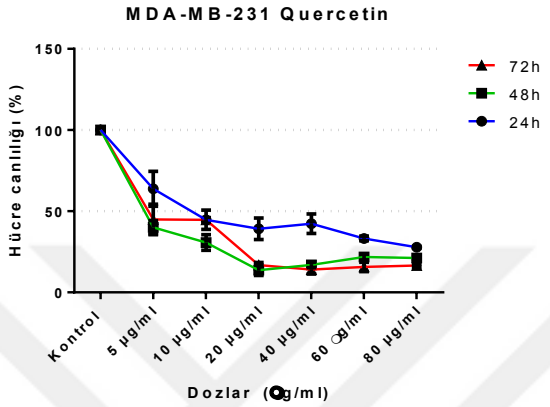
Tablo 4-7: Apigenin'in saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

Apigenin Doz	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
2 µg/mL	98,62 ± 10,05	0,9997	106,4 ± 10,95	0,923	111,91 ± 10,78	0,5588
5 µg/mL	94,95 ± 1,79	0,9813	101,21 ± 19,37	0,9998	100,14 ± 11,81	> 0,9999
10 µg/mL	92,2 ± 32,37	0,8757	76,52 ± 10,04	0,0242	107,03 ± 13,63	0,9176
15 µg/mL	100,39 ± 18,11	> 0,9999	44,79 ± 3,36	<0,0001*	53,36 ± 11,43	<0,0001*
25 µg/mL	108,19 ± 6,82	0,8517	43,29 ± 8,11	<0,0001*	18,23 ± 5,33	<0,0001*
30 µg/mL	129,28 ± 10,7	0,003*	45,00 ± 5,22	<0,0001*	14,5 ± 2,17	<0,0001*

*istatistiksel anlamlılık, p<0.05

4.1.2.3. Quercetin uygulaması

Bu hücre hattına quercetin uygulandığında tüm doz ve saatlerde anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir. 5 µg/ml gibi düşük dozlarda bile oldukça etkili olduğu görülmüştür (Şekil 4-8; Tablo 4-8).



Şekil 4-8: Quercetin'in MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

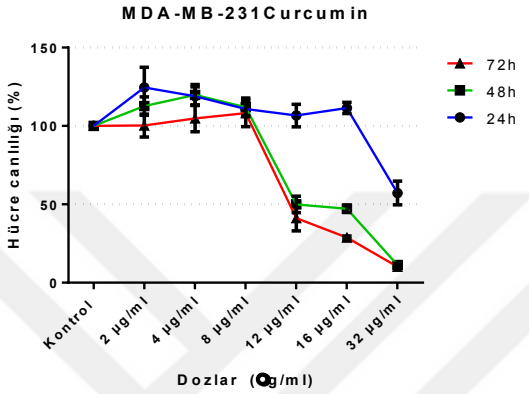
Tablo 4-8: Quercetin'in saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

Quercetin Doz	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
5 µg/mL	63,84 ± 10,73	<0,0001*	40,11 ± 4,1	<0,0001*	44,98 ± 9,39	<0,0001*
10 µg/mL	44,74 ± 5,94	<0,0001*	30,74 ± 4,81	<0,0001*	44,68 ± 1,37	<0,0001*
20 µg/mL	39,16 ± 6,60	<0,0001*	13,67 ± 3,20	<0,0001*	16,82 ± 1,56	<0,0001*
40 µg/mL	42,29 ± 5,99	<0,0001*	16,97 ± 1,78	<0,0001*	14,04 ± 2,75	<0,0001*
60 µg/mL	33,24 ± 1,47	<0,0001*	21,83 ± 1,9	<0,0001*	15,68 ± 2,91	<0,0001*
80 µg/mL	27,79 ± 0,567	<0,0001*	21,22 ± 0,58	<0,0001*	16,52 ± 0,96	<0,0001*

*istatistiksel anlamlılık, $p<0.05$

4.1.2.4. Curcumin uygulaması

Bu hücre hattına çeşitli dozlarda curcumin uygulandığında düşük dozlarda hücre sayısında artış, 24. Saatte sadece en yüksek dozda (32 µg/ml) hücre canlılığında anlamlı düşüş görülmüştür. Bu hücrede curcuminin sitotoksik etkisi geç dönem ve 12 µg/ml dozundan itibaren gözlemlenmiştir (Şekil 4-9; Tablo 4-9).



Şekil 4-9: Curcumin'in MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

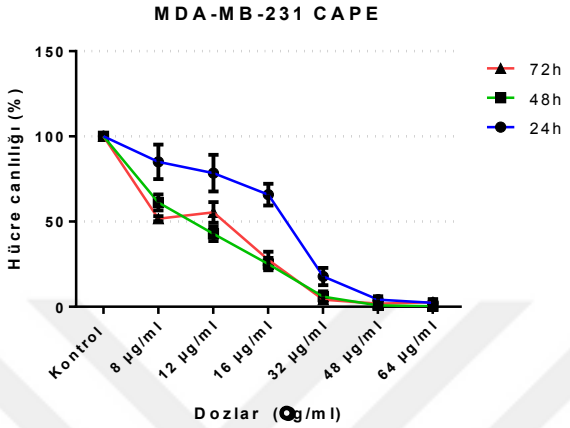
Tablo 4-9: Curcumin'in saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

Curcumin Doz	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
2 µg/mL	124,55 ± 12,92	<0,0001*	112,68 ± 5,83	0,0199	100,28 ± 7,31	> 0,9999
4 µg/mL	118,98 ± 5,96	0,0002*	119,84 ± 6,58	<0,0001*	104,82 ± 8,45	0,7286
8 µg/mL	110,83 ± 4,19	0,0941	111,94 ± 5,87	0,0533	108,14 ± 8,58	0,2347
12 µg/mL	106,64 ± 7,19	0,426	49,94 ± 5,21	<0,0001*	41,16 ± 8,14	<0,0001*
16 µg/mL	111,46 ± 3,55	0,0421	47,22 ± 2,37	<0,0001*	28,85 ± 1,01	<0,0001*
32 µg/mL	57,22 ± 7,58	<0,0001*	11,31 ± 1,07	<0,0001*	10,2 ± 1,06	<0,0001*

*istatistiksel anlamlılık, p<0.05

4.1.2.5. CAPE uygulaması

MDA-MB-231 hücre hattına CAPE uygulandığında tüm doz ve saatlerde anlamlı sitotoksik etki gözlemlenmiştir (Şekil 4-10; Tablo 4-10).



Şekil 4-10: CAPE'nin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

Tablo 4-10: CAPE'in saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

CAPE Doz	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
8 µg/mL	85,11 ± 10,12	0,0001*	61,23 ± 4,71	<0,0001*	51,70 ± 1,53	<0,0001*
12 µg/mL	78,41 ± 10,73	<0,0001*	42,87 ± 4,29	<0,0001*	55,39 ± 6,08	<0,0001*
16 µg/mL	65,83 ± 6,39	<0,0001*	25,01 ± 3,62	<0,0001*	27,6 ± 4,73	<0,0001*
32 µg/mL	17,76 ± 5,07	<0,0001*	5,92 ± 3,15	<0,0001*	4,13 ± 1,81	<0,0001*
48 µg/mL	4,18 ± 2,06	<0,0001*	0,86 ± 0,67	<0,0001*	1,76 ± 0,59	<0,0001*
64 µg/mL	2,25 ± 2,24	<0,0001*	0,34 ± 0,3	<0,0001*	2,73 ± 1,6	<0,0001*

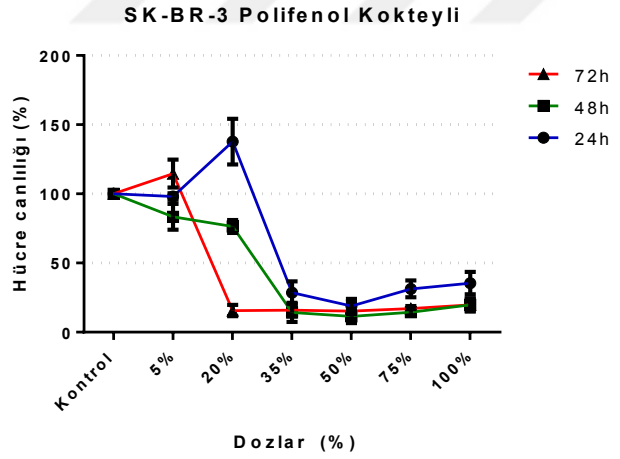
*istatistiksel anlamlılık, $p<0.05$

4.1.3. Polifenol kokteylinin hücre hatları üzerindeki etkisi

Farklı hücre hatlarında anlamlı bireysel etkisi gözlemlenmiş maddelerden etkili dozlarına göre bir polifenolik madde kokteyli hazırlanmış ve SK-BR-3 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında etkileri incelenmiştir.

4.1.3.1. SK-BR-3 hücre hattı üzerindeki etkisi

SK-BR-3 hücre hattına hazırlanan polifenol kokteyli (PK) çeşitli oranlarda uygulandığında 24. Saatte %20 polifenol kokteyli içeren dozda hücre proliferasyonunda artış gözlemlense de %20'den yüksek dozlarda tüm saatlerde anlamlı bir sitotoksik etki görülmüş, özellikle %35 dozunda ise hücre canlılığında ileri derecede bir düşüş görülmüştür (Şekil 4-11; Tablo 4-11).



Şekil 4-11: PKnın SK-BR-3 hücre hattı üzerindeki etkisi

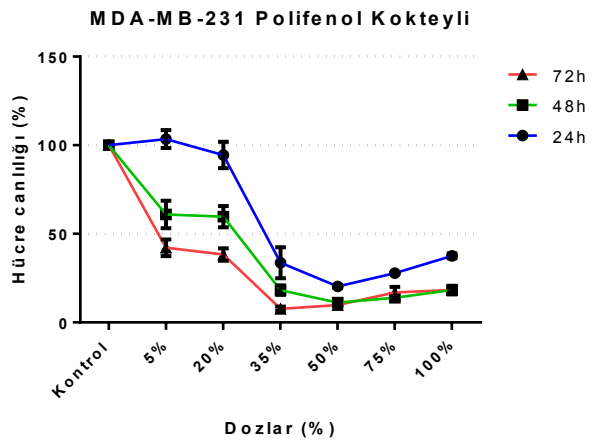
Tablo 4-11: PKnın saatlere göre SKBR3 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

PK Doz	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
% 5	98,14 ± 2,32	0,9957	83,39 ± 9,30	0,002*	114,66 ± 10,14	0,0075
% 20	137,72 ± 16,46	<0,0001*	76,35 ± 4,68	<0,0001*	15,65 ± 4,02	<0,0001*
% 35	28,52 ± 8,17	<0,0001*	14,30 ± 6,88	<0,0001*	15,92 ± 4,53	<0,0001*
% 50	18,95 ± 3,40	<0,0001*	11,34 ± 1,75	<0,0001*	15,28 ± 8,75	<0,0001*
% 75	31,31 ± 6,05	<0,0001-	14,38 ± 2,43	<0,0001*	17,15 ± 1,74	<0,0001*
% 100	35,45 ± 8,07	<0,0001*	19,75 ± 4,77	<0,0001*	19,67 ± 4,1	<0,0001*

*istatistiksel anlamlılık, p<0.05

4.1.3.2. MDA-MB-231 hücre hattı üzerine etkisi

MDA-MB-231 hücre hattına çeşitli oranlarda PK uygulandığında erken dönemde %35 dozundan itibaren, geç dönemlerde ise tüm dozlarda anlamlı sitotoksik etki görülmüştür Şekil 4-12; Tablo 4-12).



Şekil 4-12: PKnın MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki etkisi

Tablo 4-12: PKnın saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

PK Doz	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
% 5	103,47 ± 5,03	0,685	60,98 ± 7,74	<0,0001*	42,17 ± 4,70	<0,0001*
% 20	94,47 ± 7,41	0,2389	59,70 ± 6,02	<0,0001*	38,33 ± 3,51	<0,0001*
% 35	33,71 ± 8,75	<0,0001*	18,24 ± 2,73	<0,0001*	7,70 ± 1,20	<0,0001*
% 50	20,36 ± 0,77	<0,0001*	11,13 ± 1,05	<0,0001*	9,78 ± 0,58	<0,0001*
% 75	27,75 ± 0,36	<0,0001*	13,88 ± 0,66	<0,0001*	16,98 ± 3,022	<0,0001*
% 100	37,61 ± 1,38	<0,0001*	18,31 ± 1,23	<0,0001*	18,26 ± 2,41	<0,0001*

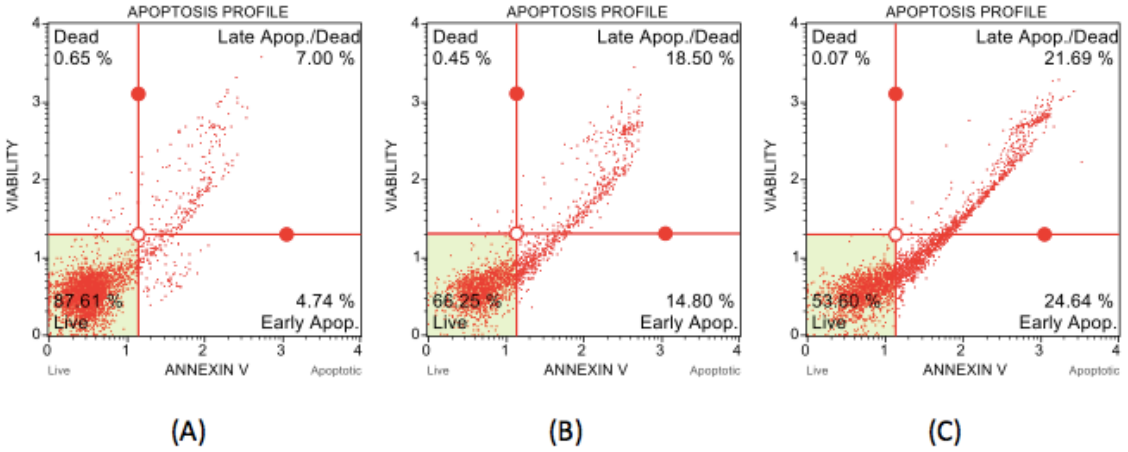
*istatistiksel anlamlılık, p<0.05

4.2. Annexin V /7-AAD Apoptoz analizi bulguları

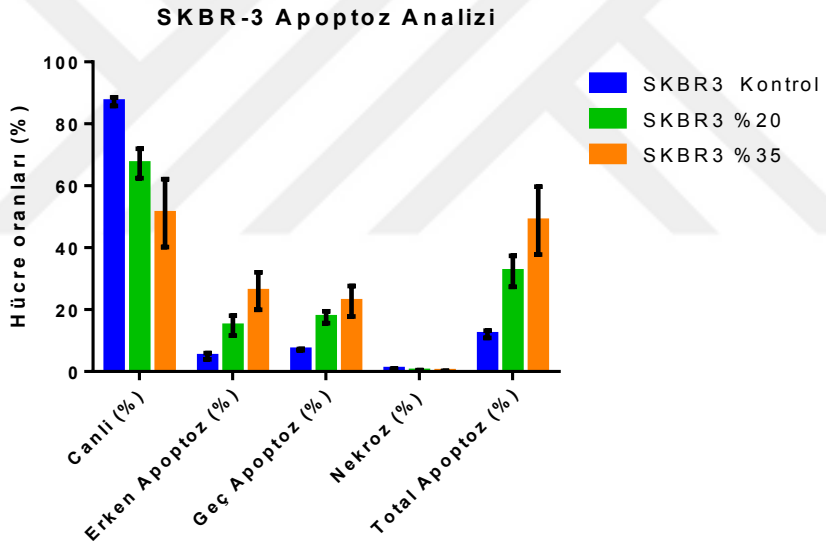
WST-1 analizi ile etkinliği görülen polifenol kokteylinin, hücre canlılığı üzerindeki inhibisyonunun Annexin V ve 7-AAD boyaları kullanılarak apoptotik veya nekrotik yollar üzerinden gösterip göstermediği araştırılmıştır. Her hücre hattında kontrol (doz verilmemiş) ile %20 ve %35 dozu uygulanmış hücreler 48. Saatte incelenmiştir.

4.2.1. SK-BR-3 hücre hattı

SK-BR-3 hücre hattında apoptoz analizi sonucunda kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında PK uygulanmış hücrelerde canlılık oranında her iki dozda da anlamlı bir düşüş görülmüştür. Her iki dozda da kontrole göre geç, erken ve total apoptotik hücreler anlamlı oranda daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4-14; Şekil 4-15; Tablo 4-14).



Şekil 4-13: MDA-MB-231 hücre hattında PK apoptoz analizi sonuçları dot plot görüntüleri



Şekil 4-14: SK-BR-3 hücre hattında PK apoptoz analizi sonuçlarının kontrol ile karşılaştırılması

Tablo 4-13: Farklı dozlarda PK uygulanmış SK-BR-3 hücre hatları apoptoz analizi

SK-BR-3	Ort. ± SD	Ort. ± SD	p değeri	Ort. ± SD	p değeri
	Kontrol (%)	%20 PK (%)	Kontrol vs. %20 PK	%35 PK (%)	Kontrol vs. %35 PK
Canlı (%)	87,2 ± 1,37	67,19 ± 4,74	< 0,0001*	51,13 ± 10,96	< 0,0001*
Erken Apoptoz (%)	4,96 ± 0,98	14,82 ± 3,22	0,0384*	26,00 ± 6,04	< 0,0001*
Geç Apoptoz	7,08 ± 0,19	17,54 ± 1,92	0,0272*	22,74 ± 4,92	0,0011*

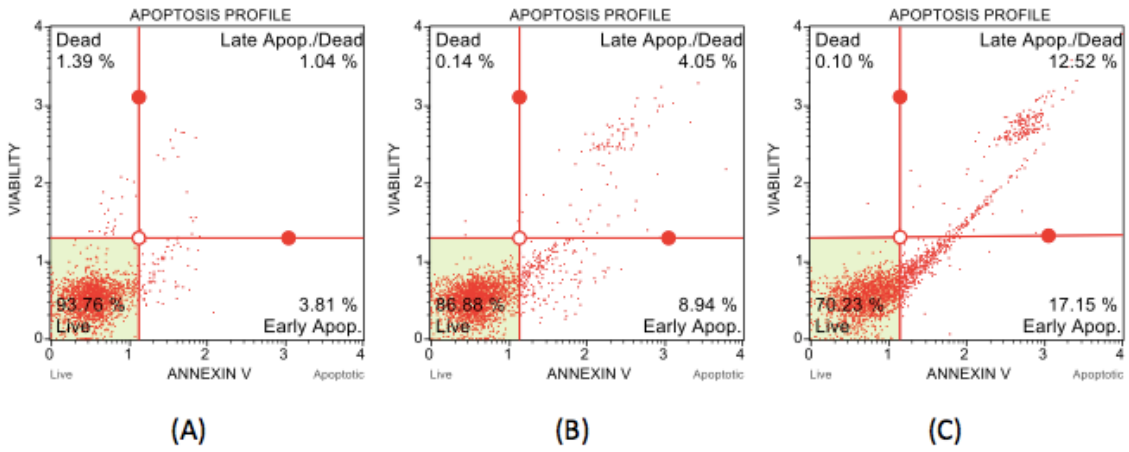
(%)					
Nekrotik (%)	0,76 ± 0,21	0,23 ± 0,2	0,9874	0,14 ± 0,06	0,9828
Total Apoptoz (%)	12,04 ± 1,17	32,36 ± 5,03	< 0,0001*	48,73 ± 10,96	< 0,0001*

*istatistiksel anlamlılık, p<0.05

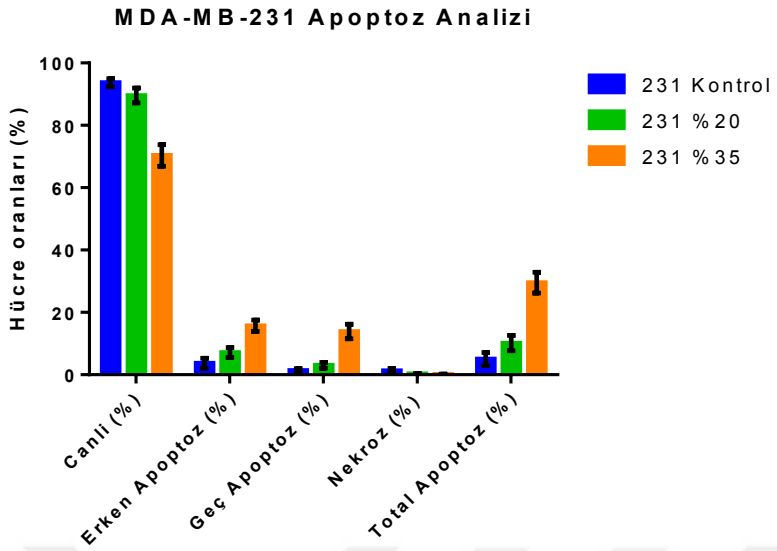
PK uygulanmış SK-BR-3 hücrelerinde canlılık ve apoptotik durum incelendiğinde %35 dozunun %20'ye göre daha yüksek oranda olması ile birlikte her iki doz uygulamasının da hücreleri apoptoza sürüklediği görülmektedir.

4.2.2. MDA-MB-231 hücre hattı

MDA-MB-231 hücre hattında apoptoz analizi sonucunda kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında PK'nın her iki dozunda da canlılık oranında anlamlı bir düşüş görülmüştür. PK %35 dozunda kontrole göre geç apoptozdaki ve total apoptotik hücrelerde %35 dozunda kontrole göre anlamlı bir artış belirlenmiş, %20 dozunda ise sadece total apoptotik hücrelerde anlamlılık görülmüştür (Şekil 4-15; Tablo 4-15).



Şekil 4-15: MDA-MB-231 hücre hattında PK apoptoz analizi sonuçları dot plot görüntüleri



Şekil 4-16: MDA-MB-231 hücre hattında PK apoptoz analizi sonuçlarının kontrol ile karşılaştırılması

Tablo 4-14: Farklı dozlarda PK uygulanmış MDA-MB-231 hücre hatları apoptoz analizi

MDA-MB-231	Ort. ± SD Kontrol (%)	Ort. ± SD %20 PK (%)	p değeri Kontrol vs. %20 PK	Ort. ± SD %35 PK (%)	p değeri Kontrol vs. %35 PK
Canlı (%)	93,68 ± 1,3	89,58 ± 2,36	0,027*	70,34 ± 3,43	< 0,0001*
Erken Apoptoz (%)	3,68 ± 1,59	7,12 ± 1,57	0,068	15,68 ± 1,84	< 0,0001*
Geç Apoptoz (%)	1,38 ± 0,56	3,02 ± 0,94	0,4852	13,89 ± 2,34	< 0,0001*
Nekrotik (%)	1,26 ± 0,78	0,27 ± 0,12	0,7592	0,1 ± 0,1	0,6854
Total Apoptoz (%)	5,06 ± 2,07	10,15 ± 2,48	0,0059*	29,57 ± 3,34	< 0,0001*

*istatistiksel anlamlılık, p<0.05

4.3. PCR Array Bulguları

SK-BR-3 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında uygulanan PK'nın indüklediği eksresyonel değişimler 0. ve 48. saatlerde %20 dozunda incelenmiştir. Ekspresyonel değişimler B2M endojen kontrolüne göre hesaplanmıştır. Son olarak da 0. ve 48. Saatler arasındaki değişim değerlendirilmiştir.

4.3.1. SK-BR-3 hücre hattı

Tablo 4-15: SKBR-3 Apoptoz paneli ekspresyon değişimleri

Gen Kodu	Gen adı	0.saat FC	48.saat FC	48-0 farkı	Eksp. Durumu
MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	-228737.49	3.12	228740.62	Up regüle
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	-40342.14	39.67	40381.81	Up regüle
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	-2836.70	-1.91	2834.79	Up regüle
TNFRSF10C	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c	-461.44	-2.39	459.05	Up regüle
TNFRSF9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	-366.67	-1.58	365.08	Up regüle
TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	-4.02	148.40	152.42	Up regüle
TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	-65.34	4.78	70.12	Up regüle
TRAF4	TNF receptor-associated factor 4	-55.27	4.02	59.29	Up regüle
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	2.33	59.16	56.84	Up regüle
BAG3	BCL2-associated athanogene 3	-53.45	1.46	54.91	Up regüle
TNFRSF8	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8	-49.46	5.02	54.49	Up regüle
BIRC6	Baculoviral IAP repeat-containing 6 (apollon)	-49.46	1.20	50.66	Up regüle
TRAF5	TNF receptor-associated factor 5	-38.72	1.68	40.40	Up regüle
CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor	-6.76	15.78	22.54	Up regüle
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	-18.34	2.12	20.46	Up regüle
TANK	TRAF family member-associated NFKB activator	-16.87	2.91	19.78	Up regüle

BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	-15.10	1.02	16.12	Up regüle
CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine protease	-14.12	1.42	15.55	Up regüle
TNFRSF17	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	-12.13	1.29	13.42	Up regüle
CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	-13.99	-1.02	12.98	Up regüle
RPA3	Replication protein A3, 14kDa	-11.82	1.06	12.88	Up regüle
DAPK2	Death-associated protein kinase 2	-1.42	10.98	12.40	Up regüle
LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)	-10.51	1.26	11.77	Up regüle
BIRC2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	-9.80	1.88	11.69	Up regüle
APAF1	Apoptotic protease activating factor	-9.89	1.47	11.37	Up regüle
TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	-3.15	8.02	11.16	Up regüle
TNFSF13B	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	-8.46	2.18	10.63	Up regüle
BIRC4	Baculoviral IAP repeat-containing 4	-5.86	4.01	9.87	Up regüle
CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine protease	-6.67	3.08	9.74	Up regüle
BFAR	Bifunctional apoptosis regulator	-4.56	4.48	9.04	Up regüle
BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	-4.71	3.86	8.58	Up regüle
CIDEA	Cell death-inducing DFFA-like effector a	-1.35	7.18	8.53	Up regüle
BAK1	BCL2-antagonist/killer 1	-7.09	1.33	8.43	Up regüle
BOK	BCL2-related ovarian killer	-3.14	5.27	8.40	Up regüle
BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10	-3.08	5.23	8.31	Up regüle

TNFRSF10D	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d	-2.28	5.75	8.03	Up regüle
BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	-1.55	6.45	8.00	Up regüle
BIRC1	Baculoviral IAP repeat-containing 1	-6.15	1.56	7.71	Up regüle
HRK	Harakiri, BCL2 interacting protein	-4.78	2.85	7.63	Up regüle
TNFSF15	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	-4.55	2.91	7.47	Up regüle
CARD4	Caspase recruitment domain family, member 4	-3.94	3.35	7.29	Up regüle
CASP6	Caspase 6, apoptosis-related cysteine protease	-2.92	4.35	7.27	Up regüle
TNFSF9	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	-8.59	-1.39	7.21	Up regüle
BRE	Brain and reproductive organ-expressed	-4.53	2.51	7.04	Up regüle
BCL2L1	BCL2-like 1	-4.07	2.53	6.59	Up regüle
CASP4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	-3.55	2.52	6.06	Up regüle
TNFSF11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	-3.19	2.74	5.94	Up regüle
ATM	Ataxia telangiectasia mutated	-2.92	2.94	5.86	Up regüle
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	-3.26	2.42	5.68	Up regüle
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	-4.16	1.49	5.65	Up regüle
BCL2L2	BCL2-like 2	-3.84	1.33	5.17	Up regüle
BAG1	BCL2-associated athanogene	-2.03	3.10	5.13	Up regüle
BAX	BCL2-associated X protein	-6.19	-1.27	4.92	Up regüle
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	-1.49	3.32	4.81	Up regüle

CASP8AP2	CASP8 associated protein 2	-2.59	2.21	4.80	Up regüle
CD40	CD40 antigen (TNF receptor superfamily member 5)	-2.71	2.04	4.75	Up regüle
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	-2.98	1.49	4.47	Up regüle
TNFSF7	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7	-1.18	3.29	4.47	Up regüle
CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	-2.71	1.47	4.18	Up regüle
CASP10	Caspase 10, apoptosis-related cysteine protease	-1.46	2.53	3.99	Up regüle
BAG4	BCL2-associated athanogene 4	-6.62	-2.78	3.84	Up regüle
TRAF1	TNF receptor-associated factor 1	-1.31	2.14	3.45	Up regüle
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	-1.20	1.59	2.79	Up regüle
CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine protease	-4.53	-1.74	2.79	Up regüle
BCL2A1	BCL2-related protein A1	-1.09	1.29	2.38	Up regüle
DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide	2.07	4.05	1.98	NS
TNFRSF21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	-2.77	-2.04	0.72	NS
CIDEB	Cell death-inducing DFFA-like effector b	1.52	1.79	0.27	NS
TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	2.47	2.42	-0.05	NS
TNFSF13	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	-1.00	-1.19	-0.18	NS
TNFSF4	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4	1.59	1.32	-0.27	NS
CASP5	Caspase 5, apoptosis-related cysteine protease	3.30	2.80	-0.50	NS
TP73L	Tumor protein p73-like	1.76	1.06	-0.70	NS
TNFSF18	Tumor necrosis factor (ligand)	-1.72	-2.54	-0.82	NS

	superfamily, member 18				
CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	2.96	1.96	-1.01	NS
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)	1.01	-1.13	-2.14	Down regüle
DFFB	DNA fragmentation factor, 40kDa, beta polypeptide	-3.02	-5.25	-2.22	Down regüle
TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	-6.51	-9.00	-2.49	Down regüle
TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	2.13	-1.12	-3.25	Down regüle
TP53	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	2.35	-2.27	-4.62	Down regüle
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	1.87	-3.31	-5.18	Down regüle
DAPK1	Death-associated protein kinase 1	12.44	6.92	-5.52	Down regüle
RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	1.06	-5.84	-6.90	Down regüle
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	1.93	-6.05	-7.98	Down regüle
TNFSF8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8	3.50	-19.47	-22.97	Down regüle
TRIP	TRAF interacting protein	30.31	6.92	-23.39	Down regüle
CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine protease	36.34	-2.41	-38.74	Down regüle
CD40LG	CD40 ligand (TNF superfamily, member 5)	530.06	2.51	-527.54	Down regüle

İki kat üzeri kat değişimleri (FC) anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 4-16: SKBR-3 Hücre döngüsü paneli ekspresyon değişimleri

Gen Kodu	Gen adı	0.saat FC	48.saat FC	48-0 farkı	Eksp. Durumu
MNAT1	Menage a trois homolog 1, cyclin H assembly factor (Xenopus laevis)	-102.77	-1.42	101.35	Up regüle
RBBP8	Retinoblastoma binding protein 8	-15.53	1.42	16.95	Up regüle
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related	-1.15	14.42	15.57	Up

					regüle
CDC16	Cell division cycle 16 homolog (S. cerevisiae)	-15.42	-3.85	11.57	Up regüle
CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B	-5.34	4.65	9.99	Up regüle
CDC20	Cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	-12.89	-3.02	9.87	Up regüle
CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	-1.91	6.73	8.64	Up regüle
RB1	Retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)	-6.25	1.71	7.96	Up regüle
SUMO1	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (S. cerevisiae)	-1.32	6.44	7.76	Up regüle
GTF2H1	General transcription factor IIH, polypeptide 1, 62kDa	-2.34	4.94	7.28	Up regüle
GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1	-4.18	2.87	7.05	Up regüle
DDX11	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 11 (CHL1-like helicase homolog, S. cerevisiae)	-2.26	1.47	3.73	Up regüle
NBN	Nibrin	1.96	5.41	3.46	Up regüle
CCNG2	Cyclin G2	-1.70	1.04	2.73	Up regüle
RAD17	RAD17 homolog (S. pombe)	-1.01	1.63	2.64	Up regüle
CUL2	Cullin 2	-1.30	1.16	2.46	Up regüle
RBL2	Retinoblastoma-like 2 (p130)	-2.48	-1.18	1.30	NS
KPNA2	Karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	2.74	3.93	1.19	NS
KNTC1	Kinetochore associated 1	1.75	2.84	1.09	NS
RPA3	Replication protein A3, 14kDa	1.00	1.84	0.83	NS
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	-5.72	-5.00	0.72	NS
RAD1	RAD1 homolog (S. pombe)	1.17	1.51	0.34	NS
RBL1	Retinoblastoma-like 1 (p107)	1.64	1.72	0.09	NS
CDK5R1	Cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	-1.41	-1.72	-0.31	NS

CCNB2	Cyclin B2	-1.66	-2.07	-0.41	NS
BRCA2	Breast cancer 2, early onset	-1.42	-1.89	-0.47	NS
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	-1.15	-1.62	-0.47	NS
BAX	BCL2-associated X protein	-1.58	-2.30	-0.72	NS
BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	2.45	1.19	-1.26	NS
SERTAD1	SERTA domain containing 1	4.19	2.77	-1.42	NS
CDC2	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	3.43	2.00	-1.43	NS
CCNA1	Cyclin A1	2.89	1.06	-1.83	NS
ANAPC2	Anaphase promoting complex subunit 2	1.23	-1.09	-2.32	Down regüle
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	1.24	-1.08	-2.32	Down regüle
CCNG1	Cyclin G1	1.04	-2.03	-3.07	Down regüle
MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	1.55	-1.77	-3.32	Down regüle
CDKN2A-3	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	1.68	-1.67	-3.35	Down regüle
CCNT1	Cyclin T1	2.45	-1.15	-3.60	Down regüle
DIRAS3	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 3	1.33	-2.29	-3.62	Down regüle
GADD45A-6	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	1.95	-1.69	-3.63	Down regüle
CCNA2	Cyclin A2	2.02	-1.66	-3.68	Down regüle
CDK7	Cyclin-dependent kinase 7 (MO15 homolog, Xenopus laevis, cdk-activating kinase)	2.69	-1.13	-3.83	Down regüle
CCND2	Cyclin D2	2.09	-1.77	-3.86	Down regüle
SUMO2	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (S. cerevisiae)	1.43	-2.67	-4.10	Down regüle
UBE1	Ubiquitin-activating enzyme E1 (A1S9T and BN75 temperature sensitivity complementing)	2.99	-1.12	-4.11	Down regüle
HUS1	HUS1 checkpoint homolog (S. pombe)	2.25	-1.92	-4.17	Down

					regüle
CDK5RAP1	CDK5 regulatory subunit associated protein 1	2.37	-1.96	-4.33	Down regüle
BCCIP	BRCA2 and CDKN1A interacting protein	1.73	-2.74	-4.47	Down regüle
CDC34	Cell division cycle 34 homolog (S. cerevisiae)	-1.59	-6.42	-4.83	Down regüle
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	3.85	-1.21	-5.06	Down regüle
CCNE1	Cyclin E1	1.97	-3.15	-5.11	Down regüle
BRCA1	Breast cancer 1, early onset	6.38	1.01	-5.37	Down regüle
MCM3	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae)	1.49	-3.94	-5.43	Down regüle
HERC5	Hect domain and RLD 5	3.97	-1.50	-5.47	Down regüle
CCNH	Cyclin H	3.18	-2.33	-5.51	Down regüle
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	3.94	-1.57	-5.51	Down regüle
MCM4	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (S. cerevisiae)	2.63	-3.01	-5.64	Down regüle
CDKN2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	1.75	-4.10	-5.85	Down regüle
MCM67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	3.73	-2.36	-6.09	Down regüle
CCNF	Cyclin F	4.37	-2.31	-6.68	Down regüle
MCM2	MCM2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin (S. cerevisiae)	5.79	-1.22	-7.01	Down regüle
CCNE2	Cyclin E2	2.69	-4.39	-7.08	Down regüle
CDK8	Cyclin-dependent kinase 8	3.58	-3.55	-7.13	Down regüle
TFDP2	Transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)	-1.95	-9.13	-7.17	Down regüle
CUL1	Cullin 1	2.35	-4.96	-7.30	Down

					regüle
CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	-3.83	-11.34	-7.51	Down regüle
CCNC	Cyclin C	3.69	-4.75	-8.44	Down regüle
CUL3	Cullin 3	2.37	-8.04	-10.40	Down regüle
CCND1	Cyclin D1	1.67	-8.73	-10.41	Down regüle
E2F4	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding	9.50	-1.87	-11.37	Down regüle
CDKN2C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	3.34	-9.96	-13.30	Down regüle
ANAPC4	Anaphase promoting complex subunit 4	8.48	-6.03	-14.51	Down regüle
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	4.00	-12.41	-16.41	Down regüle
DNM2	Dynamin 2	3.21	-14.79	-18.00	Down regüle
CDK5	Cyclin-dependent kinase 5	17.39	-2.05	-19.43	Down regüle
CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	6.98	-15.76	-22.74	Down regüle
CDKN1B-2	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	39.31	-1.11	-40.42	Down regüle
CDKN3	Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2- associated dual specificity phosphatase)	42.81	-3.30	-46.12	Down regüle
ABL1	V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	46.10	-1.22	-47.32	Down regüle
RAD51	RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)	72.34	7.65	-64.69	Down regüle
MAD2L2	MAD2 mitotic arrest deficient-like 2 (yeast)	63.26	-1.62	-64.89	Down regüle
MRE11A	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)	75.41	-1.13	-76.54	Down regüle
CDK6	Cyclin-dependent kinase 6	166.57	1.41	-165.16	Down regüle

MCM5	MCM5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae)	225.97	-2.42	-228.39	Down regüle
CCNB1	Cyclin B1	242.19	2.31	-239.88	Down regüle
CDKN2D	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	485.50	-2.28	-487.78	Down regüle

İki kat üzeri kat değişimleri (FC) anlamlı kabul edilmiştir.

4.3.2. MDA-MB-231 hücre hattı

Tablo 4-17: MDA-MB-231 Apoptoz paneli ekspresyon değişimleri

Gen Kodu	Gen adı	0.saat FC	48.saat FC	48-0 Farkı	Eksp. Durumu
CD40LG	CD40 ligand (TNF superfamily, member 5)	-1.98	175973.66	175975.64	Up regüle
TNFRSF9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	-6.99	1395.60	1402.59	Up regüle
BFAR	Bifunctional apoptosis regulator	-308.69	1.41	310.10	Up regüle
CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine protease	-230.19	-6.19	224.00	Up regüle
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	-7.01	109.14	116.15	Up regüle
CARD4	Caspase recruitment domain family, member 4	-91.14	5.46	96.60	Up regüle
TNFSF4	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4	-5.28	81.01	86.29	Up regüle
TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	-68.28	9.34	77.62	Up regüle
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	-12.79	62.83	75.62	Up regüle
TNFSF11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	-48.73	17.25	65.98	Up regüle
TNFSF7	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7	-9.38	50.27	59.65	Up regüle
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	-44.84	6.01	50.85	Up

					regüle
HRK	Harakiri, BCL2 interacting protein	-31.93	15.63	47.56	Up regüle
CASP10	Caspase 10, apoptosis-related cysteine protease	-4.36	42.71	47.08	Up regüle
TRAF4	TNF receptor-associated factor 4	-50.45	-7.92	42.53	Up regüle
DAPK2	Death-associated protein kinase 2	-36.42	4.64	41.06	Up regüle
TNFRSF8	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8	-15.93	15.35	31.27	Up regüle
TNFSF13B	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	-23.43	7.19	30.61	Up regüle
TRAF1	TNF receptor-associated factor 1	-9.40	18.59	28.00	Up regüle
TNFSF9	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	-11.43	15.96	27.40	Up regüle
BIRC2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	-29.24	-2.20	27.04	Up regüle
BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	-7.03	19.79	26.82	Up regüle
TNFRSF17	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	-19.47	5.38	24.85	Up regüle
TP73L	Tumor protein p73-like	-22.21	1.48	23.69	Up regüle
BAK1	BCL2-antagonist/killer 1	-7.40	14.62	22.02	Up regüle
TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	-4.89	16.80	21.69	Up regüle
BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10	-19.07	2.13	21.20	Up regüle
BCL2A1	BCL2-related protein A1	-6.68	14.32	21.00	Up regüle
BCL2L1	BCL2-like 1	-16.49	4.08	20.57	Up regüle
BAG3	BCL2-associated athanogene 3	-18.13	2.09	20.22	Up regüle
CD40	CD40 antigen (TNF receptor	-18.68	1.05	19.73	Up

	superfamily member 5)				regüle
BRE	Brain and reproductive organ-expressed	-16.19	3.32	19.51	Up regüle
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	-15.60	3.26	18.86	Up regüle
RPA3	Replication protein A3, 14kDa	-8.75	9.58	18.33	Up regüle
APAF1	Apoptotic protease activating factor	-6.63	11.58	18.21	Up regüle
BAG1	BCL2-associated athanogene	-15.56	2.41	17.97	Up regüle
TNFSF13	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	-2.96	14.66	17.62	Up regüle
TNFSF8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8	-11.08	6.31	17.39	Up regüle
DFFB	DNA fragmentation factor, 40kDa, beta polypeptide	-8.90	7.84	16.73	Up regüle
BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	-10.88	5.83	16.71	Up regüle
BOK	BCL2-related ovarian killer	-5.17	10.56	15.73	Up regüle
BIRC1	Baculoviral IAP repeat-containing 1	-11.47	4.21	15.68	Up regüle
RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	-11.42	4.02	15.44	Up regüle
BAX	BCL2-associated X protein	-8.35	6.77	15.12	Up regüle
TNFSF15	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	-3.96	9.92	13.88	Up regüle
CIDEB	Cell death-inducing DFFA-like effector b	-11.13	2.39	13.53	Up regüle
TNFRSF10C	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c	-16.04	-2.58	13.46	Up regüle
CASP8AP2	CASP8 associated protein 2	-8.04	5.25	13.29	Up regüle
LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)	-15.14	-2.57	12.56	Up regüle
CASP7	Caspase 7, apoptosis-related	-10.67	1.82	12.48	Up

	cysteine protease				regüle
BIRC6	Baculoviral IAP repeat-containing 6 (apollon)	-10.74	1.37	12.11	Up regüle
BCL2L2	BCL2-like 2	-5.04	6.41	11.45	Up regüle
BIRC4	Baculoviral IAP repeat-containing 4	-8.11	2.87	10.98	Up regüle
MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	-9.51	1.42	10.93	Up regüle
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	-9.71	1.17	10.89	Up regüle
CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine protease	-5.13	5.46	10.59	Up regüle
CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor	-6.30	4.01	10.31	Up regüle
CASP4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	-4.22	6.05	10.27	Up regüle
CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine protease	-4.56	5.44	10.00	Up regüle
TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	-7.45	2.26	9.71	Up regüle
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	-4.13	5.54	9.67	Up regüle
BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	-7.08	2.54	9.62	Up regüle
CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	-6.98	2.14	9.12	Up regüle
CIDEA	Cell death-inducing DFFA-like effector a	-7.87	1.19	9.07	Up regüle
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)	-5.94	2.94	8.88	Up regüle
TANK	TRAF family member-associated NFKB activator	-7.59	1.05	8.64	Up regüle
TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	-3.94	4.17	8.11	Up regüle
TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	-46.31	-38.50	7.82	Up regüle
TNFSF18	Tumor necrosis factor (ligand)	-4.21	2.71	6.92	Up

	superfamily, member 18				regüle
TNFRSF10D	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d	-4.20	2.29	6.49	Up regüle
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	-8.11	-1.87	6.24	Up regüle
CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	-4.22	1.72	5.94	Up regüle
ATM	Ataxia telangiectasia mutated	-1.82	2.80	4.63	Up regüle
DAPK1	Death-associated protein kinase 1	-2.22	1.90	4.12	Up regüle
CASP5	Caspase 5, apoptosis-related cysteine protease	-7.85	-4.37	3.49	Up regüle
TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	-4.25	-1.39	2.85	Up regüle
DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide	-1.74	1.08	2.82	Up regüle
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	1.19	2.65	1.46	NS
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	4.48	3.36	-1.12	NS
TRIP	TRAF interacting protein	3.15	1.61	-1.54	NS
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	3.10	1.14	-1.96	NS
TNFRSF21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	3.85	1.32	-2.53	Down regüle
BAG4	BCL2-associated athanogene 4	5.00	1.77	-3.23	Down regüle
CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	-2.41	-7.50	-5.09	Down regüle
CASP6	Caspase 6, apoptosis-related cysteine protease	-1.50	-6.63	-5.13	Down regüle
TP53	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	-10.89	-23.26	-12.37	Down regüle
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	11.29	-2.22	-13.51	Down regüle
TRAF5	TNF receptor-associated factor 5	1.78	-10417.10	-10418.89	Down regüle

İki kat üzeri kat değişimleri (FC) anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 4-18: MDA-MB-231 Hücre döngüsü paneli ekspresyon değişimleri

Gen Kodu	Gen adı	0.saat FC	48.saat FC	48-0 farkı	Eksp. Durumu
RAD1	RAD1 homolog (S. pombe)	-6.12	14.19	20.31	Up regüle
CDKN2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	-11.16	6.10	17.26	Up regüle
CCNA1	Cyclin A1	-3.26	12.85	16.11	Up regüle
CDK5R1	Cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	-3.83	12.21	16.04	Up regüle
E2F4	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding	-1.75	14.25	16.00	Up regüle
HUS1	HUS1 checkpoint homolog (S. pombe)	-2.43	10.39	12.82	Up regüle
CDK5RAP1	CDK5 regulatory subunit associated protein 1	-15.35	-3.21	12.14	Up regüle
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	-1.80	9.23	11.03	Up regüle
DIRAS3	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 3	-1.86	8.73	10.60	Up regüle
BCCIP	BRCA2 and CDKN1A interacting protein	-3.93	5.76	9.69	Up regüle
RPA3	Replication protein A3, 14kDa	-2.46	4.56	7.03	Up regüle
CUL2	Cullin 2	-9.96	-3.10	6.86	Up regüle
MCM67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	-3.31	3.39	6.70	Up regüle
GTF2H1	General transcription factor IIH, polypeptide 1, 62kDa	-1.23	5.30	6.53	Up regüle
GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1	-4.78	1.67	6.45	Up regüle
ANAPC4	Anaphase promoting complex subunit 4	-3.39	2.70	6.09	Up regüle
CCND2	Cyclin D2	-3.90	2.05	5.95	Up

					regüle
CDKN2D	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	-1.79	4.10	5.89	Up regüle
MNAT1	Menage a trois homolog 1, cyclin H assembly factor (Xenopus laevis)	-1.27	4.17	5.43	Up regüle
BAX	BCL2-associated X protein	-2.56	2.86	5.42	Up regüle
CDC20	Cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	-3.35	1.95	5.30	Up regüle
BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	-6.60	-1.39	5.22	Up regüle
DDX11	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 11 (CHL1-like helicase homolog, S. cerevisiae)	-4.00	1.08	5.08	Up regüle
KNTC1	Kinetochore associated 1	-2.41	2.38	4.79	Up regüle
MCM4	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (S. cerevisiae)	-2.82	1.94	4.76	Up regüle
CCNF	Cyclin F	-2.13	2.44	4.57	Up regüle
RAD17	RAD17 homolog (S. pombe)	-3.22	1.32	4.54	Up regüle
CCNE2	Cyclin E2	-1.94	2.56	4.50	Up regüle
CDKN2C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	-2.80	1.21	4.01	Up regüle
CDC34	Cell division cycle 34 homolog (S. cerevisiae)	-1.59	2.32	3.92	Up regüle
TFDP2	Transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)	-4.87	-1.16	3.71	Up regüle
HERC5	Hect domain and RLD 5	3.65	7.35	3.71	Up regüle
MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	-2.23	1.14	3.36	Up regüle
RBL1	Retinoblastoma-like 1 (p107)	-6.65	-3.43	3.22	Up regüle
RB1	Retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)	-4.35	-1.16	3.18	Up regüle

CDKN1B-2	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	-4.20	-1.08	3.12	Up regüle
ABL1	V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	-4.30	-1.18	3.12	Up regüle
BRCA1	Breast cancer 1, early onset	1.89	4.85	2.96	Up regüle
CCNB2	Cyclin B2	-4.50	-1.76	2.74	Up regüle
SUMO2	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (S. cerevisiae)	-4.24	-1.58	2.65	Up regüle
CUL1	Cullin 1	-1.11	1.54	2.65	Up regüle
CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	-3.58	-1.15	2.43	Up regüle
MCM5	MCM5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae)	-4.14	-1.75	2.39	Up regüle
CCNE1	Cyclin E1	1.90	3.62	1.72	NS
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related	-3.42	-1.90	1.52	NS
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	-2.37	-1.10	1.27	NS
RAD51	RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)	1.60	2.84	1.24	NS
DNM2	Dynamin 2	-2.72	-1.63	1.09	NS
SERTAD1	SERTA domain containing 1	-2.15	-1.07	1.08	NS
BRCA2	Breast cancer 2, early onset	-2.58	-1.58	1.00	NS
CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	-2.18	-1.32	0.86	NS
GADD45A-6	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	-2.29	-1.48	0.81	NS
MRE11A	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)	-2.85	-2.10	0.75	NS
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	-2.21	-1.47	0.74	NS
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	-2.00	-1.32	0.68	NS
CCNB1	Cyclin B1	1.10	1.58	0.47	NS
CDKN3	Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)	-2.73	-2.31	0.42	NS
MCM3	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae)	-1.37	-1.00	0.36	NS
CDK8	Cyclin-dependent kinase 8	-2.16	-2.00	0.16	NS
RBL2	Retinoblastoma-like 2 (p130)	-1.25	-1.13	0.12	NS
CDK6	Cyclin-dependent kinase 6	-1.89	-1.81	0.08	NS

CCNT1	Cyclin T1	2.89	2.93	0.05	NS
CDK7	Cyclin-dependent kinase 7 (MO15 homolog, Xenopus laevis, cdk-activating kinase)	-1.88	-1.95	-0.07	NS
SUMO1	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (S. cerevisiae)	-1.05	-1.12	-0.07	NS
CUL3	Cullin 3	-1.30	-1.44	-0.15	NS
CCNC	Cyclin C	-2.31	-2.54	-0.24	NS
CCNG1	Cyclin G1	-1.36	-1.60	-0.24	NS
CDC16	Cell division cycle 16 homolog (S. cerevisiae)	-1.36	-1.83	-0.48	NS
CCND1	Cyclin D1	-1.61	-2.13	-0.52	NS
RBBP8	Retinoblastoma binding protein 8	-1.84	-2.57	-0.73	NS
MCM2	MCM2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin (S. cerevisiae)	-1.29	-2.06	-0.77	NS
CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	1.15	-1.21	-2.37	Down Regüle
NBN	Nibrin	-2.23	-4.63	-2.40	Down Regüle
CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B	1.17	-1.41	-2.58	Down Regüle
CCNA2	Cyclin A2	1.46	-1.24	-2.71	Down Regüle
CDK5	Cyclin-dependent kinase 5	-2.85	-5.60	-2.76	Down Regüle
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	1.75	-1.58	-3.33	Down Regüle
KPNA2	Karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	2.28	-1.48	-3.76	Down Regüle
UBE1	Ubiquitin-activating enzyme E1 (A1S9T and BN75 temperature sensitivity complementing)	-2.91	-6.79	-3.88	Down Regüle
MAD2L2	MAD2 mitotic arrest deficient-like 2 (yeast)	6.60	2.02	-4.58	Down Regüle
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	1.45	-3.71	-5.16	Down Regüle
CCNG2	Cyclin G2	1.68	-5.05	-6.73	Down Regüle
CCNH	Cyclin H	2.18	-7.01	-9.20	Down Regüle
CDC2	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	7.98	-2.67	-	Down

				10.65	Regüle
CDKN2A-3	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	20.53	-7.52	-28.05	Down Regüle
ANAPC2	Anaphase promoting complex subunit 2	61.11	2.08	-59.03	Down Regüle

İki kat üzeri kat değişimleri (FC) anlamlı kabul edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipi olmakla beraber insidansının ve mortalite oranlarının önümüzdeki yıllarda daha da artması beklenmektedir (Anastasiadi ve ark., 2017). Kanser araştırmaları günümüzde oldukça yol kat etmiş olmasına rağmen meme kanseri tedavisi özellikle 45 yaşından genç kadınlarda daha sık görülen agresif tiplerde yetersiz kalmaktadır. Çalışmalar endokrin reseptörlerin, HER2 ve proliferasyon belirteçlerinin genç kadınlarda daha farklı olduğunu da göstermiştir (Kim ve ark., 2011). Tanının ileri evrelerde konulması, daha agresif patolojik karakterler, daha yüksek triple negatif ve HER2 pozitif tümörler ile nüks oranlarının daha ileri yaşlardaki kadınlardan yüksek olması genç kadınlarda görülen meme kanserinin agresif doğasını ortaya koymaktadır (Anders ve ark., 2008).

Heterojen bir hastalık olan meme kanserinin tedavisinde doğru tedavi yaklaşımını belirleyebilmek ve en iyi sonuçları elde edebilmek için tümör sınıflandırmasının doğru yapılması hayati önem taşımaktadır. Klinik uygulamada tümörler tek bir tipi barındıran bir kitle olarak ele alınsa da tümör heterojenitesi ve kanser kök hücreleri üzerine yapılan çalışmalar intra-tümöral çeşitliliğin varlığını, yani tek bir tümör içerisinde birden fazla alt tipin bulunabileceğini göstermiştir (Curtis ve ark., 2012; Marusyk ve ark., 2012; The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Günümüzde histolojik değerlendirme ile sınıflandırma yapılmasına rağmen genotipleme çalışmaları bilinen meme kanseri 4 ana alt tipini en az 10 alt tipe çıkarmıştır (Curtis ve ark., 2012). Bunlara ek olarak belirli alt tiplerin tümör mikroçevresine ve uygulanan sinyal moleküllerine bağlı olarak farklı alt tiplerin gen ekspresyon paternlerini sergileyebildikleri gösterilmiştir (Sflomos ve ark., 2016; Roarty, ve ark., 2017). Dolayısı ile primer tümör ve metastaz yapmış hücrenin alt tipinin mikroçevrenin farklılaşmasından dolayı değişebildiği görülmüştür (Yates ve ark., 2015). Ayrıca dolaşan kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda hem HER2+ hem de HER2- tipler belirlenmiş ve birbirlerine dönüşebildikleri gözlemlenmiştir (Jordan ve ark., 2016). Sonuç olarak tek tipe yönelik tedavi yaklaşımları özellikle tedavi direncinin ve reküransın sıklıkla görüldüğü agresif tip meme kanserlerinde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle hedefe yönelik tedavilerde faydalanılan reseptörlerden bağımsız olarak ve/veya onlara ek olarak farklı hücresel yolaklardan hücreleri etkileyerek birçok alt tipte etkinlik gösterebilecek tedavi yaklaşımlarına/ kemoterapötik ajanlara ihtiyaç vardır.

Bitkilerin sekonder metabolitleri arasında yer alan flavonoidler bitkilerin dış etken ve zararlılara karşı kendini savunması ve birçok metabolizmada etki göstermesi ile bilinen fenolik bileşiklerdir. Farmakolojik özelliklerinin başında gelen antioksidan etkilerinin yanı sıra anti-kanser, anti-mikrobiyal, anti-viral, anti-inflamatuvar, kardiyoprotektif ve hepatoprotektif etkileri bulunmaktadır (Gontijo ve ark., 2016; Kumar ve Pandey, 2013). Antikanser etkilerinin yanında yan etkilerinin bulunmaması ile bu bitkisel metabolitler son yıllarda kanser araştırmalarında kendilerine geniş yer bulmuştur .

Bitki fenoliklerinin kanser hücrelerinin ölümünü indüklemesi üzerine yapılan çalışmalar (1) PI3K ve Akt gibi onkojenik sağ kalım kinazları, (2) Erk1/2, D-siklinler ve CDK'ların, (3) NFkB, NRF2 ve STATlar gibi transkripsiyon faktörleri, (4) HDAC1 ve HDAC2 gibi histon asetilazlar ve (5) VEGF, FGFR1 ve MIC-1 gibi anjiyogenik faktörlerin down regülasyonunu sağladığını göstermiştir. Ayrıca fenolik bileşikler p53, PTEN, p21 ve p27 gibi tümör baskılayıcı proteinlerin ekspresyonunu arttırmıştır. Bitki fenolik bileşiklerinin ve fenolik bileşiklerce zengin bitki ekstraktlarının ROS modülasyonu üzerinden hücre proliferasyonu, sağ kalımı ve apoptozu regüle ettiği gösterilmiştir. Bunlara ek olarak barsak mikrobiyotasında transforme olarak biyolojik aktivitelerini zenginleştiren daha fazla özellik kazandıkları belirtilmektedir (Anantharaju ve ark., 2016). In vitro çalışmalar, pre-klinik ve epidomiyolojik çalışmalar bitki fenolik asitlerinin kanser gelişimini yavaşlatıcı etkileri olduğunu göstermiştir (Preethi ve ark., 2016).

Fenolik bileşiklerin normal hücrelerin onkogenik transformasyonu, tümör büyümesi ve gelişmesi, anjiyogenez ve metastaz gibi anahtar mekanizmalarda rol oynayan genleri etkileyerek çeşitli mekanizmalar üzerinden kanser oluşumu ve progresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Choi ve ark., 2016; Marunaka ve ark., 2017). Fenolik maddeler, kanser hücrelerini öldürücü etkilerini PI3K ve Akt gibi onkogenik sağkalımda rol oynayan kinazlar, siklin ve siklin bağımlı kinazlar gibi hücre proliferasyonu regülatörleri, NF-kβ ve STAT'lar gibi transkripsiyon faktörleri, histon deasetilazlar ve VEGF gibi anjiyogenik faktörler gibi çeşitli biyomoleküllerinin down regülasyonlarını sağlayarak kanser hücrelerinin ölümünü indüklemektedir. Yapılan çalışmalar meme kanserinde curcuminin Cdk inhibitörü, p21/WAF/CIPI ve p53 up regülasyonu ile G0/G1 ve/veya G2/M fazlarında hücre döngüsü tutulumu indüklediği ve NFκB, AP-1, TNFα, IL, STAT-3, ve PPAR-γ transkripsiyon faktörlerini inhibe ettiği

gösterilmiştir (Kumar ve ark., 2015). Benzer şekilde resveratrol de Ayrıca, tümör baskılayıcı genler p21Cip1/WAF1, p53, pro-apoptotik protein Bax ve apoptotik Kaspaz sinyallerinin up regülasyonu ile Bcl-2, Bcl-XL ve survivin anti-apoptotik proteinlerinin down regülasyonu ile apopotozu indüklediği, ayrıca siklin E ve siklin D1 regülatör proteinleri üzerinden hücre döngüsü tutulumuna neden olduğu görülmüştür (Hayashibara ve ark., 2002; Aggarwal ve ark., 2004; Harikumar ve ark., 2010). Bireysel etkilerinin yanı sıra bir arada sinerjetik etki göstererek bireysel etkilerinden daha güçlü etki gösterebilirler (Jiang ve ark., 2013).

İn vitro ve in vivo çalışmalar quercetinin epigallokateşin-3-gallat (EGCG) ile birlikte uygulandığında NFkB ve Akt sinyal yolaklarının aktive edilmesi ile apoptoz ve anjiyogenezi indüklediğini göstermiştir (Kuno ve ark., 2012). Malign melanoma hücre hatlarında quercetin ve kaemferol uygulamasının kaspaz-3, BAX ve p53'ün up regülasyonu ve Bcl-2'nin down regülasyonunu indükleyerek pro-apoptotik aktivitesine gösterdiklerini ortaya koymuştur (Gopal ve ark., 2015). Quercetinin BCL-2 ve BCL-XL proteinlerinin BH3 domainlerine bağlanarak inhibisyonlarını sağladığı ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Primikyri ve ark., 2014). Ayrıca quercetinin BCL-2 ailesine ait Mcl-1 antiapoptotik proteinin mRNA stabilitesini etkileyerek protein degredasyonunu sağladığı belirtilmiştir (Spagnuolo ve ark., 2012). Ayrıca birçok farklı sinyal yolağı üzerinden etki gösteren diğer flavonoidler arasında Apigenin (Meng ve ark., 2017; Erdogana ve ark., 2017) ve Luteolin (Meng ve ark., 2016; Lee ve ark., 2015) da yer almaktadır.

Quercetin ve kaemferol (Gopal ve ark., 2015), apigenin (Zhu ve ark., 2013), lutheolin (Park ve ark., 2014) ve myricetin (Sun ve ark., 2012) flavonoidlerinin kaspazları hedef aldığı ve yeni geliştirilecek kemoterapötiklere aday oldukları belirtilmiştir. En çok çalışılan flavonoidlerden olan apigenin meme, kolon, cilt, tiroid, lösemi ve prostat dahil olmak üzere birçok insan kanser hücre hattında hücre büyümesinin inhibisyonunu indüklediği gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2013).

MCF-7 hücre hatlarında Lutheolin antiproliferatif aktivitesi incelenmiştir. Bu flavonoid DR5 gibi ölüm reseptörlerinin ekspresyonunu ve kaspaz kaskadı aktivasyonunu arttırarak etki göstermiştir. Park ve arkadaşları lutheolinin ayrıca BAX üzerinden membran potansiyelinin yıkımı ve sitokrom c salınımını ve BCL-2 inhibisyonunu indüklediğini göstermişlerdir (Park ve ark., 2014).

Birçok farklı yolak üzerinden etki edebilmeleri ve yan etki göstermemeleri nedeniyle bu çalışmada farklı meme kanseri hücre hatlarında etki gösterebilecek çeşitli polifenollerin bireysel etkileri incelenmiş, etkili görülen polifenoller ile bir karışım oluşturularak SK-BR-3 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında apoptoz ve hücre döngüsü yolakları üzerinde indükledikleri ekspresyonel değişimler incelenmiştir. Bu çalışmada daha önce ER/PR+ meme kanserini temsil eden MCF-7 hücre hattı üzerinde etkinliğini gösterdiğimiz flavonoid kokteylimizin agresif tipler üzerinde de etki gösterecek şekilde genişletilmesi amaçlanmıştır (BAP no. 28301).

Çalışmamızda kullanılan SK-BR-3 hücre hattı p53 geninde kanser oluşumuna zemin hazırlayan bir homozigot p53 mutasyonu (TP53 p.Arg175His (c.524G>A)) ve homozigot CDH1 delesyonu bulunan bir ER/PR-, HER2+ meme adenokarsinomundan kaynaklanmıştır (https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_4V52). Diğer hücre hattı ise MDA-MB-231 heterozigot BRAF p.Gly464Val (c.1391G>T) , homozigot CDKN2A (siklin bağımlı kinaz 2A) delesyonu, heterozigot KRAS p.Gly13Asp (c.38G>A), homozigot TP53 p.Arg280Lys (c.839G>A) mutasyonu ve promoter bölgesinde TERT c.228C>T (-124C>T) mutasyonu taşıyan bir triple negatif meme adenokarsinomundan kaynaklanmıştır (https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0062).

Çeşitli polifenolik maddelerin bireysel ve kombine etkilerinin değerlendirildiği çalışmamızda bireysel etkileri gözlemlenen bileşiklerden bir karışım hazırlanmış ve polifenol kokteyli (PK) olarak tanımlanmıştır. Bu polifenol kokteylimizin agresif tip meme kanserlerini temsil eden SK-BR-3 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında etkinliği incelenmiştir. WST1 analizi sonuçlarına bakıldığında karışım SKBR-3 hücre hattında daha yüksek etki olmakla birlikte her iki agresif tip meme kanseri hücre hattında da etkili bulunmuştur. Devamında gerçekleştirilen apoptoz analizlerinde de bu etki doğrulanmıştır. SKBR-3 hücre hattında %20 dozunda dahi hücre canlılığında ciddi bir düşüş ve apoptotik etki görülürken, MDA-MB-231 hücrelerinde her iki dozda da anlamlılık görülmekle birlikte %35 dozunda daha dramatik bir etki görülmektedir. Uygulanan tedavilerde hücrelerin apoptotik yollara yönlendirilmesi çevre dokuların zarar görmemesi açısından önem taşımaktadır.

Etkisi gösterilen bu PK karışımının hücreleri moleküler anlamda hangi noktalardan etkilediği ise apoptoz ve hücre döngüsü yolaklarında görevli çeşitli genlerin ekspresyonel değişimleri araştırılarak değerlendirilmiştir. Her iki hücre hattında da %20

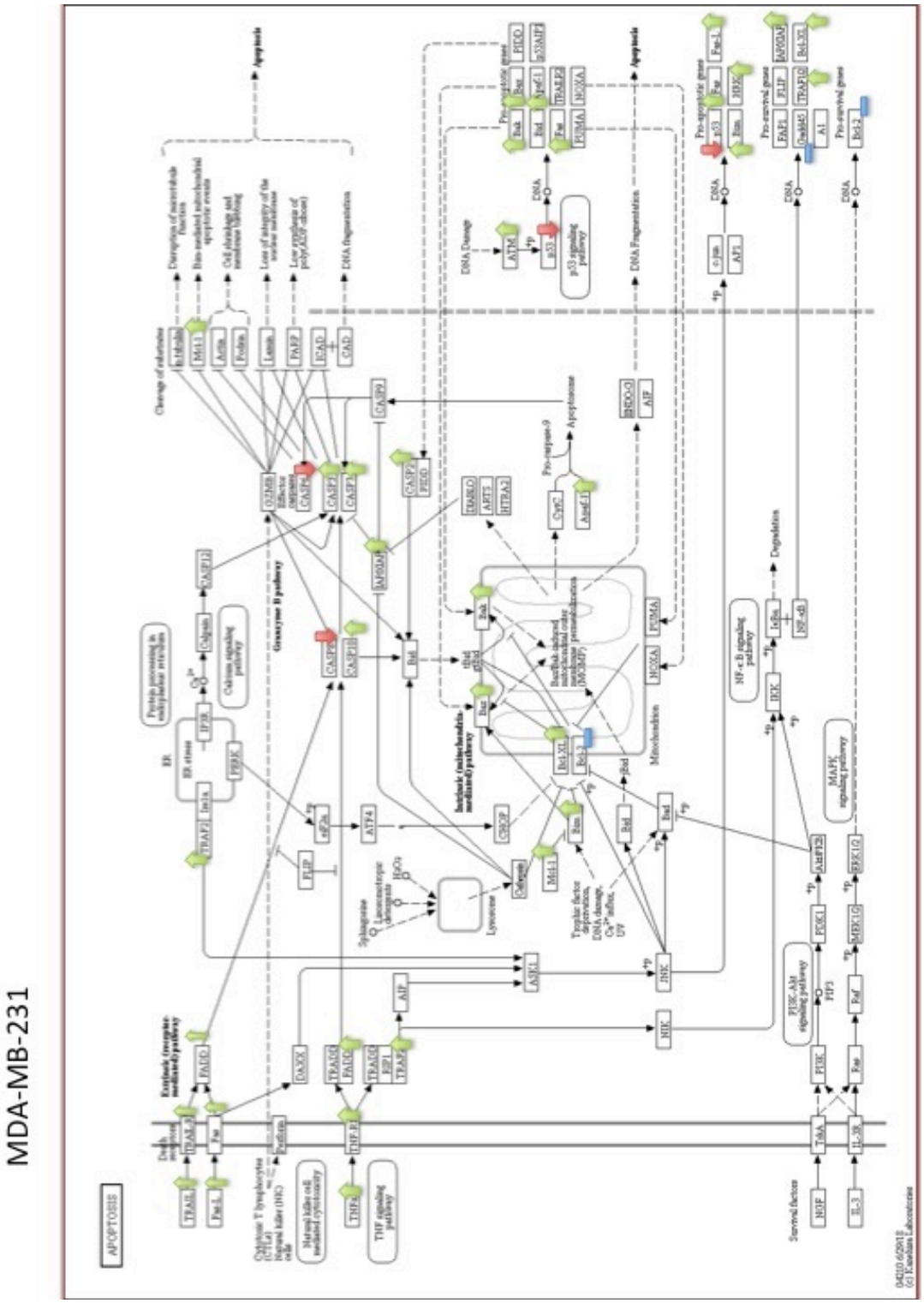
dozunun indüklediği ekspresyonel değişim 0. ve 48. Saatlerde B2M endojen kontrol baz alınarak değerlendirilmiştir. Kullanılan panellerde 8 adet endojen gen yer almıştır (ACTB, B2M, GAPD, GUSB, HPRT1, PGK, PPIA, RPL13A), ancak elde edilen sonuçlara göre tüm hücre hattı ve panellerde en uygun olan B2M seçilmiştir. GAPDH yaygın olarak kullanılan bir endojen kontrol olmasına rağmen son yapılan çalışmalar meme kanseri araştırmalarında GAPDH'in önerilmediği yönünde olmuştur (Lin-Lin ve ark., 2015). Endojen kontrole göre belirlenen ekspresyonel değişimler ardından 48.saatin 0.saate göre farkı gözetilerek ele alınmıştır.

MDA-MB-231 hücre hattında, hem ekstrinsik hem de entrinsik yolakta değişimler görülmektedir. SKBR-3 hattında ise intrinsik yolak daha baskındır. MDA-MB-231 hücre hattında her biri apoptotik ekstrinsik yolaklar olan hem TNF yolağının hem de FAS ve TRAIL yolaklarının aktive olduğu görülmektedir. Ayrıca pro-apoptotik genler olan BAX, BAK ve APAF-1 üzerinden intrinsik yolaklar aktive olmuştur (Şekil 5-1; Şekil 5-2).

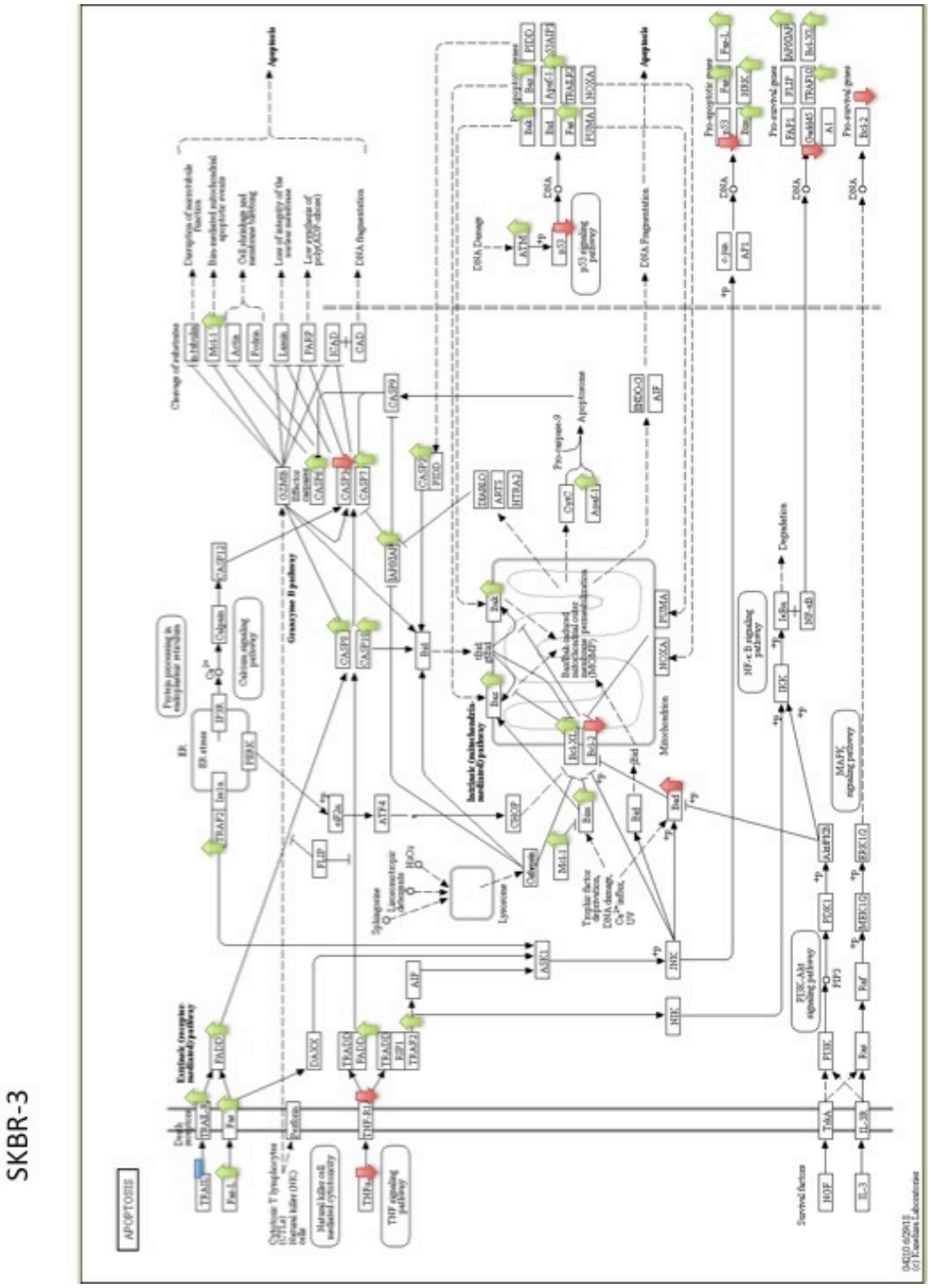
Tümör nekrosis faktör (TNF), TNF süperailesine ait çoğunlukla makrofajlar tarafından salınan multifaktöriyel pro-inflamatuvar sitokin kodlayan bir gendir. TNFRSF1A/TNFR1 ve TNFRSF1B/TNFBR reseptörlerine bağlanarak hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu, apoptoz, lipid metabolizması ve koagülasyon gibi birçok hücresel yolakta etkilidir (van Horssen ve ark., 2006). TNFR-associated death domain (TRADD) TNFR1'de bulunan ölüm domainine (DD) bağlanarak adaptör proteinler receptor interacting protein (RIP), TNFR associated Factor 2 (TRAF2) ve Fas- associated death domain (FADD) bir araya getirir (Rath ve Aggarwal, 1999). TNFR-1 apoptoz sinyali verdiğinde FADD pro-kaspaz 8'e bağlanarak aktivasyonunu sağlar. Böylece kaspaz kaskadı aktive olarak apoptozu başlatır (Degterev ve ark., 2003). TNFa TNFR-1 üzerinden apoptotik yolakların yanında sağ kalım ve proliferasyon yolaklarını da aktive edebilir. Her iki yolak ayrı ayrı tanımlanmış olsa da sağ kalım-apoptoz arasındaki dengenin nasıl sağlandığı net değildir. TNFR-1 sağ kalım sinyali verdiğinde inhibitör of apoptosis (IAP) üzerinden apoptozu inhibe eden TRAF-2 komplekse dahil olur. TRAF-2 MAPK ve JNK yolakları üzerinden cFos/cJun transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlar (Natoli ve ark., 1997). Hem NFKB hem de cFos/cJun transkripsiyon faktörleri antiapoptotik, proliferatif, immünmodülatör ve inflamatuvar genleri indükleyebilmektedir. TNFa ile indüklenmiş apoptozun

önlenmesinde majör etkiyi gösteren NFkB olduğundan, NFkB inhibisyonu kanser tedavilerinde TNFa etkinliğinin arttırılmasında etkili olabilir (Beg ve Baltimore, 1996). Ekpresyonel değişimler incelendiğinde PK uygulamasının MDA-MB-231 hücre hatlarında TNF up regülasyonu ve yolağın apoptoz lehine daha baskın olarak indüklendiği görülmüştür. SKBR-3 hücre hattında ise TNF ekspresyonlarının down regüle olduğu görülmüştür. Flavonoid maddelerce zengin bitki ekstraktlarının veya curcumin gibi maddelerin TNFa ekspresyonlarını düşürdüğü ve antiinflamatuvar etkileri geçmiş çalışmalarda gösterilmiştir (Kumar ve ark., 2015).

Kaspazlar apoptoz ve inflamasyon gibi hücre regülatör ağlarında kritik noktalarda rol oyayan bir endoproteaz ailesidir. İnaktif zimojenler olarak bulunan bu enzimler aktivasyonları ile dimerler ve makromoleküler kompleksler oluştururlar. Apoptotik kaspazların aktivasyonu ile substratların aktivasyonu veya inaktivasyonunu içeren ve hücresel komponentlerin kontrollü yıkımı ile sonuçlanan bir sinyal kaskadı başlatılmış olur. Kaspazlar birbirlerinin de substratı konumundadır (McIlwain ve ark., 2013). Kaspaz -2,-8,-9 ve -10 başlatıcı kaspazlar, kaspaz -3,-6,-7 ise efektör kaspazlar olarak adlandırılır. Kaspaz 8/10 FADD tarafından aktifleştirilerek mitokondriden sitokrom C salınımını sağlayarak efektör kaspazların aktive edilmesini sağlar. Kaspazlar ayrıca inflammazom aktivasyonu, otofaji ve nekroptoz ve piroptoz gibi non-apoptotik yolaklarda da etkilidir (Espinosa-Oliva ve ark., 2019). Çalışmamızda da kullanılan bitki kaynaklı bir stilben bileşiği olan resveratrolün meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde antikanserojen özellikleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Stilbenlerin östrojen benzeri yapıları nedeniyle östrojen reseptörlerine bağlanabildiği ve regülasyonunu sağlayabildiği bilinmektedir. Dolayısı ile ER+ meme kanserlerinde resveratrolün etkinliği gösterilmiştir. Fakat ER reseptörü taşımayan triple negatif meme kanserlerinde de resveratrol analoglarının kaspazlar üzerinden apoptozu indüklediği ve DNA onarımı yolaklarında etkili olduğu gösterilmiştir (Horgan ve ark., 2019). SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında kaspaz genlerinin çoğunluğunda up regülasyon gözlenmiştir. Ayrıca her iki hücre hattında da kaspaz aktivasyonunu sağlayan FADD ekspresyonlarında artış görülmüştür (Şekil 5-1; Şekil 5-2).



Şekil 5-1: MDA-MB-231 hücre hattında PK uygulaması ile apoptoz yolağında indüklenen ekspresyon değişimleri



Şekil 5-2: SKBR-3 hücre hattında PK uygulaması ile apoptoz yolağında indüklenen ekspresyon değişimleri

Tümor nekrozis faktör-ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TRAIL) kanser hücrelerine spesifik hücre ölümünü indüklediğinden ve normal hücreleri etkilemediğinden kanser tedavisi için ideal bir ajan olarak ifade edilir (Kong ve ark., 2019). MDA-MB-231 hücre hatlarında TRAIL up regülasyonu görülürken, SKBR-3 hücre hattında anlamlı bir değişim görülmemiştir (Şekil 5-1; Şekil 5-2)..

BCL-2 geni hücrelerin apoptotik ölümünü inhibe eden integral dış mitokondrial membran proteinidir. Hücre ölümünü membran permeabilitesini kontrol ederek regüle eder. Mitokondriden sitokrom c salınımını engelleyerek ve/veya apoptosis activating factor (APAF-1)'e bağlanarak kaspaz aktivitesini inhibe eder. NLRP1- inflamazom aktivasyonunu zayıflatarak kaspaz1 aktivasyonunu ve IL-1B salınımını düşürebildiğinden inflamasyonu azaltabilir (Bruey ve ark., 2007). BCL-2/BCL-XL BAD tarafından inhibe edilmez ise BAX ile etkileşime girerek BAX'ın mitokondrial membran permeabilitesini arttırmasını engelleyebilir. BCL-2 SKBR-3 hücre hattında down regüle olmuş, MDA-MB-231 hattında ise anlamlı değişim göstermemiştir. Her iki hücre hattında da BCL ile interaksiyona giren ve inhibisyonlarını sağlayan (Kaya-aksoy ve ark., 2019) HRK up regüle olmuştur. MDA-MB-231 de anlamlı farklılık göstermeyen BCL-2, SKBR-3 hattında down regüle olduğundan bu ekspresyonel artışın BCL-2 anti-apoptotik geninin inhibisyonunda etkili olduğu söylenebilir. Her iki hücre hattında da APAF-1, BAX ve BAD up regülasyonu görülmüştür. Fitokimyasallarca zengin besinlerin tüketiminin Bcl2, NF-κB, Bcl-xL, kaspazlar ve p53 regülasyonu üzerinden kanserin önlenmesinde etkili olabileceği gösterilmiştir (Singh ve ark., 2017).

Her iki hücre hattında da TP53 geni ekspresyonlarında düşüş görülmüştür. Hücre döngüsü ve apoptoz yolaklarında kilit rol oynayan bu gen her iki hücre hattında da mutanttır. Bu nedenle alternatif yolaklar üzerinden etkinin görülmesi beklenen bir durumdur.

Genel bağlamda bakıldığında hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik genlerin yer aldığı apoptoz panelimizde PK uygulamasının genlerin çoğunluğunda up regülasyona neden olduğu görülmüştür. Kanser hücrelerinin en bilinen özelliklerinden biri uygulanan ajanlara bağlı olarak sağ kalım adına davranışlarını farklı yolaklara çevirebilmeleridir. Dolayısı ile hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik genlerin aktive olması beklenen bir davranıştır. Hücrenin apoptoza girmesi de pro-apoptotik ve anti-

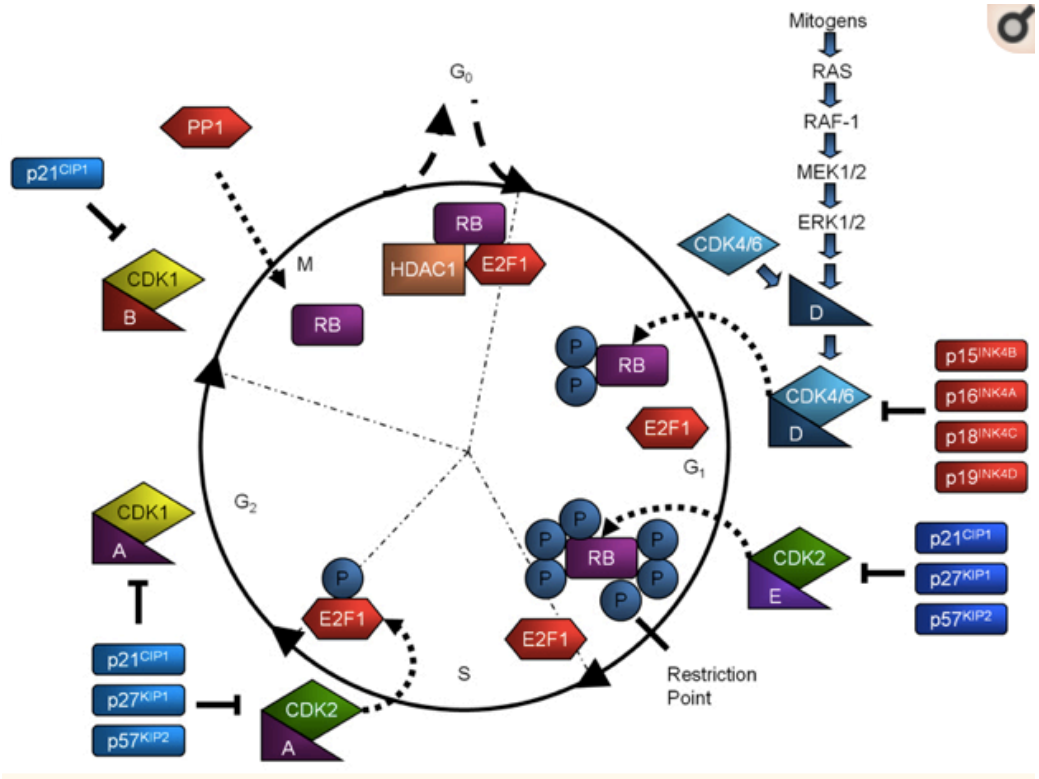
apoptotik gen aktivasyonlarının dengesine bağlıdır. Her iki hücre hattında da apoptotik genlerin up regülasyonu antiapoptotik genlere kıyasla daha baskın bulunmuştur.

Hücre bölünmesi sırasında G1 fazındaki ilk duraksama ve S fazındaki DNA sentezinin başlamasının ardından mitojen bağımlı ilerleme siklin bağımlı kinazlar (CDK) tarafından regüle edilir. CDK aktivitesi ise CDK inhibitörleri tarafından kısıtlanır. Bu aşamada görevli olan INK4 proteinleri CDK4 ve CDK6 katalitik altünitelerini inhibe eder. Bu proteinlerin arasında yer alan $p16^{INK4a}$ (Serrano ve ark., 1993), $p15^{INK4b}$(Hannon ve Beach, 1994), $p18^{INK4c}$ (Guan ve ark., 1994), and $p19^{INK4d}$ (Chan ve ark., 1995) CDK4 ve CDK6'ya bağlanırken diğer CDKlara veya D-tip siklinlere bağlanamazlar. Cip/Kip ailesi üyeleri ise daha geniş çerçevede etki göstererek siklin D, E ve A bağımlı kinazlara etki gösterirler. Bu grupta yer alan $p21^{Cip1}$ (Gu ve ark., 1993), $p27^{Kip1}$ (Toyoshima ve Hunter, 1994), ve $p57^{Kip2}$ (Lee et al. 1995) yapıları gereği hem siklinlere hem de CDK alt ünitelerine bağlanabilir (Lin et al. 1996).

Mitojenik sinyaller CDK4 ve CDK6 ile Cip veya Kip proteinlerini indükler. Cip/Kip proteinlerinin ayrılması inhibitör etkiyi düşürür ve siklin E-CDK2 kompleksinin aktivasyonunu sağlar. Siklin D ve E bağımlı kinazlar Rb fosforilasyonuna neden olarak onun E2F ailesi üyelerine bağlanmasını baskılamaktadır. Serbest kalan E2F böylece S fazına geçiş için gerekli olan genleri aktive etmektedir. Fosforilasyonda ayrıca siklin E ve A'da görevlidir (Dyson, 1998). SiklinE-CDK2 p27 fosforilasyonunu sağlayarak proteolitik yıkımını indükler. Cip/Kip proteinlerinin yıkımı ve E2F siklin indüksiyonu mitojen bağımsızlığını ve geçişin geri dönüşümsüzlüğüne katkı sağlamaktadır. Siklin A ve B bağımlı CDKlar hücre döngüsünün ileri safhalarında aktive olarak hücre mitozdan çıkana kadar Rb'yi hiperfosforile tutar, bir sonraki G1 fazında ise Rb hipofosforile haline geri döner (Ludlow ve ark., 1993). Siklin E'nin fosforilasyon ile indüklenmiş yıkımı hücreler S fazına geçerken gerçekleşir ve Siklin A'nın da G2 fazında degrade edilmesi ile sistem başlangıç haline geri dönmüş olur (Peters, 1998).

INK4 proteinlerinin aşırı ekspresyonu Rb bütünlüğüne bağlı olarak G1 fazı tutulumuna neden olur (Guan ve ark., 1994). Fibroblastlara uygulanan Siklin D1 antijenlerinin Rb fonksiyonu devam ettiği sürece S fazı geçişini engellediği gösterilmiştir (Baldin et al. 1993). Rb fosforilasyonu Siklin D bağımlı kinazların INK4-

aracılı inhibisyonu ile geri çevrilebilir ve böylece Rb büyümeyi engelleyen hipofosforile halinde kalabilir. TGF-b tarafından $P15^{INK4b}$ indüklenebildiği ve bu şekilde hücre siklüsünün G1 fazında tutulumuna neden olabildiği gösterilmiştir (Hannon and Beach, 1994). P16INK4a'nın ise senesens mekanizmaları ile bağlantılı olarak hücre yaşlandıkça biriktiği bilinmektedir (Palmero et al. 1997). Fetal gelişim sırasında eksprese olan $P18^{INK4c}$ ve $P19^{INK4d}$'nin farklılaşmada rol oyanayabileceği önerilmiştir (Morse ve ark., 1997; Phelps ve ark.,1998). Hücre döngüsü regülasyonu (Şekil. 5-3) özetlenmiştir.



Şekil 5-3: Hücre döngüsü regülasyonu

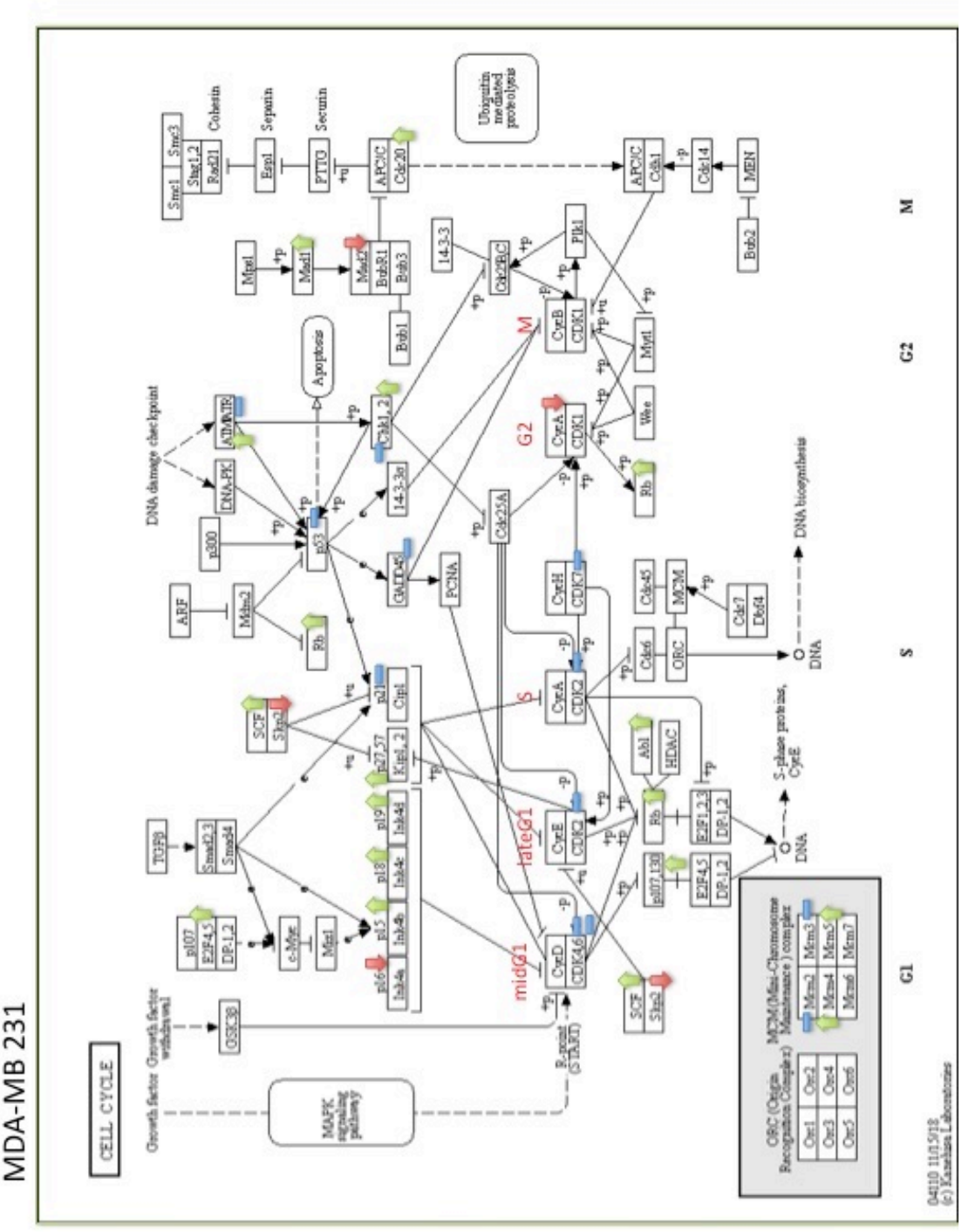
(Whittaker ve ark., 2017)

Hücrenin hayati fonksiyonları için CDK4 ve CDK6 gerekli olmadığından inhibisyonları hücre içinde tolare edilebilmektedir (Malumbres ark. 2004). Erken kuşak pan-CDK inhibitörlerinin kanser hücrelerinde güçlü terapötik etkileri gözlenmemiş, ayrıca klinikte kabul edilemeyen toksik etkileri gözlenmiştir (Whittaker ve ark., 2017). CDK inhibitörlerinin terapotik ajanlar olarak kullanılması üzerine araştırmalar devam etmiş ve son yıllarda güçlü ve spesifik CDK4 ve CDK6 inhibitörleri kanserde hedefe yönelik ilaçlar olarak kullanılmaya başlanmıştır (Asghar ve ark. 2015). ER+/HER2-

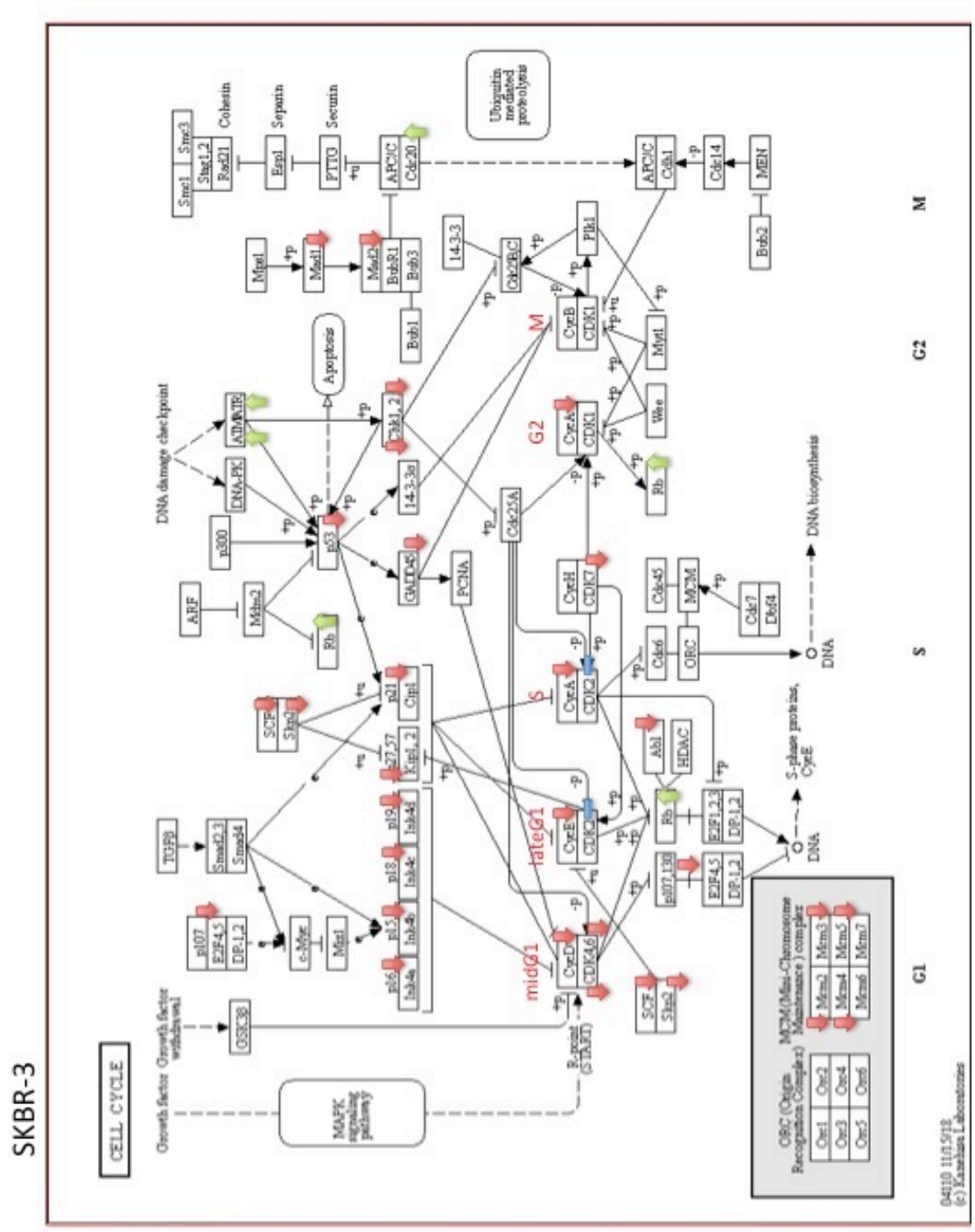
meme kanserlerinde onaylanmış yaklaşımlar bulunmaktadır (Finn ve ark. 2015; VanArsdale ve ark. 2015). FDA tarafından 2015 yılında Palbociclib (Pfizer) ER(+)/HER2(-) meme kanseri tedavisi için onaylanmıştır (Fry ve ark. 2004; Toogood ve ark. 2005). Bu ajanın aşırı toksisiteye yol açmadan ilerlemiş vakalarda progresyonsuz sağkalım süresini önemli ölçüde uzattığı bildirilmiştir (Finn ve ark. 2015; VanArsdale ve ark. 2015).

DNA hasarı ve replikasyon sorunlarında hücre döngüsünün ilerlemesi çeşitli kritik kontrol noktası regülatörleri ve tümör baskılayıcılar tarafından bekletilir. ATM PI3/PI4- kinaz ailesine ait bir gendir. Bu protein önemli bir fosforilleyici hücre döngüsü kontrol noktası kinazı olduğundan p53, BRCA1, CHK2 ve kontrol noktası proteinleri RAD17 ve RAD9 ile DNA tamir proteini NBS1'in regülatörü olarak görev yapar. ATR ile birlikte görev yapan bu protein DNA hasarı ve genom stabilitesine cevapta oynadığı rol nedeni ile hücre döngüsü kontrol sinyal yolağının ana regülatörleri olarak görülür. Diğer bir DNA hasar sensörü olan ATR, DNA replikasyonu ve mitozda etkin çeşitli proteinlerin aktivasyonunu, DNA tamirini, rekombinasyon ve apoptozu indükleyebilmektedir (Maréchal ve Zou, 2013). ATM ve ATR CHK1 ve CHK2 kinazları kontrol ederek farklı DNA hasar cevaplarını etkileyebilmektedir. Yapısal olarak farklı olan bu serin/treonin kinazlar kesişen substrat spesifitelerine sahiptir (Elledge , 1996). CHK'ler DNA hasarına veya replike edilememiş DNA'ya cevap olarak kontrol noktası aracılı hücre döngüsü tutulumu için gereklidir. Bu protein ATM ve ATR'den gelen sinyalleri birleştirir. Çift zincir DNA kırıklarında hücre döngüsünün engellenebilmesi için CDC25A protein fosfataz'ın CHK'lar tarafından fosforillenmesi gereklidir. CHK1 inhibitörlerinin DNA hasarı yaratan birçok kemoterapötik ajana karşı kanser hücre hatlarını duyarlı hale getirdiği ve çeşitli hücre hatlarında sitotoksisite artışına neden olduğu bildirilmiştir (Warren ve Eastman, 2019). ATR inhibitörü uygulamasının SKBR-3 dahil çeşitli meme kanseri hatlarında apoptoz ve S fazı tutulumu ve CHK1 ekspresyonunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca CHK1 ekspresyonundaki azalmanın HR inaktivasyonu nedeniyle DNA hasarı birikimine yol açtığı bildirilmiştir (Kim ve ark., 2017).

Çalışmamızda MDA-MB-231 hücre hattında PK uygulamasının ATM ve CHK2 up regülasyonuna neden olurken, ATR ve CHK1 ekspresyonlarında anlamlı bir değişim görülmemiştir (Şekil 5-4; Şekil 5-5). SKBR-3 hücre hattında ise ATM ve ATR up regülasyonu görülürken, CHK1 ve CHK2 down regülasyonları görülmüştür.



Şekil 5-4: MDA-MB-231 hücre hattında PK uygulaması ile hücre döngüsü yolağında indüklenen ekspresyon değişimleri



Şekil 5-5: MDA-MB-231 hücre hattında PK uygulaması ile hücre döngüsü yolağında indüklenen ekspresyon değişimleri

Mini kromozom bakım proteinleri (Mini chromosome maintenance proteins; MCM) ökaryötik genom replikasyonunda görevlidir. MCM2-7 kompleksi her hücre döngüsünde bir kere DNA replikasyonunun başlaması ve devam etmesinde görevlidir. Pre-replikasyon kompleksinin anahtar komponenti olan bu proteinler replikasyon çatalının oluşmasında ve diğer replikasyon ilişkili proteinlerin toplanmasında rol oynamakta, MCM2-MCM kompleksinin ve helikaz aktivitesinin regülasyonunu sağlamaktadırlar. MCM2 regülasyonu ise CDC2 ve CDC7 tarafından yapılmaktadır. P53 tümör baskılayıcı proteini normal koşullarda, ubikutinasyonunu ve degredasyonunu sağlayan MDM2 aktivitesi ile düşük seviyelerde tutulur. MDM2 ekspresyonu p53 ile stimüle olur. TP53'ü indükleyen genotoksik ve non-genotoksik stresler p53-MDM2 birlikteliğini bozup p53'ün stabilizasyonunu sağlayarak, p53 cevap genlerinin ekspresyonunu indükler. Bu yolağın indüklenmesi hücre tipi ve stres spesifik olarak büyüme tutulumu veya apoptoz ile sonuçlanabilmektedir (Meek, 2004).

Çalışmamızda MDA-MB-231 hücre hattında PK uygulaması sonucunda MCM2 ve -3 ekpresyonlarında anlamlı bir değişim gözlenmezken MCM4 ve -5 up regülasyonu gözlemlenmiştir. Ayrıca p53 ve CDC2 down regülasyonu görülmektedir. SKBR-3 hücre hatlarında ise MCM2-5 ve p53 down regülasyonu görülürken CDC ekspresyonlarında anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 5-4; Şekil 5-5).

Mitotik iplikçiklerin dizilimi kontrol noktasının bir komponenti olan MAD1 homodimer oluşturarak MAD2 ile etkileşime girer. MAD2 kinetakorlarda birikerek her kromozom için mikrotübüllerin kinetokorlara doğru bağlanana kadar anafaz geçişini engeller ve kromozom anomalilerinin önüne geçmeyi amaçlar, dolayısı ile mitotik kontrol noktasının geçilebilmesi noktasında kritik önem taşır. Kromozomlar uygun bir şekilde metafaz plağına dizilene kadar regülatör bir protein olan CDC20'yi ayrı tutarak Anafaz promotör kompleks (APC/C) aktivitesini inhibe eder. Metafazda MAD2-CDC20-APC/C kompleksi inaktif iken anafazda CDC20-APC/C aktif hale gelerek kromozom ayrılmasında etki gösterirler. MAD2 baskılanmasının hücresel senesens veya hücre döngüsü ile sonuçlanmaktadır (Bates ve ark., 2019).

Mitotik bir siklin olan siklin B hücrelerin mitoza girmesini sağlamak amacıyla CDK1 ile kompleks yaparak maturasyon promotor faktör'ü (Maturation forming factor, MPF) oluşturur ve bu şekilde anahtar proteinlerin fosforilasyonunu sağlar. Bu kompleks hücrelerin mitozdan çıkabilmesi ve yavru hücrelerin G1 fazına geçebilmesi için degrade

edilmelidir. Siklin B'nin CDC-20-APC/C aracılı degredasyonu mitotik çıkış sinyalini oluşturur (Jones, 2004).

Tez çalışmamızda PK uygulanmış MDA-MB-231 hücre hattında MAD1 ve CDC20 up regülasyonu görülürken, MAD2 down regülasyonu görülmüştür. Siklin B2'nin up regüle olduğu gözlenirken, Siklin B1 ekspresyonunda anlamlı bir fark görülmemiştir. SKBR-3 hücre hattında ise CDC20 up regülasyonu görülürken MAD1 ve MAD2 down regülasyonu görülmüştür. SKBR-3 hücre hattında ayrıca MDA-MB-231 hücrelerinden farklı olarak Siklin B2 ekspresyonunda anlamlı bir değişim görülmezken, Siklin B1 down regülasyonu görülmüştür. Bu moleküllerden Siklin B1 mikrotübüllerde lokalize olurken, siklin B2 golgi ile ilişkilidir. Siklin B2/cdc2 aynı zamanda TGF-b aracılı hücre döngüsü kontrolünde anahtar rol oynayabilir (Şekil 5-4; Şekil 5-5).

SK-BR-3 meme kanseri hücre hattında apigenin uygulaması sonucunda p21 ve p27 ekspresyonlarının artması ve siklin A, B, E ve Cdk1 ekspresyonlarının azalması ile G2/M fazında tutuluma yol açtığı gösterilmiştir (Choi ve ark., 2009). Bu hücrelerde quercetin ve resveratrol uygulamalarının da doz bağımlı olarak poli-ubiquitinasyon ile HER2 ekspresyonunun düşmesine neden olduğu görülmüştür (Jeong ve ark., 2008; Khan ve ark., 2014). MCF-7 hücrelerinde EGCG ve curcumin kombinasyonunun ise doxorubicin toksisitesini arttırmıştır (Wang ve ark., 2014). Aynı polifenol kombinasyonunun sinerjetik sitotoksik etkileri ve hücrelerin G2/M fazında birikimi MDA-MB- 231 hücrelerinde de gözlemlenmiştir (Somers-Edgar ve ark., 2008).

Bizim çalışmamızda polifenolik madde karışımının MDA-MB-231 ve SKBR-3 agresif meme kanseri hücre hatlarında farklı etkileri gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hatlarında Siklin B2, Siklin D2 ve Siklin E2'nin yanı sıra E2F4 ve Rb ekspresyonlarının arttığı siklin A ekpresyonunun ise düştüğü gözlenmiştir. Bunun yanında CDK -2, -4, -6 ve -7 ekspresyonlarında ise anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. İnhibitör proteinler olan p15, p18, p19 ve p27 ekspresyonlarında artış görülürken p21'de anlamlı bir fark bulunamamış, senesens belirteci olarak da kabul edilen p16'nın ise down regüle olduğu bildirilmiştir (Şekil 5-4; Şekil 5-5). SKBR-3 hücre hatlarında ise Siklin ve CDK proteinlerinin geneline ek olarak inhibitör Cip/kip ve INK proteinlerinde de bir down regülasyon görülmüştür. P21 ve CDK2' de anlamlı bir fark görülmemiştir. Buna ek olarak E2F4 down regülasyonu ve Rb up regülasyonu belirlenmiştir (Şekil 5-4;

Şekil 5-5). Sonuç olarak oluşturduğumuz polifenolik madde kokteyli uygulamasının apoptotik yolakların yanı sıra her iki hücre hattında da hücre döngüsünün farklı noktalarında ekspresyonel değişimler ile hücre proliferasyonunu da etkilediğini söyleyebiliriz.

Birçok polifenolik maddenin bir arada bulunduğu karışımımızın farklı agresif meme kanseri hücre hatlarında birçok sinyal yolağı üzerinden kanser hücrelerinin sağ kalım çıkışlarını aradığı yolakları etkisiz bırakıp diğer yolakları da aktive ederek hücreleri apoptoza yönlendirdiği gösterilmiştir. Farklı polifenolik maddelerin bir arada kullanımı ile kanser tedavisinde hedeflenen iki ana yolak olan apoptoz ve hücre döngüsünde istenen etkileri sağladıkları göz önüne alındığında; hem yeni kemoterapötiklerin tasarlanmasında hem de mevcut tedavilere destek amaçlı kullanılabilecek etkin bir tedavi yaklaşımı olabileceği görülmüştür.

KAYNAKLAR

Adjakly M, Ngollo M, Boiteux JP, et al. Genistein and daidzein: different molecular effects on prostate cancer [J]. Anticancer Res. 2013;33(1):39–44.

Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. Anticancer Res 2004; 24:2783-840.

Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. Anticancer Res 2004; 24:2783-840.

Agoston, V.; Csermely, P.; Pongor, S. Multiple weak hits confuse complex systems: A transcriptional regulatory network as an example. Phys. Rev. E Stat. Nonlinear Soft Matter Phys. 2005, 71, 051909.

Agric Food Chem. 1993;41(8):1242–6.

Ahmad N, Gali H, Javed S, et al. Skin cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin are mediated via impairment of receptor tyrosine kinase signaling and perturbation in cell cycle progression [J]. Biochem Biophys Res Commun. 1998;247(2):294–301.

Anantharaju PG, Gowda PC, Vimalambike MG, Madhunapantula SV. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. Nutr J. 2016 Dec 1;15(1):99.

Anantharaju PG, Gowda PC, Vimalambike MG, Madhunapantula SV. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. Nutr J. 2016 Dec 1;15(1):99.

Anastasiadi Z, Lianos GD, Ignatiadou E, Harissis HV, Mitsis M. Breast cancer in young women: an overview. Updates Surg. 2017 Sep;69(3):313-317. doi: 10.1007/s13304-017-0424-1. Epub 2017 Mar 4.

Anders CK, Hsu DS, Broadwater G et al (2008) Young age at

BA, Pestell RG: Reduced cyclin D1 expression in the cerebella of nutritionally deprived rats correlates with developmental delay and decreased cellular DNA synthesis. J Neuropathol Exper Neurol 55:1009-1020, 1996

Bakalkin G, Selivanova G, Yakovleva T, Kiseleva E, Kashuba E, Magnusson KP, Szekely L, Klein G, Terenius

Bang CI, Paik SY, Sun DI, et al. Cell growth inhibition and down-regulation of survivin by silibinin in a laryngeal squamous cell carcinoma cell line [J]. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2008;117(10):781–5.

Bates M, Furlong F, Gallagher MF, Spillane CD, McCann A, O'Toole S, O'Leary JJ. Too MAD or not MAD enough: The duplicitous role of the spindle assembly checkpoint protein MAD2 in cancer. Cancer Lett. 2019 Oct 5;469:11-21. doi: 10.1016/j.canlet.2019.10.005.

Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1996;**274**:782–784.

Bermudez-Soto MJ, Larrosa M, Garcia-Cantalejo J, et al. Transcriptional changes in

human caco-2 colon cancer cells following exposure to a recurrent non-toxic dose of polyphenol-rich chokeberry juice [J]. Genes Nutr. 2007;2(1):111–3.
Biedermann D, Vavrikova E, Cvak L, et al. Chemistry of silybin [J]. Nat Prod Rep. 2014;31(9):1138–57.
Biol Interact. 2002;139(1):1–21.
Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12.
breast cancers with shared patterns of gene expression. J Clin
Bruey JM, Bruey-Sedano N, Luciano F, Zhai D, Balpai R, Xu C, Kress CL, Bailly-Maitre B, Li X, Osterman A, Matsuzawa S, Terskikh AV, Faustin B, Reed JC. Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. Cell. 2007 Apr 6;129(1):45-56.
Bu-Abbas A, Clifford MN, Walker R, et al. Contribution of caffeine and flavanols in the induction of hepatic phase ii activities by green tea [J]. Food Chem Toxicol. 1998;36(8):617–21.
C. Spagnuolo, M. Russo, S. Bilotto, I. Tedesco, B. Laratta, G.L. Russo, Dietary polyphenols in cancer prevention: the example of the flavanoid quercetin in activation of MEK/ERK signaling pathway, Chem. Biol. Inter 257 (2016) 26**e**34.
Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, et al. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. Int J Cancer 2000;87:595–600.
Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature 2012;490:61e70.
cancer. J Clin Oncol 31:3191–3196
Cell cycle dependent growth factor regulation of gene expression.
Chahar MK, Sharma N, Dobhal MP, et al. Flavonoids: a versatile source of anticancer drugs [J]. Pharmacogn Rev. 2011;5(9):1–12.
Chen HZ, Tsai SY, Leone G (2009) Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. Nat Rev Cancer 9:785–797
Choi S, Youn J, Kim K et al. Apigenin inhibits UVA-induced cytotoxicity in vitro and prevents signs of skin aging in vivo. Int J Mol Med. 2016 Aug;38(2):627-34.
Choi, E.J.; Kim, G.H. Apigenin causes G(2)/M arrest associated with the modulation of p21(Cip1) and Cdc2 and activates p53-dependent apoptosis pathway in human breast cancer SK-BR-3 cells. J. Nutr. Biochem. 2009, 20, 285–290
Cibin TR, Devi DG, Abraham A. Chemoprevention of skin cancer by the flavonoid fraction of saraca asoka [J]. Phytother Res. 2010;24(5):666–72.
Clarke AR, Gledhill S, Hooper ML, Bird CC, Wyllie AH: p53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation. Oncogene 9:1767-1773, 1994
Comelli MC, Mengs U, Schneider C, et al. Toward the definition of the mechanism of action of silymarin: activities related to cellular protection from toxic damage induced by chemotherapy [J]. Integr Cancer Ther. 2007;6(2):120–9.

Crozier, A.; Jaganath, I.; Clifforrd, M. Plant Secondary Metabolites, 1st ed.; Blackwell Publishing Ltd.: Oxford, UK, 2006; pp. 1–25.
Csermely, P. Strong links are important, but weak links stabilize them. Trends Biochem. Sci. 2004, 29, 331–334.
Curtis C, Shah SP, Chin SF, et al, for the METABRIC Group. The genomic and transcriptomic architecture of 2000 breast tumours reveals novel subgroups. Nature 2012; 486: 346–52.
Curtis, C. et al. (2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. Nature 486, 346–352 3.
Dal-Ho H, Hirofumi T, Yamada K. Inhibition of environmental estrogeninduced proliferation of human breast carcinoma mcf-7 cells by flavonoids [J]. Vitro Cell Dev Biol Anim. 2001;37(5):275–82.
de Groot H, Rauen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. Fundam Clin Pharmacol 1998; 12:249–55.
de Groot H. Reactive oxygen species in tissue injury. Hepatogastroenterology 1994;41:328–32.
Deep G, Agarwal R. Antimetastatic efficacy of silibinin: molecular mechanisms and therapeutic potential against cancer [J]. Cancer Metastasis Rev. 2010;29(3):447–63.
Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*2003;**22**:8543–8567.
development strategy. Front Nutr. 2016;3:48.
diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of
Dynlacht BD, Moberg K, Lees JA, Harlow E, Zhu L (1997) Specifi c regulation of E2F family
Egert S, Rimbach G. Which sources of flavonoids: complex diets or dietary supplements? [J]. Adv Nutr: Int Rev J. 2011;2(1):8–14.
Eisenstein M (2015) Medicine: eyes on the target. Nature 527(7578):S110–S112
el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell. 1993 Nov 19;75(4):817-25.
Eliyatkın N, Yalçın E, Zengel B ve ark. Meme Karsinomunda Moleküler Sınıflama: Gelenekselden Yeni Döneme Yolculuk. J Breast Health 2015; 11: 59-66

Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. Science 1996; 274:1664-72; PMID:8939848; http://dx.doi.org/10.1126/science.274.5293.1664
Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007 Jun;35(4):495-516.
Espinosa-Oliva AM, García-Revilla J, Alonso-Bellido IM, Burguillos MA. Brainiac Caspases: Beyond the Wall of Apoptosis. Front Cell Neurosci. 2019 Nov 5;13:500. doi: 10.3389/fncel.2019.00500. eCollection 2019.
expression and apoptosis in HTLV-1-infected cell lines: A prospective agent for adult T cell leukemia chemotherapy. Nutr Cancer 2002; 44:193-201.
F. Sun, X.Y. Zheng, J. Ye, T.T. Wu, J.L. Wang, W. Chen, Potential anticancer activity of myricetin in human T24 bladder cancer cells both in vitro and in vivo, Nutr. Cancer

64 (2012) 599**e**606.
Fantini, M.; Benvenuto, M.; Masuelli, L.; Frajese, G.V.; Tresoldi, I.; Modesti, A.; Bei, R. In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: Perspectives on cancer treatment. Int J Mol. Sci 2015, 16, 9236–9282.
Feng Y, Spezia M, Huang S et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. Genes Dis. 2018 May 12;5(2):77-106. doi: 10.1016/j.gendis.2018.05.001. eCollection 2018 Jun.
Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, et al. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. FEBS Lett 1997;416:123–9.
Ferrandiz ML, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. Agents Actions 1991;32:283–8.
Ferzoco RM, Ruddy KJ (2015) Unique aspects of caring for - young breast cancer patients. Curr Oncol Rep. 17(2):1. doi:10.
Flaig TW, Glode M, Gustafson D, et al. A study of high-dose oral silybinphytosome followed by prostatectomy in patients with localized prostate cancer [J]. Prostate. 2010;70(8):848–55.
Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food Chem Toxicol 1995;33:1061–80.
Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, et al. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. Cancer Res 1997;57:2916–21.
Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, et al. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis [J]. Cancer Res. 1997;57(14):2916–21.
Fredholm H, Eaker S, Frisell J et al (2009) Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. PLoS One 4(11):e7695
Friedel AM, Pike BL, Gasser SM (2009) ATR/ Mec1: coordinating fork stability and repair. Curr Opin Cell Biol 21:237–244
Friesenecker B, Tsai AG, Intaglietta M. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. Int J Microcirc Clin Exp 1995;15(suppl):17–21.
G. Meng, K. Chai, X. Li, Y. Zhu, W. Huang, Luteolin exerts pro-apoptotic effect and anti-migration effects on A549 lung adenocarcinoma cells through the
Gabriel CA, Domchek SM (2010) Breast cancer in young women. Breast Cancer Res 12:212
Gontijo VS, Dos Santos MH, Viegas C Jr. Biological and chemical aspects of natural biflavonoids from plants: a brief review. Mini Rev Med Chem. 2016. doi:10.2174/1389557517666161104130026.
Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. Br J Surg 1994;81:637–47.
Greaney ML, Sprunck-Harrild K, Ruddy KJ et al (2015) Study protocol for Young & Strong: a cluster randomized design to increase attention to unique issues faced by young women with newly diagnosed breast cancer. BMC Public Health 31(15):37
Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC: Mutations in the p53 tumor

suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res 54:4855-4878, 1994
H.J. Lee, H.S. Seo, J. Ryu, Y.P. Yoon, S.H. Park, C.J. Lee, Luteolin inhibited the gene expression, production and secretion of MUC5AC mucin via regulation of
Haenen GR, Bast A. Nitric oxide radical scavenging of flavonoids. Methods Enzymol 1999;301:490–503.
Halliwell B. How to characterize an antioxidant: an update. Biochem Soc Symp 1995;61:73–101.
Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. Lancet 2017; 389: 1134–50
Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Sethi G, et al. Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. Int J Cancer 2010; 127:257-68.
Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Sethi G, et al. Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. Int J Cancer 2010; 127:257-68.
Harris Z, Donovan MG, Branco GM, Limesand KH, Burd R. Quercetin as an emerging anti-melanoma agent: a four-focus area therapeutic
Hayashibara T, Yamada Y, Nakayama S, et al. Resveratrol induces downregulation in survivin
Hayashibara T, Yamada Y, Nakayama S, et al. Resveratrol induces downregulation in survivin expression and apoptosis in HTLV-1-infected cell lines: A prospective agent for adult T cell leukemia chemotherapy. Nutr Cancer 2002; 44:193-201.
Heber-Katz E, Zhang Y, Bedelbaeva K, et al. Cell cycle regulation and regeneration. Current Topics in Microbiology and Immunology. 2013 ;367:253-276. DOI: 10.1007/82_2012_294.
Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. Arch Intern Med 1995;155:381–6.
Hertog MGL, Hollman PCH, van de Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices [J]. J
Hinchcliffe EH, Sluder G (2001) “It takes two to tango”: understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. Genes Dev 15:1167–1181
Hoag H (2015) Molecular biology: marked progress. Nature 527(7578):S114–S115
Hodek P, Trefil P, Stiborova M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes p450 [J]. Chem
Hoh C, Boocock D, Marczylo T, et al. Pilot study of oral silibinin, a putative chemopreventive agent, in colorectal cancer patients: silibinin levels in plasma, colorectum, and liver and their pharmacodynamics consequences [J]. Clin Cancer Res. 2006;12(9):2944–50.
Hollman PC, Katan MB. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. Food Chem Toxicol 1999;37:937–42.
Hollman PC, van Trijp JM, Buysman MN, et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. FEBS Lett 1997;418:152–6.

Horgan XJ, Tatum H, Brannan E, Paull DH, Rhodes LV. Resveratrol analogues surprisingly effective against triple-negative breast cancer, independent of ERα. Oncol Rep. 2019 Jun;41(6):3517-3526. doi: 10.3892/or.2019.7122. Epub 2019 Apr 16.
http://www.pathophys.org/breast-cancer/
https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_4V52
Hua WF, Fu YS, Liao YJ, et al. Curcumin induces down-regulation of EZH2 expression through the MAPK pathway in MDA-MB-435 human breast cancer cells. Eur J Pharmacol 2010; 637:16-21.
human bladder cancer cells, Cancer Cell Int. 13 (2013) 54.
Huzarski T, Byrski T, Gronwald J et al (2013) Ten-year survival in patients with BRCA1-negative and BRCA1-positive breast
Hwang KA, Choi KC. Anticarcinogenic effects of dietary phytoestrogens and their chemopreventive mechanisms [J]. Nutr Cancer. 2015;67(5):796–803.
Iwashita K, Kobori M, Yamaki K, et al. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in b16 melanoma 4a5 cells [J]. Biosci Biotechnol Biochem. 2000;64(9):1813–20.
J Cell Physiol. 1989 Dec;141(3):535-42.
Jaskulski S, Jung AY, Rudolph A, Johnson T, Thöne K, Herpel E, Sinn P, Chang-Claude J. Genistein and enterolactone in relation to Ki-67 expression and HER2 status in postmenopausal breast cancer patients. Mol Nutr Food Res. 2017 Nov;61(11). doi: 10.1002/mnfr.201700449. Epub 2017 Sep 1.

Jeong, J.H.; An, J.Y.; Kwon, Y.T.; Li, L.Y.; Lee, Y.J. Quercetin-induced ubiquitination and down regulation of Her-2/neu. J. Cell. Biochem. 2008, 105, 585–595.
Jiang J, Yao S, Cai HH, Yang PH, Cai J. Synthesis and synergetic effects of chrysin-organogermanium (IV) complex as potential anti-oxidant. Bioorg Med Chem Lett. 2013 Oct 15;23(20):5727-32. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.07.073. Epub 2013 Aug 8.

Jones KT. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. Mol Hum Reprod. 2004;10(1):1–5.

Jordan, N.V. et al. (2016) HER2 expression identifies dynamic functional states within circulating breast cancer cells. Nature 537, 102–106
Kato K, Mori H, Fujii M, et al. Lack of promotive effect of quercetin on methylazoxymethanol acetate carcinogenesis in rats. J Toxicol Sci 1984;9:319–25.
Katyal P, Bhardwaj N, Khajuria R. Flavonoids and their therapeutic potential as anticancer agents; biosynthesis, metabolism and regulation
Kaya-Aksoy E1, Cingoz A1, Senbabaoglu F1, Seker F1, Sur-Erdem I1, Kayabolen A1, Lokumcu T1, Sahin GN2, Karahuseyinoglu S2, Bagci-Onder T1. The pro-apoptotic Bcl-2 family member Harakiri (HRK) induces cell death in glioblastoma multiforme. Cell Death Discov. 2019 Feb 8;5:64. doi: 10.1038/s41420-019-0144-z. eCollection 2019.
Keegan TH, DeRouen MC, Press DJ, Kurian AW, Clarke CA (2012) Occurrence of

breast cancer subtypes in adolescent and young adult women. Breast Cancer Res 14:R55

Khan, A.; Aljarbou, A.N.; Aldebasi, Y.H.; Faisal, S.M.; Khan, M.A. Resveratrol suppresses the proliferation of breast cancer cells by inhibiting fatty acid synthase signaling pathway. Cancer Epidemiol. 2014, 38, 765–772.

Khan, S.I.; Aumsuwan, P.; Khan, I.A.;Walker, L.A.; Dasmahapatra, A.K. Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome. Chem. Res. Toxicol. 2012, 25, 61–73.

Kim HJ, Han W, Yi OV, Shin HC, Ahn SK, Koh BS et al (2011) Young age is associated with ipsilateral breast tumor recurrence after breast conserving surgery and radiation therapy in patients with HER2-positive/ER-negative subtype. Breast Cancer Res Treat 130:499–505

Kim HJ, Min A, Im SA, Jang H, ve ark. Anti-tumor activity of the ATR inhibitor AZD6738 in HER2 positive breast cancer cells. Int J Cancer. 2017 Jan 1;140(1):109-119. doi: 10.1002/ijc.30373. Epub 2016 Oct 21.

Kim HP, Mani I, Iversen L, Ziboh VA. Effects of naturally-occurring flavonoids and bioflavonoids on epidermal cyclooxygenase and

Kim JH, Lee BK, Lee KW, Lee HJ. Resveratrol counteracts gallic acid-induced down-regulation of gap-junction intercellular communication. J Nutr Biochem 2009; 20:149-54

Kim MH. Flavonoids inhibit vegf/bfgf-induced angiogenesis in vitro by inhibiting the matrix-degrading proteases [J]. J Cell Biochem. 2003;89(3):529–38.

Kioka N, Hosokawa N, Komano T, et al. Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the increase of human multidrug resistance gene (mdr1) expression caused by arsenite [J]. FEBS Lett. 1992;301(3):307–9.

Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, et al. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. Am J Epidemiol 1997;146:223–30.

Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, et al. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. Am J Epidemiol 1997;146:223–30.

Kong WY, Yee ZY, Mai CW, Fang CM, Abdullah S, Ngai SC. Zebularine and trichostatin A sensitized human breast adenocarcinoma cells towards tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. Heliyon. 2019 Sep 19;5(9):e02468. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02468.

Konig A, Schwartz GK, Mohammad RM, et al. The novel cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol downregulates bcl-2 and induces growth arrest and apoptosis in chronic b-cell leukemia lines [J]. Blood. 1997;90(11):4307–12.

Korkina LG, Afanas'ev IB. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. Adv Pharmacol 1997;38:151–63.

Krek W, Xu G, Livingston DM (1995) Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint. Cell 83:1149–1158,

Kumar P, Kadakol A, Shasthrula PK, Mundhe NA, Jamdade VS, Barua CC, Gaikwad AB. Curcumin as an adjuvant to breast cancer treatment. Anticancer Agents Med Chem. 2015;15(5):647-56.

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview [J]. Sci World J. 2013;2013:162750.
Kuong KJ, Loeb LA. APOBEC3B mutagenesis in cancer. Nat Genet 2013;45: 964e5.
L, Wiman KG: p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. Nucleic Acids Res 23: 362-369, 1995
Lall, R.K.; Syed, D.N.; Adhami, V.M.; Khan, M.I.; Mukhtar, H. Dietary polyphenols in prevention and treatment of prostate cancer. Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 3350–3376.
Le Marchand L, Murphy SP, Hankin JH, et al. Intake of flavonoids and lung cancer [J]. J Natl Cancer Inst. 2000;92(2):154–60.
Lee HB, Han W (2014) Unique features of young age breast cancer and its management. J Breast Cancer 17(4):301–307
Lee JY, Kim HS, Song YS. Genistein as a potential anticancer agent against ovarian cancer [J]. J Tradit Complement Med. 2012;2(2):96–104.
Lee WR, Shen SC, Lin HY, et al. Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and ca(2+)-dependent endonuclease [J]. Biochem Pharmacol. 2002;63(2):225–36.
LeeS, Elenbaas B, Levine A, Griffith J: p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. Cell 81:1013-1020, 1995
leukemia, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1259 (2012) 95**e**103.
Li L, Zeng J, Gao Y, et al. Targeting silibinin in the antiproliferative pathway [J]. Expert Opin Investig Drugs. 2010;19(2):243–55.
Li, A.N.; Li, S.; Zhang, Y.J.; Xu, X.R.; Chen, Y.M.; Li, H.B. Resources and biological activities of natural polyphenols. Nutrients 2014, 6, 6020–6047.
Lianos GD, Vlachos K, Zoras O (2014) Potential of antibodydrug conjugates and novel therapeutics in breast cancer management. Onco Targets Ther 24(7):491–500
Lin-Lin Liu, Hui Zhao, Teng-Fei Ma, Fei Ge, Ce-Shi Chen, Ya-Ping Zhang. Identification of Valid Reference Genes for the Normalization of RT-qPCR Expression Studies in Human Breast Cancer Cell Lines Treated with and without Transient Transfection
lipoxygenase from guinea-pigs. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1998;58:17–24.
Little JB, Nagasawa H, Keng PC, Yu Y, Li CY: Absence of radiation-induced G1 arrest in two closely related human lymphoblast cell lines that differ in p53 status. J Bioi Chern 270:11033-11036, 1995
Liu Q, Loo WT, Sze SC, Tong Y. Curcumin inhibits cell proliferation of MDA-MB-231 and BT-483 breast cancer cells mediated by down-regulation of NFkappaB, cyclinD and MMP-1 transcription. Phytomedicine 2009; 16:916-22.
Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaira P (2008)
Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. J Mol Med 1996;74:297–312. (Published erratum appears in J Mol Med 1997;75:67–8.)

Lou M, Zhang LN, Ji PG, et al. Quercetin nanoparticles induced autophagy and apoptosis through akt/erk/caspase-3 signaling pathway in human neuroglioma cells: In vitro and in vivo [J]. Biomed Pharmacother. 2016;84:1–9.
Maity A, McKenna WG, Muschel RJ: The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. Radiother Oncol31:1-13, 1994
Manach C, Morand C, Demigne C, Texier O, Regerat F, Remesy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. FEBS Lett 1997; 409:12–6.
Manach C, Morand C, Texier O, et al. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. J Nutr 1995; 125:1911–22.
Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. Am. J. Clin. Nutr. 2004, 79, 727–747.
Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, et al. Silymarin suppresses tnfinduced activation of nf-kappa b, c-jun n-terminal kinase, and apoptosis [J]. J Immunol. 1999;163(12):6800–9.
Manthey JA, Grohmann K, Guthrie N. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation [J]. Curr Med Chem. 2001;8(2):135–53.
Maréchal A, Zou L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013 Sep 1;5(9). pii: a012716. doi:10.1101/cshperspect.a012716.
Marti A, Wirbelauer C, Scheffner M, Krek W (1999) Interaction between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. Nat Cell Biol 1:14–19
Martin PM, Horwitz KB, Ryan DS, et al. Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells [J]. Endocrinology. 1978;103(5):1860–7.
Marunaka Y, Marunaka R, Sun H et al. Actions of Quercetin, a Polyphenol, on Blood Pressure. Molecules. 2017 Jan 29;22(2). pii: E209.
Marusyk, A. et al. (2012) Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? Nat. Rev.Cancer 12, 323–334
Matthews LA, Guarne A (2013) Dbf4: the whole is greater than the sum of its parts. Cell Cycle 12:1180–1188
McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013 Apr 1;5(4):a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656.
Meek DW. The p53 response to DNA damage. DNA Repair (Amst). 2004 Aug-Sep;3(8-9):1049-56.
members by cyclin-dependent kinases. Mol Cell Biol 17:3867–3875
Merino Bonilla JA, Torres Tabanera M, Ros Mendoza LH. Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies. Radiologia. 2017 Sep - Oct;59(5):368-379. doi: 10.1016/j.rx.2017.06.003. Epub 2017 Jul 14.
Middleton EJ, Kandaswami C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. Biochem Pharmacol 1992;43:1167–79.
Middleton EJ. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. Adv Exp Med Biol 1998;439:175–82.
Molecular cell biology, 6th edn. WE Freeman and Co, New York 1150 pp

Morgan CJ, Pledger WJ.
Nagao A, Seki M, Kobayashi H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. Biosci Biotechnol Biochem 1999;63:1787–90.
Natoli G, Costanzo A, Ianni A et al. Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. *Cell Signal* 1997;**275**:200–203.
Nebe B, Peters A, Duske K, Richter DU, Briese V. Influence of phytoestrogens on the proliferation and expression of adhesion receptors in human mammary epithelial cells in vitro. Eur J Cancer Prev 2006; 15:405-15.
Nelson CW,Wei EP, Povlishock JT, Kontos HA, Moskowitz MA. Oxygen radicals in cerebral ischemia. Am J Physiol 1992;263: H1356–62.
Nema R, Jain P, Khare S, Pradhan A. Flavonoid and cancer prevention— mini review. Res Pharm. 2015;2(2):46–50.
Neuhouser ML. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies [J]. Nutr Cancer. 2004;50(1):1–7.
Nijveldt, R.J.; van Nood, E.; van Hoorn, D.E.; Boelens, P.G.; van Norren, K.; van Leeuwen, P.A. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. Am. J. Clin. Nutr. 2001, 74, 418–425.
nuclear factor kappa B signaling pathway in human airway epithelial cells, Pulm. Pharmacol. Ther. 31 (2015) 117**e**122.
Oberosler P, Hloch P, Rasperger U, Stahl H: p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. Eur Mol Bioi Organ J 12:2389-2396, 1993
Ohga N, Hida K, Hida Y, et al. Inhibitory effects of epigallocatechin- 3 gallate, a polyphenol in green tea, on tumor-associated endothelial cells and endothelial progenitor cells [J]. Cancer Sci. 2009;100(10):1963–70.
Okushio K, Matsumoto N, Kohri T, Suzuki M, Nanjo F, Hara Y. Absorption of tea catechins into rat portal vein. Biol Pharm Bull 1996;19:326–9.
Oncol 26:3324–3330
Oncotarget 8 (2017) 19834**e**19842.
Ouhtit A, Gaur RL, Abdraboh M, Ireland SK, Rao PN, Raj SG, Al-Riyami H, Shanmuganathan S, Gupta I, Murthy SN, Hollenbach A, Raj MH. Simultaneous inhibition of cell-cycle, proliferation, survival, metastatic pathways and induction of apoptosis in breast cancer cells by a phytochemical super-cocktail: genes that underpin its mode of action. J Cancer. 2013 Nov 14;4(9):703-15. doi: 10.7150/jca.7235.
Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000; 406: 747–52.
Perron, N.R.; Garcia, C.R.; Pinzon, J.R.; Chaur, M.N.; Brumaghim, J.L. Antioxidant and prooxidant effects of polyphenol compounds on copper-mediated DNA damage. J. Inorg. Biochem. 2011, 105, 745–753.
Peterson G, Barnes S. Genistein inhibits both estrogen and growth factor-stimulated proliferation of human breast cancer cells [J]. Cell Growth Differ. 1996;7(10):1345–51.
Petrick JL, Steck SE, Bradshaw PT, et al. Dietary intake of flavonoids and oesophageal and gastric cancer: incidence and survival in the united states of america (USA) [J]. Br J Cancer. 2015;112(7):1291–300.

Piskula MK, Terao J. Accumulation of (_)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. J Nutr 1998;128:1172–8.

Plakas SM, Lee TC,Wolke RE. Absence of overt toxicity from feeding the flavonol, quercetin, to rainbow trout (Salmo gairdneri). Food Chem Toxicol 1985;23:1077–80.

PLoS One. 2015; 10(1): e0117058. Published online 2015 Jan 24. doi: 10.1371/journal.pone.0117058

Prat A, Cheang MC, Martin M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. J Clin Oncol 2013;31:203e9.

Prat A, Pineda E, Adamo B et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. Breast. 2015 Nov;24 Suppl 2:S26-35. doi: 10.1016/j.breast.2015.07.008. Epub 2015 Aug 5.

Primikyri A, Chatziathanasiadou MV, Karali E, Kostaras E, Mantzaris MD, Hatzimichael E, Shin JS, Chi SW, Briasoulis E, Kolettas E, Gerothanassis IP, Tzakos AG. Direct binding of Bcl-2 family proteins by quercetin triggers its pro-apoptotic activity. ACS Chem Biol. 2014 Dec 19;9(12):2737-41. doi: 10.1021/cb500259e. Epub 2014 Oct 9.

Pryor WA. Cigarette smoke radicals and the role of free radicals in chemical carcinogenicity. Environ Health Perspect 1997;105(suppl): 875–82.

Rath PC, Aggarwal BB. TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol*1999;**19**:350–364.

Roarty,K. et al. (2017) Ror2-mediated alternative Wnt signaling regulates cell fate and adhesion during mammary tumor progression. Oncogene Published onlineJune26. http://dx.doi.org/ 10.1038/onc.2017.206

Robak J, Gryglewski RJ. Bioactivity of flavonoids. Pol J Pharmacol 1996;48:555–64.

Rossi M, Rosato V, Bosetti C, et al. Flavonoids, proanthocyanidins, and the risk of stomach cancer [J]. Cancer Causes Control. 2010;21(10):1597–604.

Rowe DL, Ozbay T, O'Regan RM, Nahta R. Modulation of the BRCA1 protein and induction of apoptosis in triple negative breast cancer cell lines by the polyphenolic compound curcumin. Breast Cancer 2009; 3:61-75.

S. Erdogana, K. Turkekula, R. Serttasa, Z. Erdoganb, The natural flavonoid apigenin sensitizes human CD44. prostate cancer stem cells to cisplatin

S. Meng, Y. Zhu, J.-F. Li, X. Wang, Z. Liang, S.-Q. Li, X. Xu, H. Chen, B. Liu, X.Y. Zheng, L.P. Xie, Apigenin inhibits renal cell carcinoma cell proliferation,

S.H. Park, S. Ham, T.H. Kwon, M.S. Kim, D.H. Lee, J.W. Kang, S.R. Oh, D.Y. Yoon, Luteolin induces cell cycle arrest and apoptosis through extrinsic and intrinsic signaling pathways in MCF-7 breast cancer cells, J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 33 (2014) 219**e**231.

Sandoval-Acuna, C.; Ferreira, J.; Speisky, H. Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. Arch. Biochem. Biophys. 2014, 559, 75–90.

Sarkar, F.H.; Li, Y.; Wang, Z.; Kong, D. Cellular signaling perturbation by natural

products. Cell. Signal. 2009, 21, 1541–1547.
Sayers TJ. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. Cancer Immunol Immunother. 2011 Aug;60(8):1173-80. doi: 10.1007/s00262-011-1008-4. Epub 2011 Apr 6.
Schafer, K. A. (1998). The Cell Cycle: A Review. *Veterinary Pathology*, *35*(6), 461–478.
Schindler R, Mentlein R. Flavonoids and vitamin e reduce the release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor from human tumor cells [J]. J Nutr. 2006;136(6):1477–82.
Schnitt, S.J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: From morphology to molecular taxonomy. Mod. Pathol. 2010, 23 (Suppl. S2), S60–S64.
Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol. 2000 Mar;182(3):311-22.
Sflomos, G. et al. (2016) A preclinical model for ERa-positive breast cancer points to the epithelial microenvironment as determinant of luminal phenotype and hormone response. Can-cer Cell 29, 407–422
Shambaugh GE ill, Lee RJ, Watanabe G, Erfurth F, Karnezis AN, Koch AE, Haines GK ill, Halloran M, Brody
Shapiro AB, Ling V. Effect of quercetin on hoechst 33342 transport by purified and reconstituted p-glycoprotein [J]. Biochem Pharmacol. 1997;53(4):587–96.
Si HY, Li DP, Wang TM, et al. Improving the anti-tumor effect of genistein with a biocompatible superparamagnetic drug delivery system [J]. J Nanosci Nanotechnol. 2010;10(4):2325–31.
Singh BN, Rawat AK, Bhagat RM, Singh BR. Black tea: Phytochemicals, cancer chemoprevention, and clinical studies. Crit Rev Food Sci Nutr. 2017 May 3;57(7):1394-1410. doi: 10.1080/10408398.2014.994700.
Somers-Edgar, T.J.; Scandlyn, M.J.; Stuart, E.C.; le Nedelec, M.J.; Valentine, S.P.; Rosengren, R.J. The combination of epigallocatechin gallate and curcumin suppresses ER_-breast cancer cell growth in vitro and in vivo. Int. J. Cancer 2008, 122, 1966–1971.
Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 10869–74.
Spraycar M, ed.: Stedman's Medical Dictionary, 26th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1995
Stefani ED, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, et al. Dietary antioxidants and lung cancer risk: a case-control study in Uruguay. Nutr Cancer 1999;34:100–10.
Sun XY, Plouzek CA, Henry JP, et al. Increased udp-glucuronosyltransferase activity and decreased prostate specific antigen production by biochanin a in prostate cancer cells [J]. Cancer Res. 1998; 58(11):2379–84.
Surai PF. Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives [J]. Antioxidants (Basel, Switzerland). 2015;4(1):204–47.
Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals [J]. Nat Rev Cancer. 2003;3(10):768–80.

T. Kuno, T. Tsukamoto, A. Hara, T. Tanaka, Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds, J. Biophys. Chem. 3 (2012) 156**e**173.
T.K. Gopal, D. Chamundeeswari, S. Sathiya, C.S. Babu, In vitro anti-cancer activity of Quercetin and Kaempferol against human epithelial malignant melanoma cells (A375), IJPRS 4 (2015) 157**e**162.
Tez referanslar
The Cancer Genome Atlas Network(2012)Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature 490, 61–70 4.
therapy, Biomed. Pharmacother. 88 (2017) 210**e**217.
Tsyrlov IB, Mikhailenko VM, Gelboin HV. Isozyme- and species-specific susceptibility of cdna-expressed cyp1a p-450s to different flavonoids [J]. Biochim Biophys Acta. 1994;1205(2):325–35.
van Diest, Paul J., Elsken van der Wall, and Jan PA Baak. "Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review." Journal of clinical pathology 57.7 (2004): 675-681.

van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. Oncologist. 2006 Apr;11(4):397-408.
Varinska, L.; Gal, P.; Mojzisova, G.; Mirossay, L.; Mojzis, J. Soy and breast cancer: Focus on angiogenesis. Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 11728–11749.
Verigos J, Magklara A (2015) Revealing the complexity of breast cancer by next generation sequencing. Cancers (Basel) 7(4):2183–2200
Villarreal-Garza C, Aguila C, Magallanes-Hoyos MC, Mohar A et al (2013) Breast cancer in young women in Latin America: an unmet, growing burden. Oncologist 18(Suppl):26–34. doi:10.1634/theoncologist.18-S2-26
Vue B, Zhang S, Chen QH. Flavonoids with therapeutic potential in prostate cancer [J]. Anticancer Agents Med Chem. 2016;16(10):1205–29.
Wang C, Wang L, Yu X, et al. Combating acquired resistance to trastuzumab by an anti-ErbB2 fully human antibody. Oncotarget. 2017 Jun 27;8(26):42742-42751. doi: 10.18632/oncotarget.17451.
Wang HK. The therapeutic potential of flavonoids [J]. Expert Opin Investig Drugs. 2000;9(9):2103–19.
Wang SF, Wu MY, Cai CZ, Li M, Lu JH. Autophagy modulators from traditional chinese medicine: mechanisms and therapeutic potentials for cancer and neurodegenerative diseases. J Ethnopharmacol. 2016;194:861–76.
Wang, S.; Chen, R.; Zhong, Z.; Shi, Z.; Chen, M.; Wang, Y. Epigallocatechin-3-gallate potentiates the effect of curcumin in inducing growth inhibition and apoptosis of resistant breast cancer cells. Am. J. Chin. Med. 2014, 42, 1279–1300.
Warren NJH1, Eastman A2. Inhibition of checkpoint kinase 1 following gemcitabine-mediated S phase arrest results in CDC7- and CDK2-dependent replication catastrophe. J Biol Chem. 2019 Feb 8;294(6):1763-1778. doi: 10.1074/jbc.RA118.005231. Epub 2018 Dec 20.

Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, et al. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells [J]. Cancer Res.
Whittaker SR, Mallinger A, Workman P, Clarke PA. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. Pharmacol Ther. 2017 May;173:83-105. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.008. Epub 2017 Feb 5.
Williams, K. E., et al. "Molecular phenotypes of DCIS predict overall and invasive recurrence." Annals of Oncology 26.5 (2015): 1019-1025.

World J Pharm Pharm Sci. 2014;3(6):2188–216.
Wu K, Zeng J, Li L, et al. Silibinin reverses epithelial-to-mesenchymal transition in metastatic prostate cancer cells by targeting transcription factors [J]. Oncol Rep. 2010;23(6):1545–52.
Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ: The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. Genes Dev 7:1126-1132, 1993
Xiong Y1, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature. 1993 Dec 16;366(6456):701-4.
Y. Zhu, Y. Mao, H. Chen, Y. Lin, Z. Hu, J. Wu, X. Xu, X. Xu, J. Qin, L. Zhu, Apigenin promotes apoptosis, inhibits invasion and induces cell cycle arrest of T24
Yang, C.S.; Lambert, J.D.; Sang, S. Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols. Arch. Toxicol. 2009, 83, 11–21.
Yates, L.R. et al. (2015) Subclonaldiversification ofprimarybreast cancer revealedbymultiregionsequencing. Nat. Med. 21, 751– _759
Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ. Signal pathways involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (aro) [J]. Anticancer Res. 1999;19(5b):4297–303.
Yodkeeree S, Ampasavate C, Sung B, Aggarwal BB, Limtrakul P. Demethoxycurcumin suppresses migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cell line. Eur J Pharmacol 2010; 627:8-15.
Yordi, E.; Perez, E.; Matos, M.; Villares, E. Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence, 1st ed.; InTech: Rijeka, Croatia or Shanghai, China, 2012; pp. 23–48.
Young JF, Nielsen SE, Haraldsdottir J, et al. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. Am J Clin Nutr 1999;69:87–94.
Zaman S, Wang R, Gandhi V. Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. Leuk Lymphoma. 2014 Sep;55(9):1980-92. doi: 10.3109/10428194.2013.855307. Epub 2014 Feb 4.

Zarrelli A, Romanucci V, De Napoli L, et al. Synthesis of new silybin derivatives and evaluation of their antioxidant properties [J]. Helv Chim Acta. 2015;98(3):399–409.
Zhao Y, Fan D, Zheng ZP, et al. 8-c-(e-phenylethenyl)quercetin from onion/beef soup induces autophagic cell death in colon cancer cells through erk activation. Mol Nutr Food Res. 2016;61(2).

Zhu W, Zhang JS, Young CY. Silymarin inhibits function of the androgen receptor by reducing nuclear localization of the receptor in the human prostate cancer cell line lncap [J]. Carcinogenesis. 2001;22(9):1399–403.

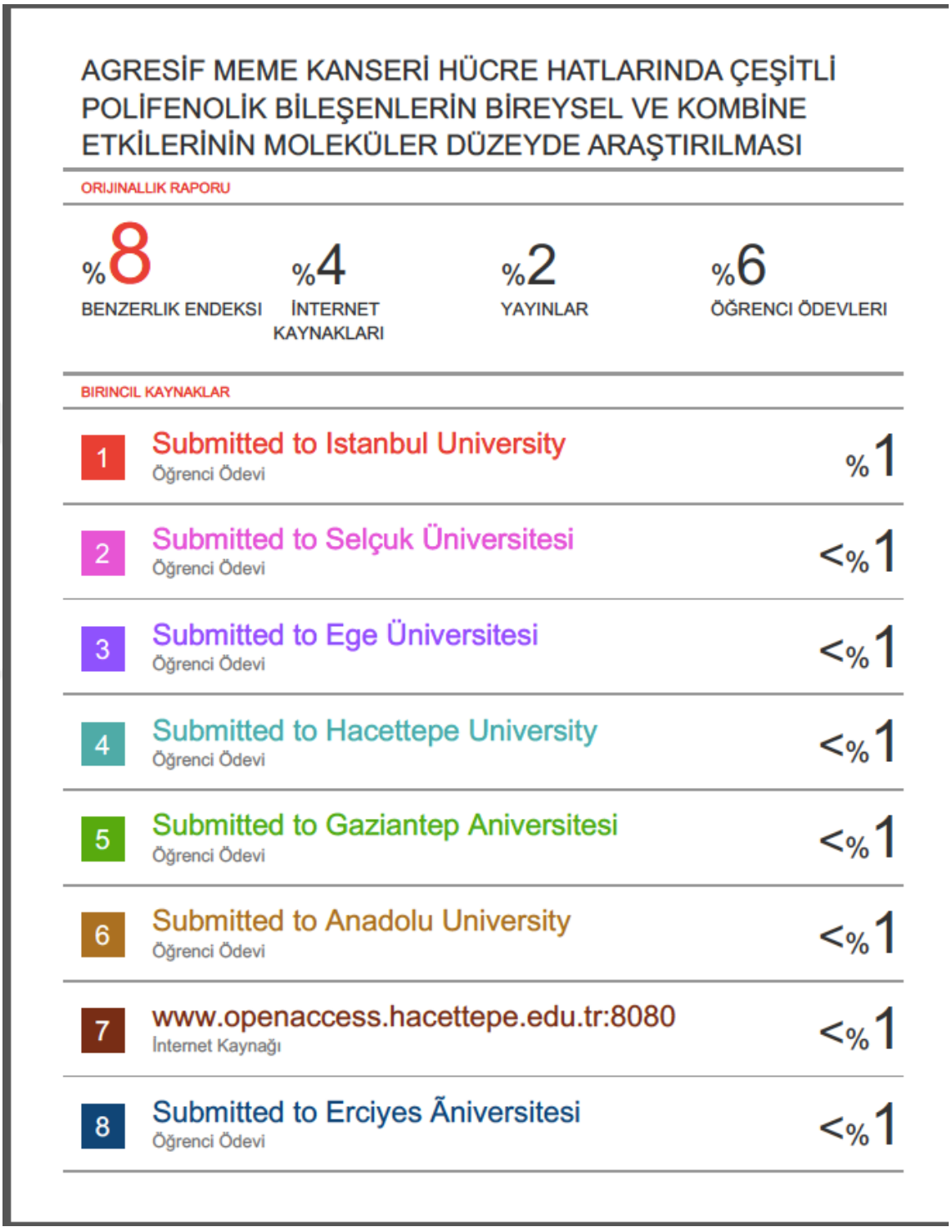
HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



AGRESİF MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA ÇEŞİTLİ POLİFENOLİK BİLEŞENLERİN BİREYSEL VE KOMBİNE ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%8	%4	%2	%6
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
3	Submitted to Ege Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
4	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<%1
5	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
6	Submitted to Anadolu University Öğrenci Ödevi	<%1
7	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Erciyes Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Allison Pınar	**Soyadı**	Eronat
Doğ.Yeri	ABD (Richland Columbia)	**Doğ.Tar.**	18.12.1988
Uyruğu	ABD/TC	**TC Kim No**	13517473618
Email	allysoneronat@gmail.com	**Tel**	05377965674

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora	İÜ DETAE Moleküler Tıp AD	
Yük.Lis.	İÜ DETAE Moleküler Tıp AD	2012
Lisans	TC. Haliç Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik	2009
Lise	MEV. Özel İzmir Avni Akyol Anadolu Lisesi	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	Çok İyi	Çok iyi	Çok iyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

- Seyhan MF, Yılmaz E, Timirci-Kahraman Ö, Saygılı N, Kısakesen Hİ, Gazioğlu S, Gören AC, Eronat AP, Begüm Ceviz A, Öztürk T, Yılmaz-Aydoğan H, Öztürk O. Different propolis samples, phenolic content, and breast cancer cell lines: Variable cytotoxicity ranging from ineffective to potent. IUBMB Life. 2019 May;71(5):619-631. doi: 10.1002/iub.1996. Epub 2018 Dec 27.

- Kocael A, Eronat AP, Tüzüner MB, Ekmekçi A, Orhan AL, İkizceli İ, Yılmaz-Aydoğan H, Öztürk O. Interpretation of the effect of CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2 variants on warfarin dosing adjustment in Turkey. Mol Biol Rep. 2019 Apr;46(2):1825-1833. doi: 10.1007/s11033-019-04634-9. Epub 2019 Feb 2.

- Teker E, Akadam-Teker AB, Ozturk O, **Eronat AP**, Yalin K, Golcuk SE, Bugra Z. Association Between the Interferon Gamma 874 T/A Polymorphism and the Severity of Valvular Damage in Patients with Rheumatic Heart Disease. Biochem Genet. 2018 Jan 13. doi: 10.1007/s10528-017-9839-0.

- Seyhan MF, Yılmaz E, Timirci-Kahraman Ö, Saygılı N, Kısakesen Hİ, **Eronat AP**, Ceviz AB, Bilgiç Gazioğlu S, Yılmaz-Aydoğan H, Öztürk O. Anatolian honey is not only sweet but can also protect from breast cancer: Elixir for women from artemis to present. IUBMB Life. 2017 Sep;69(9):677-688. doi: 10.1002/iub.1652. Epub 2017 Jul 10.

- Kanca D, Gormus U, Tokat B, **Eronat AP**, Bugra Z, Ozturk O, Yilmaz-Aydogan H. Additive Antiatherogenic Effects of CETP rs708272 on Serum LDL Subfraction Levels in Patients with CHD Under Statin Therapy. Biochem Genet. 2017 Apr;55(2):168-182. doi: 10.1007/s10528-016-9782-5. Epub 2016 Nov 30.

- Tüzüner MB, Öztürk T**, Eronat AP,** Seyhan F, Kısakesen Hİ, Calay Z, İlvan Ş, Turna H, Yılmaz-Aydoğan H, Bermek H, Öztürk O. Evaluation of Local CYP17A1 and CYP19A1 Expression Levels as Prognostic Factors in Postmenopausal Invasive Ductal Breast Cancer Cases. Biochem Genet. 2016 Jun 30.

- Ozturk T, Kucukhuseyin O, **Eronat AP**, Tuzuner MB, Daglar-Aday A, Saygili N, Kisakesen HI, Seyhan F, Velidedeoğlu M, Calay Z, Ilvan Ş, Yilmaz-Aydoğan H, Ozturk O, Isbir T. Preliminary Study: Prominent miRNAs of Breast Malignant Tissues Compared to Normal Tissues in Turkish Patients with Breast Cancer. Anticancer Res. 2015 Oct;35(10):5425-32.

- Öztürk T, Toptaş-Hekimoğlu B, **Eronat AP**, Saygili N, Dağlar-Aday A, Başsüllü N, Türkmen I, Aydoğan HY, Bülbül G, Göksel S, Öztürk O, Isbir T.

Co-existence of BRAF V600E Gene Mutation in Tumor and Non-tumoral Surrounding Tissues in Colorectal Cancer. In Vivo. 2015 Sep-Oct;29(5):577-84.

- Yilmaz-Aydogan H, Kurnaz O, Kucukhuseyin O, Akadam-Teker B, Kurt O, **Eronat AP**, Tekeli A, Bugra Z, Ozturk O.Different effects of PPARA, PPARG and ApoE SNPs on serum lipids in patients with coronary heart disease based on the presence of diabetes. Gene. 2013 Jul 1;523(1):20-6. doi: 10.1016/j.gene.2013.03.136. Epub 2013 Apr 11.

- Dağlar-Aday A, Toptaş B, Oztürk T, Seyhan F, Saygili N, **Eronat AP**, Akadam-Teker B, Yilmaz-Aydoğan H, Aksoy F, Oztürk O. Investigation of BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma and tumor-surrounding nontumoral tissues.DNA Cell Biol. 2013 Jan;32(1):13-8. doi: 10.1089/dna.2012.1776. Epub 2012 Nov 16.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):