



**T.C**

**SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HSP70 İNHİBİTÖRÜ KBR 1307 VE PES(2-  
PHENYLETHYNESULFONAMİDE)'İN TAMOKSİFEN İLE MCF – 7 HÜCRE  
HATTINDA OLUŞTURDUĞU ANTİPROLİFERATİF VE PROAPOPTOTİK  
ETKİNİN METABOLOMİK PROFİLİNİN ANALİZİ**

**Merve Nur AL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FARMASÖTİK BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**SİVAS – 2019**

**T.C.**  
**SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HSP70 İNHİBİTÖRÜ KBR 1307 VE PES(2-  
PHENYLETHYNESULFONAMİDE)'İN TAMOKSİFEN İLE MCF – 7 HÜCRE  
HATTINDA OLUŞTURDUĞU ANTİPROLİFERATİF VE PROAPOPTOTİK  
ETKİNİN METABOLOMİK PROFİLİNİN ANALİZİ**

**Merve Nur AL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**FARMASÖTİK BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Prof. Dr. Yusuf TUTAR**

**SİVAS-2019**

**“Hsp70 İnhibitörü KBR1307 ve PES(2-Phenylethynesulfonamide)’in Tamoksifen ile MCF-7 Hücre Hattında Oluşturduğu Antiproliferatif ve Proapoptotik Etkinin Metabolik Profilinin Analizi”** adlı **Yüksek Lisans** Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Farmasötik Biyokimya** Ana Bilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Yusuf TUTAR

\_\_\_\_\_

Üye Doç. Dr. Behzat ÇİMEN

\_\_\_\_\_

Üye Dr. Öğr. Üyesi Ceylan HEPOKUR

\_\_\_\_\_

Üye (Danışman) Prof. Dr. Yusuf TUTAR

\_\_\_\_\_

ONAY

Bu tez çalışması, 20/06/2019 Tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.



**ÖZET**  
**HSP70 İNHİBİTÖRÜ KBR1307 VE PES(2-PHENYLETHYNESULFONAMİDE)'İN TAMOKSİFEN İLE MCF – 7 HÜCRE HATTINDA OLUŞTURDUĞU ANTİPROLİFERATİF VE PROAPOPTOTİK ETKİNİN METABOLOMİK PROFİLİNİN ANALİZİ**

Merve Nur AL

Yüksek Lisans Tezi

Farmasötik Biyokimya Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yusuf TUTAR

2019, 104 sayfa

Bu tez çalışması, stresle indüklenen bir çeşit moleküler şaperon olan Hsp70 için spesifik olarak laboratuvarımızda geliştirilen inhibitör KBR1307'nin meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 üzerinde gösterdiği apoptotik etkilerin metabolik açıdan analizini gerçekleştirmek amacıyla yapılmıştır.

Isı şok proteinleri (Heat Shock Proteins, Hsps) evrim sürecinde tüm canlılar arasında korunmuş olan bir protein ailesi olup, hücrel stres koşullarıyla sentezi artan proteinlerdir. Yapılan araştırmalara göre kanser türleri ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda ısı şok proteinlerinin miktarı oldukça artmıştır.

Bu nedenle Hsp inhibisyonu son yıllarda kanser tedavilerine yeni bir perspektif katmıştır. Yapılan *in vitro* deneylerde Hsp70 inhibisyonu ile kanser hücrelerinde anlamlı miktarda bir azalma ve apoptoz görülmüştür. Hsp70 inhibitörü KBR1307 uygulanan kanser hücrelerini defekte uğratmakta, Hsp70 proteininin etkisini bloke etmekte ve Hsp70 ile ilişkili yardımcı proteinlerle ilişki kurarak Hsp70'in görevini yapmasını engellemektedir.

Yaptığımız çalışmada, KBR1307'ye benzer bir şekilde daha önce bir grup araştırmacı tarafından tasarlanmış olan Hsp70 inhibitörü PES(2-Phenylethynesulfonamide) ve klinikte kullanılan ilaç Tamoksifen ile karşılaştırılmalı bir çalışma metodu izlenmiştir. Daha önce literatürde Hsp70 inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda Hsp70 inhibitörünün MCF-7 hücrelerinin metabolitleri üzerinde gösterdiği etkiler ve klinik ilaçlarla sinerjisi tam olarak araştırılmamıştır.

Sonuç olarak; KBR1307 metabolik hızları oldukça yüksek olan kanser hücrelerinde son derece etkin bir inhibitör olup klinikte kullanılan ilaçla sinerjik etki yaparak mevcut tedavi potansiyelini güçlendirdiği için gelecekte biyokimyasal parametreleri oldukça güçlü bir ilaç adayı moleküldür. İlerde yapılacak komplementer deneylerle moleküler mekanizma daha da aydınlatılacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Isı Şok Proteinleri, Meme Kanseri, PES(2-Phenylethanesulfonamide), Meme Kanseri Hücre Hattı, Isı şok Proteini 70, Kanser, Tamoksifen



## ABSTRACT

### ANALYSIS OF METABOLOMIC PROFILE OF THE ANYPROLYFERATIVE AND PROAPOPTOTIC EFFICIENCY OF THE MCF - 7 CELL LINE BY İN TAMOXİFEN AND HSP70 INHIBITOR KBR1307 AND PES (2-PHENYLETHYNESULFONAMIDE)

Merve Nur AL

Master Thesis

Department of Pharmaceutical Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Yusuf TUTAR

2019, 104 pages

This study was carried out for the purpose of metabolic analysis of apoptotic effects of inhibitor KBR1307 on breast cancer cell line MCF-7, which was developed specifically in our laboratory for Hsp70, a stress-induced molecular chaperone.

Heat Shock Proteins (Hsps) is a family of proteins that are conserved among all living things during the evolution process and are proteins that are synthesized by cellular stress conditions. However, according to the studies, the amount of heat shock proteins in cancer types and various neurodegenerative diseases has increased considerably compared to normal.

Hsp inhibition has therefore given a new perspective to cancer treatments in recent years. In *in vitro* experiments, Hsp70 inhibition showed a significant reduction in cancer cells and apoptosis. Hsp70 inhibitor KBR1307 interferes with the cancer cells administered, blocks the effect of Hsp70 protein and interferes with the Hsp70-associated helper proteins and prevents the Hsp70 from performing its function.

Similar to KBR1307, a comparative study method with the Hsp70 inhibitor PES (2-Phenylethynanesulfonamide) and the drug Tamoxifen was used. In the literature, the effects of Hsp70 inhibitor on metabolites of MCF-7 cells as well as its synergetic affect over clinical drugs have not been fully investigated in studies with Hsp70 inhibitors.

As a result; KBR1307 is a highly effective inhibitor of cancer cells with a high metabolic rate and is a highly potent drug candidate molecule in the future because of its

synergistic effect with the drug used in the clinic. Complementary experiments will reveal the details of the molecular mechanism.

**Key Words:** Heat Shock Proteins, Breast Cancer, PES (2-Phenylethynesulfonamide), Breast Cancer Cell Line, Heat Shock Protein 70, Cancer, Metabolomic, Tamoxifen





## TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőmamda yardımlarını ve her türlü desteğini esirgemeyen, hayatımın kısa bir zaman diliminde tanıdığım ancak bana yılların deneyimi ve tecrubesini katan, her konuda fikir ve düşünceleriyle bana perspektif ve ivme kazandıran çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Yusuf TUTAR'a teőekkürlerimi sunarım.

Çalıőmalarımda ve hayatımdaki birçok konuda engin bilgilerini ve tavsiyelerini benimle her zaman paylaőtığı için Kübra Açıkalin Coőkun'a çok teşekkür ederim.

Her zaman ve her ne olursa olsun en büyük manevi desteğim olan biricik Annem'e, sonsuz özverileri ile beni bugünlere getiren çok sevgili Babam'a ve üzerimde büyük emekleri olan canım Ailem'e minnetimi sunuyorum.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xv
KISALTMALAR/SİMGELER.....	xvii
1.GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	5
2.1.Kanserin keşfi ve önemi .....	5
2.2. Kanserleşme sürecinde etkili olan faktörler.....	7
2.2.1. Hücre Döngüsü ve Kanser Genetiği .....	7
2.2.2. Kanser Oluşumunda Etkili Olan Çevresel Faktörler .....	10
2.3.1. Benign Tümörler:.....	13
2.3.2. Malign Tümörler:.....	13
2.4. Malign Tümör Oluşumu .....	14
2.4.1. Hedef hücrede malign değişim .....	14
2.4.1.1.Diferansiasyon (Ayrımsallaşma): .....	14
2.4.1.2. Anaplazi: .....	14
2.4.2. Değişen hücrenin gelişmesi: .....	14
2.4.2.1. Tümör hücrelerinin kinetiği.....	14
2.4.2.2. Tümör anjiogenezi (Neovaskülarizasyon) .....	15
2.4.3. Lokal invazyon: .....	15
2.4.4. Uzak metastaz: .....	16
2.5. Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	17
2.6.Kanserin Genel Belirtileri .....	20
2.7.Kanserde Teşhis Yöntemleri.....	21

2.8. Kanserde Tedavi Metotları .....	22
2.8.1. Radyoterapi .....	22
2.8.2. Kemoterapi.....	23
2.8.3. Biyolojik Yöntem .....	24
2.8.3.1. Kök Hücre Tedavisi .....	24
2.8.3.2. İmmünoterapi.....	25
2.8.4. Hormon Tedavileri.....	25
2.8.5. Cerrahi Uygulamalar.....	27
2.8.6. Kanser Aşıları .....	27
2.8.7. Büyüme İnhibitörleri.....	27
2.8.8. Gen Terapisi.....	27
2.9. Dünya’da ve Türkiye’de Kanser İstatistikleri:.....	28
2.10.1. Kanser Hücrelerinde Karbohidrat Metabolizmasındaki Değişiklikler .....	32
2.10.2. Kanser Hücrelerinde Protein-Lipit Metabolizmasındaki Değişiklikler .....	35
2.10.3. Kanser Hücrelerinde Pentoz Fosfat Yolağındaki Değişiklikler.....	36
2.10.4. Kanser Hücrelerindeki Membran Modifikasyonları.....	37
3. MEME KANSERİ .....	38
3.1. Meme Yapısı.....	38
3.2. Meme Kanseri ve Fizyolojik Alt Tipleri.....	39
3.3. Meme Kanseri ve Moleküler Alt Tipleri .....	40
3.4. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi .....	41
3.5. Meme Kanserinin Etiyolojisi .....	42
3.5.1. Meme Kanserinde Değiştirilemeyen Risk Etkenleri .....	42
3.5.2. Meme Kanserinde Çevresel Risk Faktörleri .....	44
3.5.3. Meme Kanserinde Hormonların Etkisi .....	44
3.6. Meme Kanserinin Klinik Belirtileri .....	45
3.7. Meme Kanserinde Evrelendirme .....	45

3.8. Meme Kanserinde Teşhis Yöntemleri .....	46
3.9.Meme Kanserinde Tedavi Metotları .....	47
3.9.1.Cerrahi Tedavi .....	47
3.9.2.Radyoterapi Tedavisi .....	48
3.9.3.Kemoterapi Tedavisi.....	48
3.10. Kanser Hücrelerinde Farklılaşmış RNA Metabolizması .....	49
3.11. Modifiye Nükleozidler.....	51
4.ISI ŞOK PROTEİNLERİ.....	55
4.1. Protein Katlanması.....	55
4.2.Isı Şoku Proteinleri (Heat Shock Protein; Hsp) .....	56
4.2.1.Küçük Isı Şok Proteinleri (s-Hsps) .....	58
4.2.2.Hsp40 (DNA J) .....	59
4.2.3.Hsp60 (Şaperoninler).....	59
4.2.4.Hsp70 (DnaK).....	59
4.2.4.1. Hsp70'in Yapısı .....	61
4.2.4.2. Hsp70'in Onkogeneizde Etkisi .....	64
4.2.4.3. Hsp70 Şaperon Kompleksi (CHİP-BAG-HİP-HOP).....	65
4.2.4.4. Kanserde Hsp70 Hedeflenmesi ve Hsp70 İnhibitörü PES.....	66
4.2.5 Hsp90 (HtpG) .....	67
4.2.6. Büyük Hsp'ler.....	68
4.2.7. Kanser Tedavilerinde Kombine İnhibitör Kullanmanın Avantajları .....	69
5. MATERYAL-METOD.....	70
5.1 Analizlerin Yapıldığı Tarih ve Konum .....	70
5.2 Kullanılan Malzemeler .....	70
5.3 Kullanılan Cihazlar .....	70
5.4 İncelenecek Hücre Hattının Özellikleri .....	71
MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattının Taşıdığı Özellikler: .....	71

5.5 Hsp70 İnhibitörü KBR1307'nin <i>İn-silico</i> Modellemesi .....	71
5.6 Sitotoksosite Testinde Kullanılan XTT Bileşiği Hakkında .....	72
5.7 Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar .....	73
5.8 Çalışmada Uygulanan Hücre Kültürü Protokolleri.....	74
5.8.1 Hücre Çözdürme .....	74
5.8.2 Hücrelerin Yıkınması .....	74
5.8.3 Hücrelerin Platelere Ekimi.....	75
5.8.4 Platelerdeki Hücrelere İlaç Eklenmesi.....	75
5.9 Hücre Proliferasyon Testi (XTT Testi) Uygulanması .....	76
5.10 Hücre Süpernatantlarının Eldesi: .....	77
5.11 HPLC Sisteminde Referans Olarak Kullanılan Standart Kimyasallar ve Metabolik Farklılıklar: .....	78
5.12 Hücre Kültürü Süpernatantından Nükleozitlerin Ekstraksiyonu ve Yapısal Olarak İlişkili Bileşikler: .....	78
6. BULGULAR.....	79
6.1. Dizayn edilen inhibitörün sentez edilmesi.....	79
6.1.1. (E)-3-(dimetilamino)-1-fenilprop-2-en-1-on (B) bileşiğinin sentezi .....	80
6.1.2. (E)-4-(2-(1,3-diokso-1-fenilpropan-2-yliden)hidrazinil)benzait (C) bileşiğinin sentezi .....	81
6.1.3. Etil 3-(3-benzoil-1-(4-karbamoilfenil)-1H-pirazol-5-il)-3-oksopropanoat (D) bileşiğinin sentezi .....	81
6.1.4. (E)-3-(3-benzoil-5-(8-metoksi-2-okso-2H-kromen-3-karbonil)-1H-pirazol-1-il) benzamit (E) bileşiğinin sentezi.....	82
6.2. KBR1307 ile PES'in Tek başına ve Klinik İlaç ile kombinasyonu Sonucu MCF-7 Metabolik Aktivitesi .....	83
6.3. ELİZA yöntemi ile MCF-7 Hücre Hattında Hsp70 Aktivitesinin Belirlenmesi.....	84
6.4. İnhibitörlerin Hsp70 ATP hidrolizi üzerindeki etkileri .....	85
7. TARTIŞMA-SONUÇ .....	86

8. KAYNAKLAR .....	88
9.ÖZ GEÇMİŞ .....	104



## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2. Onkogenez Sürecinde Fonksiyon Gösteren Genler ( 32-33)'den Uyarlanmıştır. .....	10
Tablo 4. GLOBOCAN 2012 Verilerine Göre Kanser İstatistiklerinde Türkiye'nin Durumu (71)'den Uyarlanmıştır. ....	31
Tablo 5. Meme Karsinomunda Gen Ekspresyon Bazlı Kategorileşme (96).....	41
Tablo 6. Modifiye Nükleosid Örnekleri (104-108) .....	54
Tablo 7. KBR1307, PES, Tamoksifen ve KBR1307+tamoksifen Kombinasyonunun MCF-7 Sağ Kalımına Etkisi .....	83
Tablo 8. ELİZA yöntemi ile MCF-7 Hücre Hattında Hsp70 Aktivitesinin Belirlenmesi .....	84
Tablo 9. İnhibitörlerin Hsp70 ATP hidrolizi üzerindeki etkileri .....	85

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kanserin Gelişimi (20)'den Uyarlanmıştır. ....	6
Şekil 2. Hücre Siklusu ve Kontrol Noktaları (25)'den Uyarlanmıştır. ....	8
Şekil 3. Tümör İnvazyonu ve Anjiogenezi (38)'den Uyarlanmıştır. ....	15
Şekil 4. Kanser Hücrelerinin Taşıdığı Genel Özellikler (75) .....	18
Şekil 5. Bazı Kemoterapötik İnhibitörler (75) .....	24
Şekil 6. T.C. Birleşik Veri Tabanı Kayıtlarına Göre (2015) Kadınlarda En Sık Görülen Kanser Türleri (Dünya Standart Nüfusunda- 100.000 Kişide) (71) .....	29
Şekil 7. T.C. Birleşik Veri Tabanı Kayıtlarına Göre (2015) Erkeklerde En Sık Görülen Kanser Türleri (Dünya Standart Nüfusu 100.000 Kişide) (71) .....	29
Şekil 8. HIF-1alfa'nın Tümörleşmedeki Etkisi (88).....	34
Şekil 9. Kanser Metabolizmasında HIF-1 alfa'nın Fonksiyonları (81-88)'den Uyarlanmıştır .....	35
Şekil 10. Warburg Etkisi-Normal ve Kanserli Hücrelerde Laktat Yolağı (89) .....	37
Şekil 11. HER2 + Meme Kanseri Hücre Zarında Artan HER Reseptörü (90) .....	37
Şekil 12. Memenin Genel Anatomisi (93) .....	39
Şekil 13. Meme Kanseri Moleküler Alt Tipleri ve Prognoz Şiddetleri (97) .....	41
Şekil 14. Hücre RNA Metabolizması-Modifiye Nükleozitlerin Oluşumu (103) .....	50
Şekil 15. Bazı Modifiye Nükleozid Çeşitleri (103) .....	52
Şekil 16 RNA Metabolizmasıyla İlişkili Yolaklar (104) .....	53
Şekil 17. Proteinlerin Yapıları (110).....	56



Şekil 18. Isı Şok Proteinlerinin Hücrede Lokalizasyonları ve Fonksiyonları (115).....	58
Şekil 19. Hsp70'in Yeni Sentezlenmiş Proteinleri Katlama Prosesi (122).....	60
Şekil 20. E.coli Hsp70'inin NBD-SBD-CTD Sulu Çözeltideki Gösterimi (120) .....	63
Şekil 21. Hsp70 ve Ko-şaperonu Hsp40 ile etkileşimi (120) .....	64
Şekil 22. Hsp70 Aracılı Protein Katlanması-Protein Degredasyonu (124)'den Uyarlanmıştır .....	65
Şekil 23. PES'in (2-phenylethanesulfonamide) Genel Yapısı.....	67
Şekil 24. Hsp70 ve PES Hedefleme Stratejisi (125)'den Uyarlanmıştır .....	67
Şekil 25. KBR1307inhibitörünün sentez şeması .....	80
Şekil 26. (E)-3-(dimetilamino)-1-fenilprop-2-en-1-on (B) bileşiğinin sentezi.....	80
Şekil 27 (E)-4-(2-(1,3-dioksa-1-fenilpropan-2-yliden)hidrazinil)benzait (C) bileşiğinin sentezi .....	81
Şekil 28. Etil 3-(3-benzoil-1-(4-karbamoilfenil)-1H-pirazol-5-il)-3-oksopropanoat (D) bileşiğinin sentezi .....	82

## KISALTMALAR/SİMGELER

<b>ATP</b>	Adenozin Trifosfat
<b>c-AMP</b>	Siklik Adenozin Monofosfat
<b>CDKs</b>	Siklin Bağımlı Kinazlar
<b>CTD</b>	C-terminal Domain
<b>DCIS</b>	İn-situ Duktal Karsinom
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>DSÖ</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>EGF</b>	Epidermal Büyüme Faktörü
<b>FGF</b>	Fibroblast Büyüme Faktörü
<b>GLUT</b>	Glukoz Taşıyıcı
<b>HER</b>	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>HIF</b>	Hipoksiyle İndüklenen Faktör
<b>HSP</b>	Isı Şok Proteini
<b>IARC</b>	Uluslararası Kanser Kayıt Derneği
<b>İMK</b>	İnflamatuar Meme Karsinomu
<b>LCIS</b>	İn-situ Lobüler Karsinom
<b>NAD</b>	Nikotinamidadenin dinükleotit
<b>NBD</b>	Nükleotit Bağlanma Domaini
<b>NEF</b>	Nükleotit Değişim Faktörü
<b>PES</b>	2-Phenylethynesulfonamide
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>SBD</b>	Substrat Bağlanma Domaini
<b>TSG</b>	Tümör Supresör Gen
<b>VEGF</b>	Damar Endotel Büyüme Faktörü
<b>ml</b>	mililitre
<b>mg</b>	miligram
<b>rpm</b>	dakikadaki dönme miktarı
<b>ul</b>	mikrogram
<b>°C</b>	santigrad

## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

Toplumdaki her bireyin gereksinimlerini karşılayabilmesi, hayattan tat alması, kişisel amaçları doğrultusunda ilerleyebilmesi ve benlik algısına sahip olması yaşam kalitesi olarak tanımlanmaktadır. Yaşam kalitesinin en kilit noktası da sağlıklı olmaktır. (1)

1948’de yayınlanan DSÖ tüzüğünde sağlığın tanımı şöyle yapılmıştır: ‘Yalnızca hastalık veya sakatlığın olmaması durumu değil, fiziksel, sosyal ve ruhsal refah durumu’ olarak tanımlanmıştır.(2)

Hastalıklar insanların fiziksel, sosyo-ekonomik, ruhsal davranışlarını etkileyerek yaşam kalitesini düşürürler. Bireylerin yaşam kalitelerinin düşmesine sebep olan birçok hastalık vardır. Bu hastalıkların başında dünyada ve ülkemizde yaygınlığı giderek artan kanser türleri büyük rol oynamaktadır. Toplum ve bireyi fazlasıyla etkileyen kanser ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir.(2-3)

Kanser en basit ifadeyle hücrelerin normal yaşam döngüsü dışında büyümeleri ve anormal olarak çoğalmaları olarak ifade edilmektedir. Kanser üzerinde son yıllarda çalışmaların artması kanserin teşhis ve tedavi olanaklarını da artırmıştır. Hem dünyada hem de ülkemizde kalp-damar hastalıklarından sonra en çok görülen hastalık kanserdir. Bu kadar sık görülmesi ve mortalitesinin fazla olmasından dolayı kanser artık bir sağlık problemi olmakla kalmayıp sosyo-ekonomik açıdan bir toplum sorunu haline gelmiştir.(4)

Dünya genelinde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kadınlar arasında en çok görülen kanser tipi meme kanseridir.(5) Meme kanseri, memeyi meydana getiren hücrelerin anormal çoğalması ve bu hücrelerin vücudun yakın veya uzak bölgelerine göç ederek çoğalmasıyla oluşur. Kanser hücreleri memede süt bezlerinde ve meme başını birleştiren kanallarda oluşmaya başlar ve zamanla memenin diğer bölgelerine yayılır.(6)

Meme kanserinin oluşumunda birçok çevresel ve genetik etken mevcut olup bu faktörlerden biri de hücresel proseslerde kullanılan proteinlerin doğru katlanamamasıdır. Proteinler hücrelerin temel yapı taşı olup ribozomda kompleks bir süreçle üretilir.

Üretilen proteinlerin doğru bir şekilde çalışabilmesi için proteinlerin uygun zamanda ve olması gerektiği gibi üç boyutlu yapılarına katlanmaları gerekir. Üç boyutlu konformasyonlarına katlanabilmeleri için gereken genetik bilgi proteinin primer yapısında şifrelenmiştir. Sitoplazmadaki moleküler prosesteki kalabalık ve stres faktörleri katlanma sürecini zorlaştırır. Bu nedenle protein katlanmasının kontrolü ve denetimi hücrenin canlılığı için önemlidir. Doğru şekilde katlanmamış proteinler belli bir düzeyden sonra birikmeye devam ederse Parkinson, Alzheimer ve kanser gibi hastalıklara neden olmaktadır.(7)

Tam bu noktada yaşamsal öneme sahip olan ‘Isı şok proteinleri’ devreye girerek protein katlanma sürecini kontrol eder ve düzenlerler. Isı şoku proteinleri yüksek sıcaklık, oksidanlar, enfeksiyon, oksidatif stres gibi birçok stres faktörlerine bağlı olarak oluştuğu için stres proteinleri olarak ta adlandırılır. Isı şok proteinleri protein agregasyonunu önlediği gibi yanlış katlanmış proteinleri de üç boyutlu hale getirir yada parçalanmasına yardım eder. Moleküler şaperon olarak da bilinen ısı şok proteinleri bütün hücrelerde bulunur ve stres koşullarında miktarı artar.(8) Isı şok proteinleri evrimsel açıdan korunmuş olup bütün canlı hücrelerde bulunur ve stres koşulları oluşmadığında hücrede miktarları sabittir. Bu proteinler çevresel stres faktörleriyle karşılaştığında sentezlenme hızı indüklenir. Isı şok proteinleri normal hücresel proseslerde birçok kilit etkiye sahiptir. Hücre bölünme basamakları, hücre farklılaşması ve hücre ölümünde ısı şok proteinlerinin çok önemli görevleri vardır. Isı şok proteinleri hücrenin yaşam döngüsünü etkileyen diğer proteinlerle iletişime girerek onların yapı ve fonksiyonlarını etkileyebilir.(9)

Hücre metabolizmasının kontrolünde kilit role sahip ısı şok proteinleri farklı proteinlerden oluşur. Bu proteinler molekül ağırlıklarına göre sınıflandırılır. Isı şok protein ailesi 7 kDa ile 110 kDa arasında ağırlığa sahip olup isimlendirilmesi molekül ağırlığına göre yapılmaktadır. Isı şok proteinleri hücrede intraselüler, sitoplazma membranı ve ekstraselüler lokasyonlu olabilirler. İntaselüler yerleşimli olanlar genel olarak her hücrede nükleus, mitokondri ve sitozolde bulunur. (10)

Isı şok proteinlerinde molekül ağırlığı 70 kDa olan Hsp70 ( Heat Shock Protein 70) diğer Hsp üyeleri gibi hücre metabolizmasında önemli rol oynar. Hsp70 diğer tüm Hsp’ler arasında üzerinde en çok çalışma yapılmış olan proteindir. Hsp70 yeni üretilen proteinlerin katlanması, yanlış katlanmış yada çökmüş proteinlerin tekrar

düzenlenmesi, golgi aygıtından gelen salgısal proteinlerin hücre zarına translokasyonu ve hücre metabolizmasında görevli diğer düzenleyici proteinlerin denetimini yapar.(11) Yapılan araştırmalarda Hsp70'in normalden fazla miktarda sentezlenmesi hücrelerde kanser oluşumuna katkı yaptığı tespit edilmiştir. Meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücrelerinde sentezi artan Hsp70 proteini hücre döngüsündeki G0-G1 fazını etkileyerek hücre büyüme ve bölünme süresini kısaltır. Bu durum, kanserleşmiş hücrelerin daha kısa bir süre içinde büyüyüp bölünerek tümör hacminin artmasına sebep olur(12)

Son zamanlardaki kanser tedavi yaklaşımlarından biride tümöral dokularda artan Hsp'leri hedefe almaktır. Kanserli dokuda artan Hsp miktarı, Hsp'lerin biyolojik destek sunması ve tümör antijeninde şaperon olmasından dolayı kanserde immün tedaviye olanak sağlar. (13)

Başlarda Hsp'ler üzerine yapılan araştırmalar yoğunlaşmadan önce Hsp'lerin kanser tedavisi için hedef olabileceği düşünülmüyordu. Ancak son zamanlardaki araştırmaların sonucu ilgi çekici boyuttaydı. Bildirilen çalışma sonuçlarına göre Hsp90'ın ATPaz domaininin antikanser tedavisinde kullanılabilecek etkili bir hedef olduğu ortaya çıkmıştır. Buna benzer daha fazla umut verici sonuçla karşılaşmak için Hsp'ler üzerine yapılan çalışmalar yoğunlaşmıştır. Kanserde tedavi yaklaşımlarından biride Hsp'lerin etkisiz hale getirilmesidir. Günümüzde birçok farklı Hsp türleri için farklı inhibitörler dizayn edilmektedir. Böylece Hsp inhibitörleri tümör spesifik proteinleri hedeflemesi ve kanser hücrelerinin büyümesini engellemesinden dolayı kanser tedavisinde önemli bir yer tutmuştur.(14)

Kanser hücreleri sağlıklı hücrelerden farklı bir metabolik aktivite ve ihtiyaca sahiptir. Kanserli hücreler, büyüme, proliferasyon ve metastaz ihtiyaçlarını karşılayabilmeleri için hücresel metabolik yollarını tekrar düzenlemeye gerek duyarlar. Bu duruma en iyi örneklerden biri kanser hücrelerinde değişikliğe uğramış olan karbohidrat metabolizmasıdır. Sağlıklı hücreler oksijenli ortamda glikozu pirüvata dönüştürür ve pirüvatu oksidatif fosforilasyonla mitokondride CO<sub>2</sub>'e

çevirir. Sağlıklı hücreler oksijensiz ortamda pirüvatı laktata indirger. Warburg'a göre kanser hücreleri glikozu oksijenli ortamda direk laktata dönüştürerek hem daha hızlı enerji elde eder hemde onları oluşabilecek hipoksik şartlara karşı koruyarak hayatta kalma avantajı sağlar. Tümör hücrelerinin genellikle enerji bağımlılığı primer olarak glutamin ve glikoza bağlıdır.(15-16)

Kanser, şiddetli metabolik bozuklukların eşlik ettiği gibi ayrıca hücre devir hızı, enzim kinetiği ve DNA/RNA düzenlemeleri üzerinde de karakteristik etkiler oluşturur. Bu durum da yüksek miktarda ortama salınmış modifiye nükleozitlerin ortaya çıkmasına sebep olur. Organizmada metabolik yolların geneli birbiriyle ilişkilidir. Bu nedenle kötü huylu tümörlerden kaynaklanan hastalıklar, bir alt kümede diğer sorunları da oluşturabilir. Tanım olarak nükleozitler, beta-glikozidik bağ ile bir nükleobaza bağlanan riboz parçasından meydana gelir. RNA, ortak nükleositler olan adenozin, guanozin, üridin ve sitidin ek olarak bir dizi modifiye nükleosit içerir. Günümüzde yaklaşık 100 çeşit modifiye nükleosit vardır. Yapılan bir araştırmada modifiye nükleositlerden olan 1-metilinosin meme kanseri hastalarından alınan idrar örnekleri analiz edildiğinde yüksek seviyede gözlemlenmiştir. (17)

Ayrıca birçok farklı tipte kanser hastasının idrarında ve hücrelerarası sıvısında büyük oranda kanser spesifik nükleozitlerin varlığı tespit edilmiştir. Modifiye nükleozitlerin metabolomik profilinin aydınlatılması, kansere özgü yeni biyobelirteçlerin tespit edilmesi meme kanseri tedavisinde önemli bir rol oynayabilir. Hücre içeriğinin metabolomik yönden incelenmesi, birçok metabolitin eş zamanlı değerlendirilmesi, konsantrasyon ve etkilerinin araştırılması ayrıca farklı hücresel yolların birbiriyle etkileşimini gözlemlemek açısından önem taşır.(18)

Fizyolojik koşullar altında proteinlerin olgunlaşmasında önemli görevleri olan Hsp'ler kanserli hücrelerde tümörleşmeyi artırmaktadır. Hsp'lerin bu rolü onları önemli bir hedef haline getirmiştir. Farklı Hsp türleri için spesifik antikanser inhibitörlerin geliştirilmesi kanser tedavileri için umut verici olabilir. Hsp70 inhibisyonu, immün

sistemi aktifleştirerek in vivo tümör çoğalmasını önleyebilir. Yeni alışmalar, pifitrin-μ adı verilen küçük moleküllü 2-phenylethynesulfonamide (PES)'in stresle uyarılan Hsp70'in spesifik inhibitörü olduğunu saptamışlardır. PES tümör hücrelerinde, lizozomal fonksiyonu bozarak kaspaz-bağımsız hücre ölümünü uyardığı araştırmalar sonucunda görülmüştür.(19)

Bu nedenle Hsp hedefleme stratejisini kullanarak sitotoksik bir bileşen olan laboratuvarımızda sentezi yapılmış ve patent çalışmaları devam eden Hsp70 inhibitörü KBR1307'nin literatürde Hsp70 inhibitörü olan PES (2-phenylethynesulfonamide) ile birlikte MCF-7(meme kanseri) hücre hattında gösterdiği etkilerin metabolomik profilinin analizi yapıldı. Araştırmamızda MCF10-A (sağlıklı meme epiteli hcesi) pozitif kontrol olarak kullanıldı. Hsp70 inhibitörlerinin hücre hatlarında gösterdiği etkiler, metabolitlerin yorumlanması, modifiye nükleozitlerin değişkenlik gösteren düzeyleri incelendi. Bu sayede kanser tedavi yöntemleri arasına yeni bir perspektif katmayı amaçladık. Kanser araştırmalarına katkısı olacağını düşündüğümüz bu çalışmadan elde edilen sonuçlar hücre metabolizmasındaki patolojik değişikliklerin arka planı ile tartışılarak Hsp70 inhibitörünün modifiye edilmiş nükleositler üzerindeki metabolik profili ile yorumlandı.

## **2.GENEL BİLGİLER**

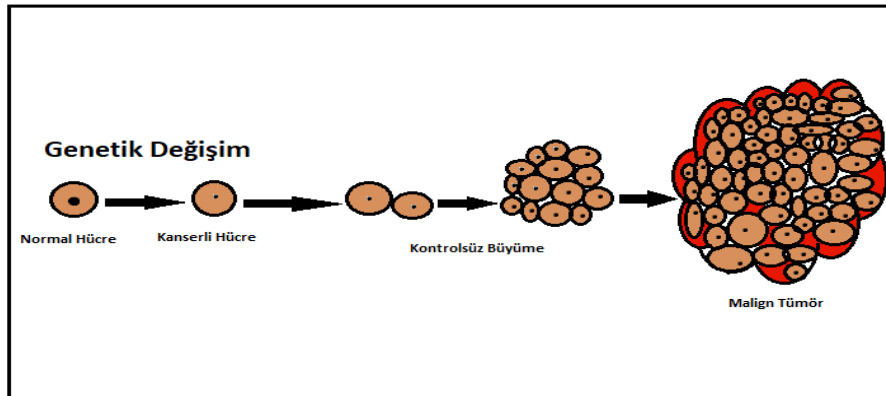
### **2.1.Kanserin keşi ve nemi**

Kanser terimi ilk defa Hipokrat tarafından (M.. 460-377), organizmanın iyileşemeyen oluşumları olarak nitelendirilmiştir. Hipokrat bu oluşumları kızarık, şişkin dokulu, ağrılı ve vücuttaki diğer yapılardan farklı karakterde olduğunu düşünerek

'carcinoma' ya da 'carcinoma' demiştir. Başka bir tanımlamayla Galen (M.S. 2.yy.), kanserli dokunun görünümünü yengece benzettiği için 'cancer' adını vermiştir. (22) Nitekim, yengeçler düşmanını uzun dişli kollarıyla tutarak onları yavaşça tüketirler. Bu benzerlik ile kanserin kelime anlamının yengeç olması hiç şaşırtıcı değildir. (23)

İnsan vücudunda hücreler bölünerek ve özelleşerek dokuları, organları, sistemleri oluşturur. Her hücrenin farklı bir bölünme kapasitesi vardır. Normal hücreler belirli bir hızda kontrol altında bölünerek organize olur. Bölünen hücreler bir noktaya geldiklerinde artık bu döngü durur ve canlılıklarının sonuna gelerek ölür. Ancak kanser hücrelerinde durum bundan farklıdır.

Kanser, hücrelerin çok miktarda ve hızlı çoğalmalarına, sınırsız süre yaşayabilmelerine, düzensiz olarak bölünüp çevrelerindeki hücelere zarar vererek başka doku ve organlara yayılmalarına sebep olan ve birçok metabolik ve davranışsal değişikliği oluşturan karmaşık bir hastalıktır. (20) Bu sebeple kanser kaynaklı mortalitelerin çoğunluğu tümoral dokunun kendisinden değil, sekonder olarak seyreden metabolik değişimlerden kaynaklanır. (23)



**Şekil 1.** Kanserinin Gelişimi (20)'den Uyarlanmıştır.

Kanser tablosunda hücreler anormal şekilde çoğalarak çevresinde yada uzağında bulunan doku ve organları kan ve lenf dolaşımı ile işgal ederek büyümeye devam ederler.



Bu durum kanserde 'metastaz' olarak adlandırılır. Bu şekilde hücresel kontrolün bozulup kanserin semptomları çıkmaya başlayıncaya kadar geçen süre yaklaşık olarak 15-20 senedir. Kanser oluşumunda etkili olan kalıtsal ve çevresel birçok faktör vardır. Kanser oluşum mekanizmaları gün geçtikçe daha iyi anlaşıldığı için teşhis ve tedavi yöntemleri de artmıştır. Kanser türleri oluştukları doku ve organlara göre adlandırılır. En sık görülen kanser tipleri meme, akciğer ve sindirim sistemi kanserleridir. Erken teşhis ve kanser tipine uygun tedavi yöntemleri kanserden kaynaklanan ölümleri azaltmaktadır. Geliştirilen yeni ilaçlar ve kanserle ilgili araştırmaların artması da kanserle mücadelede yaşam ömrünü uzatmaktadır. (24) Kanser, bütün dünya çapında gün geçtikçe artan önemli bir sağlık sorunu olup toplum üzerinde sosyoekonomik, psikolojik ve fiziksel bir yük oluşturmaktadır. (21)

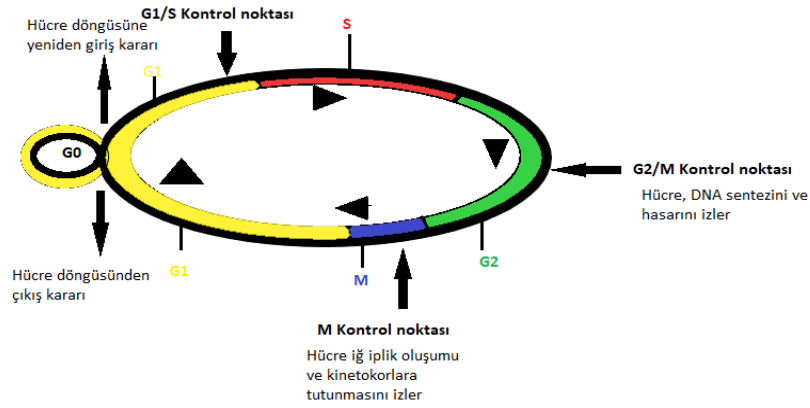
## **2.2. Kanserleşme sürecinde etkili olan faktörler**

### **2.2.1. Hücre Döngüsü ve Kanser Genetiği**

Kanserde en çok araştırılan ve tartışılan konulardan biri de kanserin hangi sebeplerden kaynaklandığıdır. Kanser oluşumuna sebep olan birçok faktör olmakla birlikte henüz tam olarak nedeni bilinmemektedir. Ancak çoğu kanserin oluşumunun altında çevresel ve genetik bazı faktörler yatmaktadır. (24) Normal bir hücrenin tümöral bir hücreye dönüşümünde birçok biyokimyasal ve metabolik mekanizma rol oynar. Bu değişikliklerin daha iyi anlaşılabilmesi için öncelikle sağlıklı bir hücrenin yaşam siklusunu bilmek gerekir. Sağlıklı bir hücrenin normal yaşam döngüsü dinlenme ve bölünme aşamasından oluşur. (25) Hücre döngüsünün süresi organizmalar ve hücrelerde değişiklik gösterebilir. Bu döngünün süresi dakikalarca ya da aylarca sürebilir. Hücre siklusu genel olarak dört aşamada gerçekleşmektedir. Bu aşamaların doğru ve zamanında başlayıp devam edebilmesi için görevli bazı önemli proteinler vardır.

1. S Fazı (Sentez): DNA replikasyonu, kromozom eşlenmesi, RNA ve protein sentezi
2. G2 Fazı (Gap): DNA eşlenmez, hücresel faaliyetler devam eder, bölünmeye yönelik hazırlıklar yapılır.

3. M Fazı (Mitoz): Çekirdek ve sitoplazma bölünmesi oluşur.
4. G1 Fazı: Bölünen hücrelerin tekrar hücre bölünmesine girmeden S fazına hazırlandığı aşamadır. Hücresel faaliyetler protein sentezi devam eder.



**Şekil 2.** Hücre Siklusu ve Kontrol Noktaları (25)'den Uyarlanmıştır.

Hücreler mitoz bölünmeden sonra G1 fazına geçerek bölünmeye devam eder yada bölünmeleri sonlanır. G1 ve S fazı arasındaki G0 fazı ise hücrelerin dinlenme evresidir. (26) Hücre döngüsünün doğru bir şekilde sürmesini sağlayan ve bu döngüyü kontrol eden proteinlerin sentezi protoonkogenler veya tümör baskılayıcı genler tarafından düzenlenir. (25) Bu döngünün her aşaması siklin olarak adlandırılan bir grup protein ailesi tarafından kontrol edilir. Bu mekanizmanın merkezi, hücrenin metabolizmasını ve hücre döngüsü aşamalarını kontrol eden siklin – bağımlı kinazlardan (CDKs) meydana gelir. (26)

Bazı nedenlerle hücrede normal hücre büyümesi ve farklılaşması arasındaki denge bozulur. Hücre döngüsünde görevli proteinleri kodlayan protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genler çeşitli nedenlerle işleyişleri bozulduğunda, hücrelerde DNA dizilerindeki değişikliklere ve kanser oluşumunu önleyen proteinlerin sentezinin engellenmesine neden olmaktadır. DNA dizilerinde oluşan bu değişiklikler protoonkogenlerin onkogenlere dönüşerek kanser oluşumunun tetiklenmesine sebep olur. Sağlıklı hücrelerde tümörleşmeyi engelleyen proteinleri kodlayan tümör baskılayıcı genler de bu sayede inaktive olur.(27)

Onkogenler sağlıklı bir hücrenin kanserleşmesine sebep olabilecek protein ürününe sahip olan genlerdir. Onkogenler ayrıca hücrelerin çoğalmasını sitümüle ederler. Onkogenlerin mutasyonlarla aktive olması, onkogenleri dengeleyen tümör baskılayıcı genlerin mutasyonu ile hücre çoğalmasının kontrolsüzleşmesi sonucu kanser tablosu oluşur. Diğer taraftan tümör baskılayıcı genler, normal fizyolojik koşullarda onkogenleri düzenleyerek hücrelerin zorla çoğalmasının önüne geçer.

Tümör baskılayıcı genler arasında en çok çalışma yapılanlar p53, p16, p21 genleridir. (28) Bu gruptan olan p53 geni, 17.kromozomun p koluna yerleşmiştir. (17p13.1). Ağırlığı 53 kd olan 393 aminoasitlik bir çekirdek fosfoproteininin kodlanmasından sorumludur. 11 ekzon ve 10 intron bölgesine sahip olup, DNA'ya 5 ve 8.ekzon karşılığındaki protein bölgesiyle bağlanır. Bu genden kodlanan protein 393 aminoasit içerir ve p53 proteini olarak adlandırılır. Normalde hücrede inaktif halde bulunan p53, mutasyon, DNA hasarı gibi etkilerle aktif hale gelir. (29) İşlevini yapabileceği forma giren p53 molekülü hasarlı bölgede hücre döngüsünü G1 fazında durdurur. Bu durumda üç seçenek vardır. DNA'da hasarlı bölgenin düzeltilmesi için zaman tanınır, hasar eğer düzeltilemeyecek boyuttaysa hücre yaşlanmaya gider ya da hücre programlı hücre ölümüne gönderilir. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde, kanser oluşumu sürecinde ve hücre yolakların kontrolünde önemli görevleri bulunan transkripsiyon faktörü p53 proteini diğer protein ve transkripsiyon faktörleriyle yakın ilişki kurar. Bu gen grubunda oluşan en ufak bir hasar kanser ve nörodejeneratif hastalıkların oluşumuna sebep olduğu araştırmalar sonucunda keşfedilmiştir. (30) Mutasyon tipleri kanserden kansere değişkenlik gösteren p53 molekülü en çok mide ve meme kanseriyle ilişkilidir. Yaygınlığı epidemiyolojik olarak sigara, kanserojenik ajanlar, beslenme gibi faktörlerden, etiyolojik olarak iklim koşulları ile farklı coğrafik bölgelerden kaynaklı olarak değişkenlik gösterir. Bilhassa meme kanserinde p53 mutasyonları enlem ve coğrafyaya göre çok fazla değişkenlik gösterir. Bu mutasyonlar sadece epitelyal yayılım göstermeyip, sarkom, lösemi, lenfoma olarak etki gösterebilirler. Yapılan çalışmalara göre meme kanserinde CG dinükleotitlerinde transizyonlar batı Amerika'da fazla, eksojen olarak oluşan DNA hasarları İskoçya bölgesinde daha fazladır. (31)

Onkogenlerin kanser oluşturması iki farklı şekilde oluşabilir: Bunlardan birincisi, onkogenlerin ekspresyonundaki değişkenlikler diğer faktör de onkogenlerin yapısında oluşan değişikliklerdir. Onkogenlerin yapısında oluşan değişikliklere örnek olarak nokta mutasyonları, insersiyonlar, delesyonlar ve gen amplifikasyonları sayılabilir. Mutasyona uğrayan ya da amplifiye olan DNA bölgelerinden kodlanan proteinler anormal şekilde işlev görür ya da tamamen işlev göremeyecek çöp proteine dönüşür. Yapılan araştırmalara göre amplifiye olan gen bölgelerinin tümör gelişimini tetiklediği tespit edilmiştir. Bu konuya en belirgin örnek olarak, meme kanserinde cerbB-2(Her2-neu) onkogeninin amplifikasyonu gösterilebilir. (32)

Protoonkogenler bu mutasyonlarla ve kromozomlardaki yapısal değişikliklerle aktive olarak onkogenlere dönüşebilir. Vücut hücrelerinde bu olay son derece önemlidir. Çünkü protoonkogenlerin onkogenlere dönüşümü anormal bir ürün olan onkoproteinlerin üretimine neden olur. Böylece onkoproteinler hücrelerde hücre bölünmesini ve proliferasyonunu uyararak kanser oluşumunu başlatır. (32) Protoonkogenlerin ürünü olan onkoproteinler hücrelerin büyüme çoğalmasını uyarıcı niteliktedir. Buna karşın hücrede, protoonkogenleri denetleyen, anormal çoğalmayı ve maligniteyi kontrol altına alan tümör baskılayıcı genler (TSG; tumor suppressor gene) vardır. Tümör baskılayıcı genlere ait her iki alel karşılıklı olarak kaybolduğunda yada bu genlerden herhangi biri mutasyon geçirdiğinde bu genlerin hücreyi maligniteden koruyucu işlevi son bulur. Böylece tümörleşme meydana gelir. Tümör baskılayıcı genlerden p53 geninin kaybı ya da mutasyonu meme kanseriyle yakından ilişkilidir. (33)

**Tablo 1.** Onkogenez Sürecinde Fonksiyon Gösteren Genler ( 32-33)'den Uyarlanmıştır.

Gen Türü	Normal İşlevi	Mutasyonda İşlevi	Protein Tipleri	Örnek
Onkogenler	Bölünmeyi uyarır	Anormal bölünme uyarımı	Büyüme Faktörleri	RAS, BRAF, MYC
Tümör Baskılayıcı Genler	Hücre bölünmesini baskılar	Bölünmeyi baskılayamaz	Kontrol noktası molekülleri	p53
DNA Tamir Genleri	DNA mutasyonlarını onarır	Mutasyonlar tamir edilemez	Hatalı eşleşmedeki enzimler	BRCA

### 2.2.2. Kanser Oluşumunda Etkili Olan Çevresel Faktörler

- **Kimyasallara maruziyet:** Bazı mesleklerde uzun süreli kimyasallara maruz kalma vücutta kanseri tetiklediği bilinmektedir. Özellikle maden işçileri, temizlik ve boya fabrikalarında çalışanlar, kimyasal ürün ve yan ürünlerin üretim sektöründe bulunanlar, çeşitli tekstil işçileri, petrol üretim merkezleri gibi birçok meslek grubunu ilgilendirmektedir. Ayrıca kanser tedavisi için kullanılan ilaçların üretiminde çalışan birçok kişide immün yetersizlik sonucu kanser tablosuyla karşılaşmaktadır. Mesleki nedenler sonucu oluşan kanserler tüm kanserlerin %4'lük kısmını oluşturur. Asbest, kömür maruziyeti akciğer kanserine, plastik fabrikalarında çalışanlar karaciğer ve meme kanserine, boya sanayinde çalışanların deri ve mesane kanserine yakalandığı tespit edilmiştir.
- **İyonize radyasyon ve ultraviyole ışınlar:** İyonize radyasyonun lösemi ve epitelyal kanserlere neden olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarda saptanmıştır. Özellikle Japonya'ya atom bombası atıldıktan yıllar sonra doğan çocuklarda bile çeşitli anomaliler ve lösemi görülmüştür. Tıp sektöründe bulunan çeşitli teşhis aletleri de radyasyona maruziyet oluşturur. Radyasyonun dozu radyasyondan korunma bu noktada çok önemlidir. Ultraviyole ışınlar özellikle UVA ışınları cilt yaşlanması ve deri kanseri oluşumunu uyarabilir. Güneşten korunmadan açık havada çalışanlar ve cilt rengi açık olan kişilerin daha sık cilt kanseriyle karşılaştığı görülmektedir. (4)
- **Hava kirliliği ve sigara kullanımı:** Hava kirliliği ve sigara kullanımının akciğer kanseri vakalarının %10'undan sorumludur. Son zamanlarda sigara kullanımı üzerine yapılan çalışmaların sadece akciğer kanserine değil aynı zamanda yutak ve gırtlak kanserlerine, sindirim sistemi kanserlerine de sebep olduğu bulunmuştur.
- **Beslenme tarzı ve alkol kullanımı:** Özellikle sindirim sistemi kanserlerinden kolon ve mide kanseri beslenme alışkanlıklarıyla yakından ilişkilidir. Günümüzde gıda katkı maddelerini içeren yiyeceklerin tüketiminin giderek yaygınlaşması, trans yağ tüketimi, akrilamid içeren gıdaların kullanımı ve yetersiz lif alınımlı sindirim sistemi kanserlerine zemin hazırlamaktadır. Ayrıca çok fazla ve uzun

sürekli alkol tüketimi ilerleyen yıllarda karaciğer tahribatı sonucu pankreas, karaciğer, ağız ve yemek borusu kanserlerine neden olmaktadır.

- **Virüsler ve bakteriler:** Virüsler kanser başta olmak üzere birçok hastalıktan sorumlu bilinen en küçük organizmalardır. İnsanlarda Hepatit-B virüsünün karaciğer kanseri ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca Burkitt lenfoma ile ilişkili olduğu bilinen Epstein-Barr virüsü de bu konuya örnek verilebilir. Ayrıca son derece dayanıklı bir bakteri türü olan *H.pylori* mideye yerleşim gösteren bir konakçı olup ilerleyen zamanlarda midede kanser oluşumuna sebep olur.
- **Genetik faktörler:** Tek başına genetik bir hastalık olmayan kanser, hem genetik hem de çevresel birçok faktörden etkilenir. Yalnızca genetik faktörlerden etkilenen retinoblastom bu genellenimin dışındadır. Retinoblastom çocuklarda görülen bir göz kanseri olup ailevi geçiş taşımaktadır. (4)

Sonuç olarak kanser tek bir nedene bağlı olmadığı için, bir kanser türünden sorumlu birçok faktör tanımlanmıştır. Kanser oluşumunun altında yatan sebepler buldukça tanıya özgü tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi de hızlanmaktadır. (4)

**2.3. Tümör Tipleri:** Tümör, vücutta herhangi bir büyümeyi tanımlamak için kullanılan geniş bir tanımdır. Ancak iyi huylu (benign) veya kötü huylu (malign) bir büyüme neoplazm ile eş anlamlı hale gelmiştir. Neoplazm, kelime anlamı olarak yeni büyüme ya da yeni oluşum anlamı taşımaktadır. Büyümesi normal dokuyu aşan ve onunla koordineli olarak büyümeyen ayrıca büyümenin başlamasına neden olan uyarıcı ortadan kalksa bile büyümeye devam eden anormal doku kitlesi olarak da tanımlanır. Tümörler çevrelerindeki dokulara yayılım şekillerine göre iki kategoriye ayrılır. Bu kategoriler benign ve malign olarak adlandırılır. Benign ve malign tümörlerin iki kısmı bulunur. Bu kısımlar proliferasyon yapan neoplastik hücrelerden oluşan parankim (iç) doku ve bağ dokusu, kan damarları, makrofajlardan oluşan destek doku olan stromayı(dış) içerir. Parankimal hücreler genel olarak tümörün davranışını belirler. Stroma ise tümöral dokunun hacmini ve şeklini belirleyerek tümöre destek oluşturur.

Stroması çok olan tümörler daha serttir. Tümörlerin adlandırılması köken aldıkları dokuya yada görünümüne göre yapılmaktadır.

### 2.3.1. Benign Tümörler:

Benign tümörler genellikle çok az ya da hiç klinik etki göstermezler. Ancak vücutta bulunduğu yere bağlı olarak komşu doku ve sinirlere baskı yaparsa semptom oluşturur. Bu tümör tipinde hücreler yavaş çoğalır ve başka dokulara metastaz göstermez. Benign tümörleri çevreleyen pürüzsüz bir kapsül vardır. Cerrahi müdahale ile buldukları yerden çıkarıldığında tekrarlama olasılıkları çok düşüktür. Fibroma, kondroma, osteoma, papilloma, polip iyi huylu tümörlere örnektir.

### 2.3.2. Malign Tümörler:

Malign tümörler, büyürken doku ve organları tahrip ederek bulunduğu yerden vücudun başka bölgelerine yayılabilir (metastaz). Malign tümörlerde hücreler çok hızlı çoğalır, kapsül taşımazlar ve düzensiz şekillidir. Cerrahi müdahale ile çıkarıldığında tekrardan nüksetme ihtimali fazladır. Çevrelerindeki dokuları invaze ederek o doku ve organların normal işleyişlerini engellerler. Sarkoma, karsinoma, blastomlar lösemi ve lenfomalar kötü huylu tümörlere örnektir.(34-40)

**Tablo 2.** Benign-Malign Tümör Karşılaştırması (34-40)'den Uyarlanmıştır.

<b>Benign Tümör</b>	<b>Malign Tümör</b>
Yavaş büyüme gösterir	Çok hızlı büyür.
Tümör kapsülle çevrili	Sınırları düzensizdir
Çevre dokuları sıkıştırır	Çevre dokulara invazyon
Yapısal değişiklik oluşmaz	Ülserleşme-kanama oluşur
Metastaz oluşturmaz	Metastaz gelişimi vardır
Cerrahi sonrası nüksetmez	Nüksetme ihtimali yüksek

## **2.4. Malign Tümör Oluşumu**

### **2.4.1. Hedef hücrede malign değişim**

#### **2.4.1.1. Diferansiyasyon (Ayrımsallaşma):**

Bir tümörü meydana getiren parankim hücrelerin, onlara eşdeğer olan olgun formlarına fiziksel ve işleyiş olarak benzemesi diferansiyasyon olarak adlandırılmaktadır. Genellikle iyi huylu tümörler iyi differansiye olmuştur. Bu şekilde iyi huylu tümörleri oluşturan parankim hücreleri yapı ve işleyiş olarak köken aldıkları dokudaki hücrelere çok benzerlik gösterir. Kötü huylu tümörlerdeki diferansiyasyon oranı ise çok farklılık göstermektedir. Malign tümörler benign tümörler kadar iyi differansiye olmazlar.

#### **2.4.1.2. Anaplazi:**

Tümörleri oluşturan parankim ve stroma hücrelerinin diferansiyasyonunun ya az olması ya da hiç olmamasıdır. Malign tümörler hemen her dokuda yayılım gösterebilirler. Malign tümörlerin diferansiyasyonunun fazla olması ile, tümör hücreleri ait olduğu dokuya özel hücrelere benzemeye başlamaktadır.

### **2.4.2. Değişen hücrenin gelişmesi:**

Bir tümörün büyümesi ve gelişmesini etkileyen iki önemli faktör vardır. Bu faktörlerden biri tümör hücresinin kinetiği, diğeri tümör anjiogenezidir.

#### **2.4.2.1. Tümör hücresinin kinetiği**

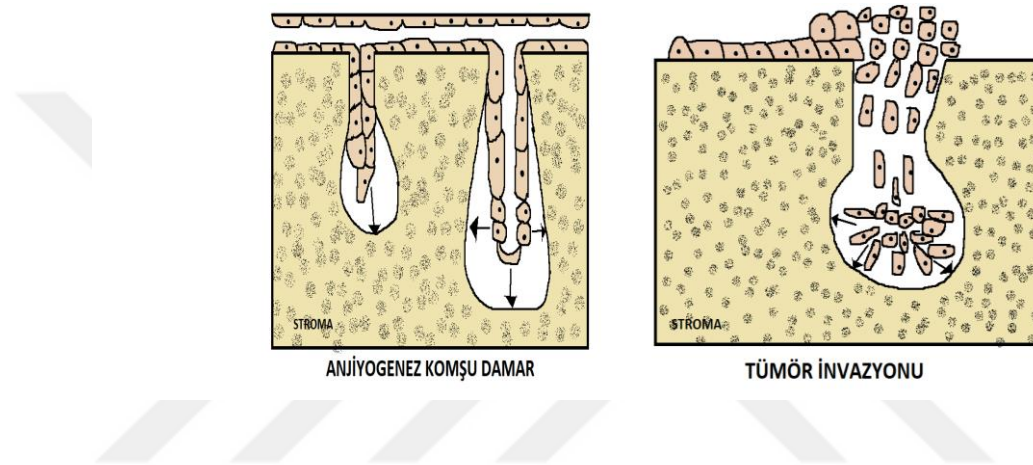
Tümör hücrelerinin kinetiğini, tümör hücrelerinin sayısının artması ve tümör hücrelerinin gelişmesi etkiler. Tümör hücrelerinin zamanla sayısının artması tümör çeşidine göre farklılık göstermektedir. Tümörlerin büyüme hızını üç faktör etkilemektedir. Bu faktörler; tümör hücrelerinin çoğalma süreleri, çoğalan hücrelerin tüm tümör hücrelerine oranı ve hücrelerin ölüm oranıdır. Tümörler ilk zamanlarda hızlı çoğalırken sonra bu hız apoptoz, besin yetersizliği, nekroz, diferansiyasyon ve G0 fazına geri dönme gibi faktörlerle gittikçe düşer. Tümör mikro çevresinde hücre çoğalması ölümden fazla olması durumunda tümör çapı artar. Tümörlerin büyüme hızı stabil değildir ve farklı tipteki tümör hücreleri farklı hızda büyür ve çoğalırlar. Ayrıca büyüme fraksiyonu fazla olan tümörler daha hızlı çoğalmaktadır. Küçük hücreli akciğer kanserinin büyüme fraksiyonu yüksek, meme kanserinin büyüme fraksiyonu ise düşüktür.

(34-40)



### 2.4.2.2. Tümör anjiogenezi (Neovaskülarizasyon)

Tümör anjiogenezi, tümöral doku çevresindeki kapiler damarlara ek yeni damarlanmaların oluşmasıdır. Normalde fizyolojik süreçlerde anjiogenez tümör hücrelerinin canlılığını sürdürmesi ve beslenmesi açısından anjiogenez çok daha fazla önemlidir. Büyüyen ve gelişen tümör dokusunun artan oksijen ve besin ihtiyacını karşılamak için tümör çevresinde kapillerizasyon artar. Anjiogenez dengesi bozulduğunda neovaskülarize olan tümör daha hızlı büyür ve giderek invazyon etkinliği kazanarak ilerleyen zamanlarda metastaz kapasitesini artırmaktadır. (35)



Şekil 3. Tümör İnvazyonu ve Anjiogenezi (38)'den Uyarlanmıştır.

### 2.4.3. Lokal invazyon:

İnvazyon genel anlamıyla malign tümörlerin komşu doku ve oluşumlara yayılması olarak tanımlanmaktadır. (37) Anatomik sınır tanımayan malign tümörler, kapiller, lenfatik veya sinir dolaşımı yoluyla diğer dokulara infiltre olurlar. Bu nedenle cerrahi yöntemlerle çıkarılırken invazyon gelişmeyen çevre dokuyla birlikte uzaklaştırılmaktadır. Doku türüne göre malign tümörlerin invazyon yeteneği değişiklik göstermektedir. Malign tümörlerin, en kolay invaze olduğu yol 'normal dokuların bağ doku stroması' olup bu yolla hızlı yayılım gösterirler. Bağ dokusunun elemanlarından olan kollajen lifler elastik liflere göre invazyona daha az dayanıklıdır. Bu durumun sebebi malign tümörlerin parankim ve stromasındaki kollajenazın elastaza göre daha fazla olmasındandır. Ancak yoğun miktarda kollajen içeren tendon, eklem kapsülü ve kıkırdak invazyona daha uzun süre dayanıklılık gösterir. Ayrıca arter çeperlerinin daha sert olması, elastin miktarı ve proteaz inhibitörleri içermesinden dolayı arterler venlere göre invazyona daha dayanıklıdır. (36-37-38)

#### 2.4.4. Uzak metastaz:

Yunanca kelime anlamıyla ‘farklı bölgede yerleşme’ anlamı taşıyan metastaz, tümör hücrelerinin primer tümörden farklı bir bölgede tutunup sekonder tümör meydana getirmesidir. Tümör türlerinin çoğunluğu primer neoplazmin sebep olduğu etkilerden dolayı metastaz oluşturma eğilimine sahiptir. Metastaz, tümör tedavilerinde başarısızlıkların temel sebebi olup malignitenin en büyük göstergesidir. Primer tümörlerin lenfatik sistem ve kan dolaşımı ile vücudun uzak doku ve organlarına yayılması kötü prognozla ilişkili olup tedavi akışını güçleştirmektedir. (37)

Bir tümör hücresinin metastaz oluşturabilmesi için bazı özellikleri taşıması gerekir. Bu özellikler intrinsik faktörler olarak adlandırılmaktadır. Tümörlerin proteolitik enzimler taşıması, özel hücre yüzey özelliklerine sahip olması, konakçı hücre ve dokularına bağlanabilmesi ve farklı bir organda gelişebilmesi metastaz oluşturabilmesinin özelliklerindedir. Metastaz oluşumunda önemli bir dizi basamak mevcuttur. Bunlar;

- Progresif çoğalma
- Lenf-damar oluşumu ( angiogenezis)
- Lokal invazyon
- Ayrılma ve embolizasyon
- Hedef doku-organa bağlanma
- Ekstravazasyon (damar dışına göç)
- Hedef organda sayıca ve hacimce artış (36-40)

Metastaz bir tümörün malign olduğunun kesin kanıtıdır. Tümörler ne kadar büyükse ve ne kadar hızlı yayılıyorsa o kadar çok metastaz yapma potansiyeli vardır. Metastaz yoluyla vücudun farklı yerlerine yayılım farklı tiplerde olabilir. Bunlar;

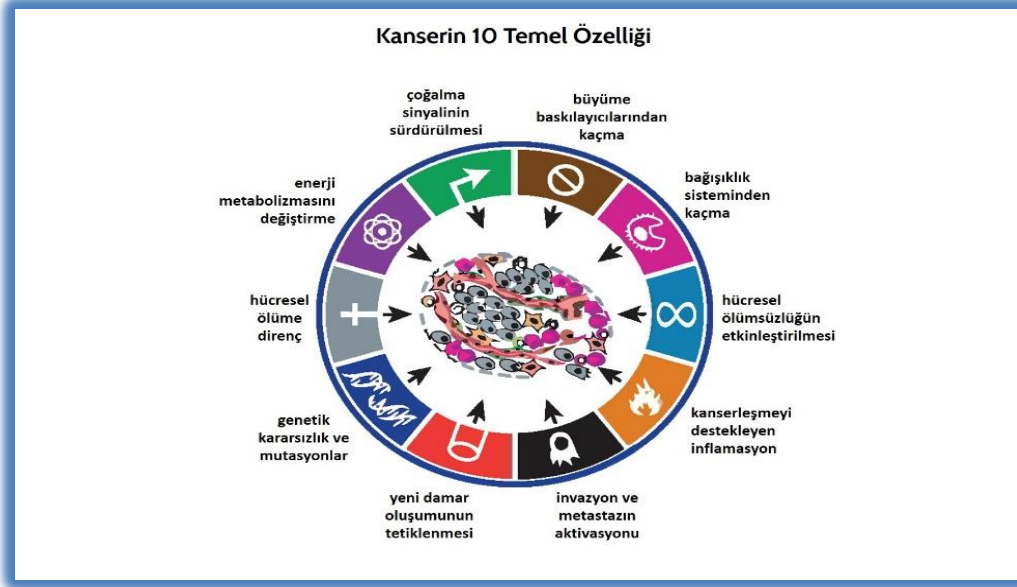
- Vücut boşluklarına ve yüzeylerine yayılım: metastaz yapan tümörler organları çevreleyen zarlar ve vücut boşluklarına yayılım gösterirler. Tümörler en çok periton, pleura ve perikardiyal tutulum gösterirler.
- Lenf dolaşımı ile dağılım: Lenfatik yayılım en çok karsinomlarda görülse de nadir olarak sarkom tipi tümörlerde de görülmektedir. Tümörlerin sahip olduğu normal kan ve lenf dolaşımını olmadığı için bölgesel lenf düğümleri ve nodüllerine yakın dokularda lokalize olmaktadır.

- Kan damarları yoluyla (Hematojen) dağılım: Kan dolaşımı ile yayılım daha çok sarkom tipi tümörlerde sık görülmekle birlikte ilerlemiş seviyede olan karsinomlarda da görülmektedir. Arterlerin sahip olduğu proteaz inhibitörleri, damar duvarının kalınlığı ve elastin miktarından dolayı invazyona venlerden daha dirençlidir. En fazla metastaz gelişen organlar vena kava yoluyla akciğer ve vena porta yoluyla karaciğer olmaktadır. Tümörlerin gelişim gösterdiği organların doğal venöz drenajları sonradan metastaz oluşabilecek organın seçiciliğini de belirlemektedir. Bu duruma örnek olarak; akciğer tümörlerinin yaygınlıkla böbrek üstü bezlere ve beyine metastaz yapması gösterilmektedir. (38-39-40)

## 2.5. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Hanahan ve Weinberg (2000), kanser hücrelerinin temel fonksiyonlarını 7 maddede özetlemişlerdir. Bu özellikler;

- Bir kanser hücresi kendi çoğalma sinyalini kendisi uyarır.
- Kanser hücreleri büyümeyi engelleyen gen ve protein sinyallerine karşı duyarsızdır.
- Kanser hücrelerinin sınırsız üreme potansiyeli vardır.
- Apoptosis ve nekrozdan kaçarlar.
- Çevrelerindeki doku ve organlara invaze olup, dolaşım yoluyla farklı doku ve organlara metastaz yapar.
- Kanser hücreleri büyümelerini devam ettirebilmeleri için kendilerine yeni damar oluşumu sağlamaktadır.
- Kanser hücrelerinin sahip olduğu mikroçevrede yaygın enflamasyonlar gelişmektedir. (40)



**Şekil 4.** Kanser Hücrelerinin Taşıdığı Genel Özellikler (75)

Sağlıklı hücreler, bölünebilmeleri için genelde dışarıdan gelen uyarıcı bir faktöre ihtiyaç duyarlar. Kanser hücreleri ise çoğunlukla ekzojen uyarılara ihtiyaç duymadan kendi kendine bölünme sinyalini oluşturabilirler. Kanser hücrelerinden farklı olarak sağlıklı hücrelerde bölünme sinyali büyüme faktörlerinden iletilen uyarı ile membrandaki reseptörle etkileşerek sinyal sitoplazmadan çekirdeğe ulaşır. Nükleusa sinyal iletim sistemi ile gelen uyarıya karşılık cevap olarak hücre bölünmesi uyarılır. Kanser hücrelerinde ise sinyal iletimi hasara uğradığı için bölünme emri otonom olarak gelişmektedir. Kanser hücrelerinde sinyal iletiminde görevli herhangi bir genin ve bu genden sentezlenen proteinin mutasyona uğraması ile kendinden önceki basamaklardan bağımsız olarak hücre kontrolsüz biçimde çoğalmaya başlamaktadır.

Kanser hücreleri çoğalmaya devam ettikçe ekspansif olarak çevresindeki dokuları sıkıştırır. Sağlıklı hücrelerde yaralanan bir dokunun tamiri veya yeni doku oluşumu sırasında çoğalmakta olan hücreler artık birbirini sıkıştırmaya başladığında gelen sinyali algılayarak bölünmeyi durdururlar. Ancak malignite kazanan kanser hücreleri kontak inhibisyona uğramayarak sınırsız bölünmeye devam ederler. Bu duruma sebep olan diğer bir etken ise normal hücrelerde sinyalleşmeyi kontrol eden tümör baskılayıcı genlerin kanser hücrelerinde mutasyona uğramasıdır. (41)

Normal vücut hücreleri dışarıdan gelen mutajen etkenlere karşı tamir mekanizmalarını oluşturarak DNA hasarını onarırlar. Hücre döngüsü esnasında hücreler DNA hasarına karşı daha duyarlı olup, oluşan hasar kontrol noktalarında algılanıp tamir edilmektedir. Zamanla tamir mekanizmalarında oluşan DNA mutasyonları birikerek hücrenin genomunda genetik kararsızlığa sebep olmaktadır. Genetik kararsızlık kanserleşen hücrelerin belirgin özelliklerinden birini oluşturmaktadır.

Normal koşullarda DNA'daki hasarı düzetilemeyen hücreler veya yaşlanan hücreler apoptozisle kendilerini ortadan kaldırırlar. Kanser hücreleri çoğunlukla apoptozisten kaçarlar. Mutasyona uğrayan hasarlı DNA'ya sahip olan hücreler zamanla birikerek tümör hacminde heterojeniteye sebep olurlar. Tümör kitlesinde oluşan heterojenite kanserli dokunun yeni özellikler kazanmasıyla birlikte programlı hücre ölümüne direnç oluşturmaktadır.

Sağlıklı hücrelerin genellikle belirli bir bölünme miktarı olup ortalama 30 kez bölündükten sonra hücreler artık bölünmeyi durdururlar. Malignite kazanan hücreler bölünme yeteneklerini artıracak yöntemler kazanarak ölümsüzleşirler. (48-49)

Kanser hücrelerinin geliştirdiği diğer bir adaptasyon ise daha fazla çoğalabilmek ve yaşamlarını sürdürebilmek için artan besin-oksijen ihtiyacını karşılama yöntemidir. Kanser, hücrelerin fazla ve zamansız üremelerine ek olarak metabolik ve davranışsal olarak da değiştikleri karmaşık bir süreçtir. Bu nedenle metabolizmaları da değişen diğer birçok faktör gibi yeni özellikler kazanmıştır. Sağlıklı hücreler bölünme dışı evrede sadece gerekli olan enerjiyi üretirken, kanserleşen hücreler enerji üretimine ek olarak yaşamları için gereken makromolekül sentezinden ve redoks dengesinden de sorumludur. Proliferasyon gösteren bu hücreler, 1 mol glikozdan kazanılacak ATP miktarı az olsa bile glikoz molekülünü oksijenli ortamda laktata çevirirler. Bu durum 'Warburg Etkisi' olarak tanımlanmıştır. Böyle bir durumun sebebi olarak, kanser hücrelerinin artan besin ve makromolekül ihtiyacını en hızlı ve en az enerji harcayarak elde etmektir. Kanser hücrelerinin oksijen varlığında anaerobik laktat yolağını tercih etmesinin nedenleri arasında; glikoz affinitelerinin fazla olması, anaerobik yolun daha hızlı olması ve hücreye birim zamanda daha çok glikoz kazandırması ve  $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$  döngüsü ile redoksun dengesinin sağlanması olarak sayılabilir. Ayrıca glikozun artan alınımı proliferasyonu ve dolayısıyla kümelenen biyokütleyi artıracaktır. (42-43-46)

Kanser hücrelerinde tümörgenezis arttıkça daha fazla besin ve oksijene gereksinim duyarlar. Çevrelerinde bulunan dokunun kapiller damarlarından karşılanan oksijen ve besin prolife olan hücreler için artık yetersiz gelmeye başladığında tümör hücreleri kendi damar ağını oluşturmaya başlamaktadır. Bu durum ‘anjiogenez’ olarak isimlendirilmektedir. (44) Tümör biyokütlesi büyüdükçe çevrelerindeki dokulara invaze olurlar. Bu invazyon zamanla artan oranda devam ederek kan ve lenf dolaşımı ile vücudun uzağındaki doku ve organlara taşınırlar ve kaynak almadığı dokularda da kanser oluşumunu başlatmış olurlar. Bu durum en yalın ifadeyle ‘metastaz’ olarak adlandırılmaktadır. Kanser hücrelerinde metastaz malignitenin en büyük belirtici olup kanserin klinik tablo göstermesinin net ölçütüdür. (44-45)

Kanser hücreleri değişen gen ifadeleri sonucunda bazı yeni antijenik özellikler kazanmaktadır. Kanser hücreleri vücudun immün sisteminden kaçmak için bir takım yöntemler kullanmaktadır. Bu yöntemlerden bazıları doku kabulü antijeninde (MHC) farklılık, antijen-antikor yoğunluğunu değiştirmek, bağışıklık hücrelerini baskılayan faktörlerde artış (TGF-beta, interlökin-10 ve VEGF gibi) örnek verilebilir.

Çapı giderek artan neoplastik doku içerisinde kanser hücrelerine ek olarak vücudun sağlıklı hücreleri de bulunur. Tümör heterojenitesine katkıda olan hücre grupları arasında; endotel hücreleri, bağ doku elemanları, immün sistem hücreleri yer almaktadır. Tüm bu hücre gruplarıyla birlikte kanserli hücreler tümör mikroçevresine katkıda bulunur. Tümör parankim ve stroması yüksek pH’ya sahip olması, hipoksi oluşumu ve iyon içeriğinin farklı olmasından dolayı sağlıklı dokudan farklılık gösterir. (46-47-49)

## **2.6.Kanserin Genel Belirtileri**

Kanserin klinik tablo oluşturmasıyla başlayan belirtilerin birçok türü vardır. Belirtiler kanserin olduğu organa ve vücutta dağılım miktarına göre farklılıklar gösterir. Bu semptomlar kişiden kişiye değişmekle birlikte, genel olarak belirtiler şu şekildedir:

1. Şişlik ve kitle oluşumu: Vücudun herhangi bir bölgesinde oluşan şişlikler uyarıcı nitelik taşımaktadır. Nitekim meme kanserinin erken tanısında koltuk altında, meme ve boyunda şişlikler dikkat çekmektedir. Tiroid kanserlerinde boyunda kitle ve şişlik yoğun olarak görülür. Vücutta her şişlik kanser belirtisi olmamakla birlikte yine de muayene gerektirmektedir.
2. Vücutta iyileşmeyen yaralar: Ciltte özellikle deri, ağız bölgesi ve makatta oluşan iyileşmeyen yaralar cilt kanseri bakımından araştırılmalıdır.

3. Cilt üzerindeki benlerde değişiklik: Benlerin çoğu zararsız olmakla birlikte bazen çevresel faktörler nedeniyle kötü huylu tümörlere dönüşebilirler. Benlerde oluşan renk ve doku değişikliği, daha hızlı büyüme yada yaraya dönüşme gibi faktörler kanser açısından risk taşımaktadır.
4. Kanama oluşumu: Vücudun herhangi bir bölümünden gelen beklenmedik kanamalar uyarıcıdır. Kolon kanserinde bağırsaktan kan gelmesi yada akciğer kanserinde öksürükle kanamalar olması bu belirtinin en tipik örneklerindedir.
5. Yutkunmada oluşan zorluklar: yutak ve yemek borusu kanserlerinde sık karşılaşılan bir tablodur.
6. Uzun süren öksürük ve seste değişiklikler: Uzun süredir sigara kullanan kişilerde gırtlak kanserinin bir belirtisi olarak öksürük ve ses kısıklığı görülebilir.
7. İdrar ve dışkılamada değişkenlik: kalın bağırsak kanserinde hastalar sık sık ishal ya da kabız olabilirler. Ayrıca dışkıda kan görülebilir. Prostat ve mesane kanserinde idrarda yanma, idrar güçlüğü yada kan görülebilir.
8. Açıklanamayan yoğun ağrı ve halsizlik: Vücutta oluşan yoğun ağrı genellikle ileri evre kanser tiplerinin belirtisi olup kemik ve testis tümörlerinde fazlaca görülür. Lösemi ya da kansızlığa sebep olan mide-bağırsak kanserlerinde halsizlik sık görülen bir semptomdur.
9. Yüksek ateş ve kilo kaybı: Kilo kaybı birçok kanser türünün ortak belirtisidir. Yüksek ateş genellikle ilerlemiş kanser durumlarında en çok lenfomada görülmektedir. (4-50)

## **2.7.Kanserde Teşhis Yöntemleri**

Kanser günümüzde en ciddi sağlık sorunlarından biri olup, tıptaki önemli ilerlemelere rağmen kanserin teşhis ve tedavisine yönelik henüz tam olarak bir çözüm bulunmuş değildir. Bu sebeple kanserin önlenmesinde ve tedavi edilmesinde erken teşhis büyük bir öneme sahiptir. Vücutta herhangi bir kanser belirtisi çıkmadan kanserin araştırılması önlem taraması olarak ifade edilir. Her kanser türüne özgü belirli bazı tanı yöntemleri vardır. Genel olarak nitelendirilmek gerekirse; hasta hikayesini dinleme, muayene, laboratuvar tetkikleri, kan ve idrar tahlili, röntgen ve ultrasonografi, manyetik rezonans görüntüleme, endoskopi ve biyopsi incelemeleri, sitoloji araştırmaları kanser teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Meme kanserinin teşhisinde kullanılan teknikler arasında; kendi kendine meme muayenesi, klinik meme muayenesi, mamografi, ultrasonla muayene, MR görüntüleme ve biyopsi incelemeleri sayılabilir.

- Prostat kanserinin teşhisinde yaygın kullanılan yöntemler rektal muayene ve prostat spesifik antijen (PSA) testidir.
- Akciğer kanserinin teşhisinde ise göğüs grafisi, balgam sitolojisi ve spiral bilgisayarlı tomografi kullanılır.
- Kolorektal kanser teşhisinde; gaitada gizli kan testi, bariyum enema, kolonoskopi, rektal muayene, sigmoidoskopi, DNA gaita testi sonuçları büyük önem taşımaktadır.
- Rahim ağzı ve rahim-yumurtalık kanserlerinin teşhisinde kullanılan tetkikler; transvajinal ultrason, endometrial örnekleme ve pap testi olarak sayılabilir.
- Mesane ve idrar yolu kanserlerinde; tam idrar testi, idrar sitolojisi ve sistoskopi teşhiste kullanılan yöntemler arasındadır.
- Deri kanserinde ise çıplak gözle muayene ve şüpheli bir alan varsa biopsi alınarak teşhis yapılmaktadır. (51-52)

## **2.8. Kanserde Tedavi Metotları**

Kanser hastalığının tedavisinde kanser türüne ve evresine göre farklı tedavi metotları izlenmektedir. Kanser kişiye özgü bir hastalık olması nedeniyle aynı kanser tipine sahip hastalara farklı tedavi metotları uygulanabilir. Bu nedenle kanserin tek bir tedavi tipi yoktur. (4)

### **2.8.1. Radyoterapi**

İyonize olmuş ışınlar yardımıyla kanserli hücrelerin öldürülmesini sağlayan bir tedavi şeklidir. Bütün vücuda lokal yada genel olarak uygulanabilir. Cerrahi işlem öncesinde tümörlü dokunun küçülmesi amaçlı da kullanılmaktadır. Radyoterapi yönteminin kullanılmasındaki temel amaç, öldürülmek istenen malign hücreleri en yüksek oranda yok ederken sağlıklı hücreleri en az hasara uğratmaktır. Radyoterapi başlığı altında kullanılan bazı sistemler vardır. Kemik ve tiroid kanseri gibi vakalarda işaretli radyoaktif elementlerden olan Radyum-223 ya da Stronsiyum-89 vücuda



uygulanarak tedavide başarı sağlanmaktadır. Kemoterapi ile birlikte kullanılan radyoterapi uygulamaları tümör iyileşmesini daha fazla hızlandırmaktadır. (53)

### 2.8.2. Kemoterapi

Kanser hücrelerini kemoterapötik ajanlar yardımıyla öldürerek neoplastik dokunun ortadan kaldırılmasını sağlayan bir yöntemdir. Diğer tedavi yöntemleriyle birleştirilerek, tek başına ya da cerrahi girişim öncesinde de uygulanabilen bir tedavi yöntemidir. Kemoterapi oral (ağız yoluyla), intravenöz (toplardamar yoluyla) intratekal (omurga içine) intrakaviter (vücut boşluğuna) ya da intramusküler (kas içine) olarak uygulanabilir. Kemoterapi tedavisi sırasında verilen ilaçlar genel olarak 6 formda olmaktadır. Bunlar;

- Kortikosteroidler; kanser tedavisinde kullanılmasının amaçları arasında enflamasyon (iltahap) seviyesini düşürmek, bağışıklık sistemini baskılamak ya da kanserli hücre çoğalmasını baskılamaktır. Bu sebeple steroid benzeri ilaçlar kemoterapi de kullanılmaktadır.
- Alkilleyici ajanlar; hücre bölünmesinde ya da protein sentezinde DNA'nın transkribe olmasını engelleyerek etkilerini gösteren ilaçlardır. Alkilleyici ajanlar, hücreye girdiğinde DNA'daki alkil grupları ile hidrojen atomları yer değiştirerek hücrede karsinojen süreç oluşturur. Alkilleyici ilaçlar, alkil sülfonatlar, nitrozüreler, etilamin, metilamin, traizen olarak gruplara ayrılırlar.
- Anti-tümör antibiyotikler, DNA ve protein sentezine engel olarak kanserli hücrelerin bölünmesini ve gelişimini baskılayan ilaçlardır. Birçok kanser tipinin tedavisinde kullanılmaktadır.
- Anti-metabolitler, vücutta sinyal iletiminden, hücre büyümesi ve bölünmesinden, hücrenin metabolizmasından sorumlu bazı küçük molekülleri baskılayan özel kimyasallardır. Hücre metabolizmasına ve hücre bölünmesine etki ederek kanserli hücreleri programlı hücre ölümüne sokabilir. Pürin- pirimidin türevleri, nükleotid ve nükleozid analogları, antifolatlar olarak alt gruplara ayrılmaktadır. Anti-metabolitlerden olan 5-florourasil meme, mide bağırsak kanserinde uygulanan bir pirimidin analogudur. Gemsitabin ve merotraksat anti-metabolitleri kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan kimyasal gruplardır.



yeni ilaç geliştirilmesinde, hücre bazlı tedavilerde ve daha birçok alanda kullanılmaktadır. Kök hücrelerin hastalık tedavilerinde kullanılabilmesi için bir takım özellikler taşımaları gerekmektedir. Bu özellikler; kök hücrelerin istenilen hücelere dönüşebilme potansiyeli, kök hücrelerin transplante edildikten sonra sağ kalabilmesi, kök hücrelerin çevrelerindeki doku ve organlara zarar vermemesidir. Lenfoma, lösemi, böbrek tümörlerinde kök hücre tedavisi başarıyla uygulanmaktadır. (56-57)

### **2.8.3.2. İmmünoterapi**

İmmünoterapi ile üç molekül grubu kanser tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu moleküller antikorlar, sitokinler ve hücrelerdir. İmmünoterapide amaç bağışıklık sistemini uyararak kanserli hücelere atak yapmasını sağlamaktır. Bu yöntemde vücut kendi immün sistem hücrelerini kullanabileceği gibi dışarıdan monoklonal antikorlar aracılığıyla da uyandırılır.

- Antikor ile tedavi: Antikor tedavilerinde genellikle monoklonal antikorlar, konjuge antikorlar, çıplak monoklonal antikorlar ve bispesifik monoklonal antikorlar kullanılmaktadır. Antikorların görevi, vücuda giren ajanlara (antijen) karşı B hücreleri tarafından üretilen proteinler olup vücudu zararlılara karşı korur. Monoklonal antikorlar görevlerini, hücre sinyalleşmesini bloke ederek, immün sistemi uyararak ya da hücreye ilaçları ileterek göstermektedir. Over kanseri tedavisinde kullanılan Alemtuzumab, meme kanseri tedavisinde kullanılan Trastuzumab monoklonal antikorlara örnek gösterilebilir.
- Spesifik olmayan immünoterapiler: Genellikle destek tedavi olarak kullanılmaktadır. Vücudun hastalıklara karşı dayanıklılığını artıran interferonlar, B ve T lenfositlerinin sinyal iletiminde kullanılan interlökinler bu tedavi yönteminde kullanılan moleküllerdendir. (55-58-59)

### **2.8.4. Hormon Tedavileri**

Hormonlar, vücutta doğal olarak bulunan ve ihtiyaç anında salgılanan protein yapılı bileşiklerdir. İhtiyaç anında salgılandıktan sonra dolaşım yoluyla doku ve organlara girerek endokrin sinyalleri taşır. Özellikle meme, prostat, over ve mesane kanserlerinin tedavisinde cinsiyet hormonları bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Hormon tedavilerinin en büyük özelliği, vücudun doğal olarak ürettiği bu moleküllerin hücreye bağlanarak kanser hücrelerinin büyümesini baskılamasıdır. Bu tedavi yönteminde kullanılan inhibitörler üç alt kategoriye ayrılır.

- Hormon sentez inhibitörü: Hormonun sentezlendiği yerde üretimi engelleyerek işlev gösterirler. Aromataz inhibitörleri ve Gonadotropin salgılayan hormon (GnRH) olarak iki farklı tiptedir. Aromataz inhibitörleri, androjenlerin östrojene dönüşmesini bloke eder. Böylece hücrede östrojen seviyesini düşürerek hücre büyümesini baskılar. Özellikle östrojen reseptörü pozitif meme kanserinde kansere bağlı ölümleri azaltmaktadır. Gonadotropin salgılayan hormon inhibitörleri organlarda folikül üretimini inhibe ederek ve testosteron-östrojen üretimini durdurarak organı kimyasal olarak kısırlaştırır. Kısırlaşan organlardan hormon üretimi olmayacağı için hücre büyümesi engellenmiş olur. Aromataz inhibitörlerinden olan ‘letrozol’ sıklıkla östrojen reseptör pozitif meme kanserlerinde uygulanmaktadır.
- Hormon reseptör antagonistleri: Hücre yüzeyinde hormona ait yüzey reseptörüne bağlanarak etkilerini gösterirler. Bu sayede hormonun yüzey reseptörüne bağlanmasını bloke ederek hücre büyüme sinyalini engellenmiş olur. Hormon reseptör antagonistleri androjen inhibitörleri ve östrojen inhibitörleri olarak iki gruptadır. Bu inhibitörlerden ‘tamoksifen’ özellikle hormon reseptör pozitif meme kanserinde ve metastaz geliştirmiş meme kanserlerinin tedavisinde kullanılır.
- Hormon alınıması: Bazı vakalarda hormon reseptörlerini baskılamak yerine dışardan ek olarak hormon takviyesi uygulanarak mevcut hormon seviyeleri artırılır. Yüksek doz hormon takviyesi kanser hücreleri üzerinde sitotoksik bir etki oluşturarak tümör çapının daralmasını sağlamaktadır. (57-60-61)

### **2.8.5. Cerrahi Uygulamalar**

Tümörlü dokuda tek başına uygulanabildiği gibi kemoterapi ile birlikte de kullanılan bir yöntemdir. Metastaz olmayan kanser dokunun alınımında, kanser şüphesi olan dokudan parça alınıp tanı koyulmasında ya da yeni gelişen tümörün engellenmesinde cerrahi yöntemi sık kullanılır. Cerrahi operasyonla tümörün tek başına çıkarılmadığı durumlarda tümör çevresindeki bir miktar dokuyla uzaklaştırılmaktadır.(62-63)

### **2.8.6. Kanser Aşuları**

Zayıflatılmış molekülleri veya virüsleri kullanarak bağışıklık sisteminin uyarılmasını sağlayan kanser aşuları normal aşularla benzer prensipte çalışmaktadır. Kanser aşularının en büyük farkı ise kanser hücrelerini hedeflemesidir. Vücutta B ve T lenfositleri uyararak etkilerini göstermektedir. Kanser aşularının hedefi, bu aşuların kanseri tedavi etmesi değil kanser oluşumunu önlemesidir. Rahim ağzı kanserine neden olan HPV virüsüne (Human Papilloma Virüs) karşı üretilmiş olan 'Cervarix' kanserden korunmada başarı sağlamıştır. (59)

### **2.8.7. Büyüme İnhibitörleri**

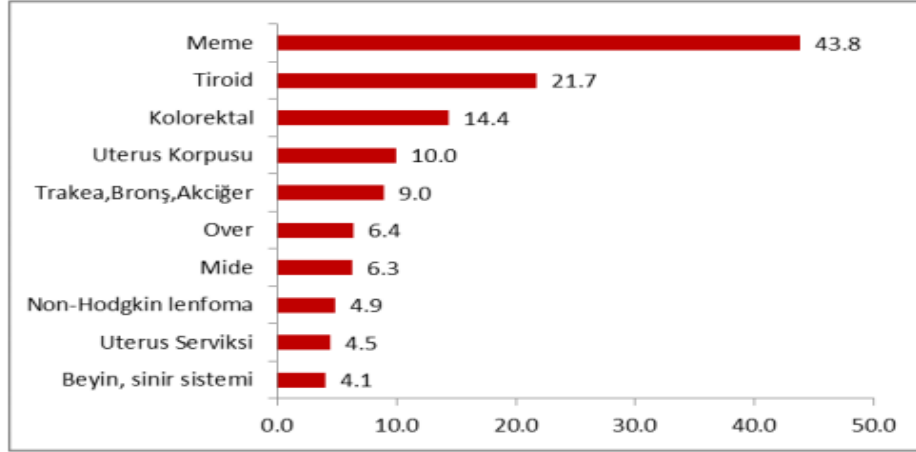
Büyüme faktörleri vücutta doğal olarak sentezlenen ve hücre sağkalımında çok önemli görevleri olan moleküller olup, hücreler arası sinyalleşmede ve hücre büyümesinde etkilidir. Kanser hücrelerini hedef alan mekanizmalardan biri de kanser hücrelerinin kendi kendine büyümelerini önlemektir. Kanser tedavisinde üzerinde en çok çalışılan büyüme faktörleri arasında; damar endotel büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü örnek verilebilir. Büyüme faktörlerinin yaptığı inhibisyona göre mTOR inhibitörleri, proteozom inhibitörleri, histon deasetilaz blokerleri, tirozin kinaz blokerleri ve fosfoinositid-3-kinaz blokerleri olarak gruplandırılmaktadır. (64-65)

### **2.8.8. Gen Terapisi**

DNA'nın en küçük birimi olan genlerde metilasyon, asetilasyon yada delesyon sebebiyle değişiklikler meydana gelirse bu genlerden kodlanan proteinlerde tam olarak görevini yapamaz. Gen terapisinde işlevi bozulmuş olan genlerin düzeltilmesi kanser tedavisine yeni bir ivme kazandırmıştır. Gen terapisinde genler hücre içine doğrudan veya dolaylı olarak transfer edilebilir. Genleri hücre içine taşıyan yapılar vektör olarak adlandırılmaktadır. Vektör ile hücre içine istenen genin transferi viral vektörler yoluyla ya da viral olmayan vektörlerle yapılmaktadır. Sık kullanılan viral vektörler arasında adeno ilişkili virüs vektörü (AAV) ve herpes simplex virüsü (HSV) ve retrovirüs bulunmaktadır. Viral olmayan vektörlerden ise sentetik polimerler ve lipidler tercih edilmektedir. (57)

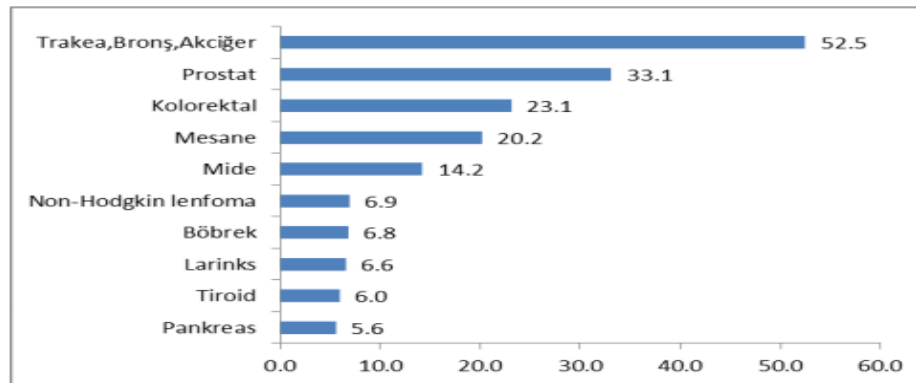
## **2.9. Dünya'da ve Türkiye'de Kanser İstatistikleri:**

Her yıl dünyada milyonlarca insanı etkileyen kanser hastalığı zengin, fakir, cinsiyet, ırk ayırt etmeksizin tüm insanlığı etkileyen bir endemidir. 2011 yılında ölüm sebepleri arasında birinci sıraya çıkması kanser sorununa karşı yapılan araştırmalara ve geliştirilen tedavi metotlarına da hız kazandırmıştır Kanser, ilerleme hızıyla doğru orantılı olarak önümüzdeki birkaç on yıl içerisinde dünyanın diğer bölgelerinde de morbite ve mortalitenin başlıca sebebi olacaktır. (66) Dünyada ve ülkemizde ölüm sebepleri arasında kanser ikinci sıradadır. Dünya genelinde kanser yaygınlığı yaklaşık olarak her 6 ölümden biri iken, ülkemizde her 5 ölümden biridir. Bu ölümlerin nedenleri arasında; sigara kullanımı, vücut kitle indeksinin fazlalığı, lifli gıdalardan fakir diyet, sedantel yaşam, alkol alınımı sayılabilir. Sigara kullanımı kanser tetikleyicileri arasında %22'lik oranla en büyük faktördür. (67-68)



**Şekil 6.** T.C. Birleşik Veri Tabanı Kayıtlarına Göre (2015) Kadınlarda En Sık Görülen Kanser Türleri (Dünya Standart Nüfusunda- 100.000 Kişide) (71)

Türkiye’de tanı alan her 4 kadından 1’i meme kanseridir. Meme kanseri alan kadınların %44,5’i 50 ile 69 yaş arasında olduğu, %40,6’sının ise 25 ile 49 yaş grubuna sahip olduğu tanımlanmıştır. Kolon kanseri insidansı erkek ve kadınlarda sıralamada üçüncü sırada bulunmaktadır. Serviks kanseri HPV etkenli bir virüs olup ülkemizde dokuzuncu sıralamada yer alarak düşük oranda görülmektedir. Obezite ile ilişkili olan meme kanseri, over ve uterus kanseri en çok kadın nüfusu etkilemektedir. Nadir de olsa meme kanseri erkek nüfusta da görülmektedir. Tiroit kanseri ülkemizde kadınlar arasında görülme sıklığı bakımından ikinci sıradadır. Dünya çapında ve ülkemizde tiroit kanserinin yüksek sıralamada olmasının nedenleri arasında cinsiyet, obezite, iyot eksikliği, radyasyon maruziyeti ve kimyasal karsinojenlere maruz kalma olarak sayılabilir. (71-73)



**Şekil 7.** T.C. Birleşik Veri Tabanı Kayıtlarına Göre (2015) Erkeklerde En Sık Görülen Kanser Türleri (Dünya Standart Nüfusu 100.000 Kişide) (71)

Dünya genelinde kanser yükü kalp hastalıklarından veya spesifik hastalıklardan kaynaklı ölüm nedenlerini aşmış durumdadır. Dünyadaki yeni kanser vakalarının çoğundan Çin, Hindistan ve Asya ülkeleri sorumludur. Cinsiyete bağlı kanser istatistiklerine göre, erkeklerde en sık görülen kanser tipi akciğer ve prostat kanseri olup bu sıralamayı kolon, mide, karaciğer kanserleri izlemektedir. Erkeklerde ölüm riski en çok olan kanser tipi akciğer kanseri olarak tespit edilmiştir. Kadınlarda en fazla meydana gelen kanser, meme kanseri ile ilk sırada olup bu sıralamayı kolon kanseri, serviks kanseri ve akciğer kanseri takip eder. Dünyada 140 ülkede meme kanseri kadınlarda en sık rastlanan kanserdir. (69)

Dünyada 2012 yılı verilerine göre 14,1 milyon kanser vakası tanımlanmış olup bunlardan 8,2 milyonu kansere bağlı mortalite yaşamıştır. Oluşan yeni kanser vakalarının %57'si dünyanın az gelişmiş ve gelir düzeyi düşük bölgelerinde meydana gelmiştir. Tahmin edilen verilere göre, 2025 yılına kadar 19,3 milyon kanser teşhisi ve bunlar arasından kansere bağlı olarak 11,4 milyon mortalitenin meydana geleceği düşünülmektedir. (69)

Kanserin meydana gelmesi ve kanser tiplerinin farklılığı dünya çapında coğrafi bölgelere göre çeşitlilik göstermektedir. Güney Amerika, Asya kıtası ve Afrika ülkelerinde karaciğer, mide ve rahim ağzı kanserlerinin rölatif olarak nedeni hepatit virüsü, Helikobakter pilori bakterisi ve insan papilloma virüsünün yaygınlığı ile ilişkilendirilmiştir. Ancak batılı tarz yaşamı benimseyen Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerinde enfeksiyonla ilişkili kanserler yerine beslenme ve yaşam tarzıyla ilişkili olan mide, kolon ve meme kanserlerinin prevalansı yüksektir. (69-70)

Kanser hastalığının azaltılmasına yönelik yapılan çalışmalar göstermiştir ki kanser çeşitli tedavi yöntemleri ile değil önleme çalışmaları ile kontrol altına alınmalıdır. Dünya çapında ekonomik şartları yetersiz olan çevrelerde hastalıkların tedavi maliyeti ilişkin endişeler fazlalaşmıştır. Bu sebeple Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) sağlığın korunması ve geliştirilmesine yönelik yaptığı çalışmalarda, toplumların genelini etkilemek amacıyla sağlık yatırımlarını ve sağlıklı yaşam politikasını amaçlayan planlar yayınlamıştır. Kanserden korunmayla birlikte erken teşhiste kanserden ölümleri önlemede en önemli bileşenlerden biridir. (69-72-74)



Gelişmiş ülkelerin birçoğunda hastalığın erken evrelerinde uygulanan teşhis ve buna etkin uygulanan tedavi mortalite oranlarını düşürmüştür. Gelişmemiş ve az gelişmiş ülkelerde düşük fiyatlı ve etkinliği yüksek ilaçlara ve aletlere ulaşım sınırlı olmasından dolayı %20 daha fazla ölüm insidans hızına neden olmuştur. Afrika ve Güneydoğu Asya ülkelerinde cerrahi onkoloji, moleküler ilaç tedavileri, radyoterapi imkanları açısından büyük sıkıntıya sahiptir. Kanser teşhis ve tedavisinde kaliteli ve adil sağlık hizmetlerine erişim gerekmektedir. Bu nedenle küresel olarak her kesimin kanser tedavisine eşit olanakta ulaşabilmesi için yeni bilimsel yaklaşımlara ihtiyaç vardır. (69-73)

Kanseri kontrol altına alabilmek için kanserin güvenli bir şekilde takip edilmesi ve kayıtçılığının yapılması gerekmektedir. Kanser kayıtçılığı, bir toplumda tanı veya tedavi alan hastaların tümörleri, kanserin tipi, evresi, gördüğü tedavi ve sonucu ile ilgili verilerin toplanmasıdır. Dünya genelinde toplum-tabanlı kanser kayıtçılığı 1966 yılında kurulan Uluslararası Kanser Kayıt Derneği (IARC) tarafından yürütülmektedir. Bu dernek her beş yılda bir dünya çapında beş kıtanın kanser insidansını yayınlamaya bu yıllar arası kanser yaygınlığını ve bölgelere özgü kanser kitlelerinin dağılımını değerlendirir. (70-71)

Türkiye’de kurulmuş olan ilk nüfus tabanlı kayıt sistemi 1992 yılında İzmir’de çalışmalara başlamıştır. Bu çalışmada ölüm istatistikleri değerlendirilerek ortaya çıkan verilerle kanser insidans hızı hesaplanmaktadır. Kanser insidans hızı kanser kayıtçılığında önemli değerlendirme ve istatistiklere katkıda bulunmaktadır.

**Tablo 3.** GLOBOCAN 2012 Verilerine Göre Kanser İstatistiklerinde Türkiye’nin Durumu (71)’den Uyarlanmıştır.

	ERKEK	KADIN
Dünya	204,9	165,2
IARC'a üye 24 ülke'de	235,4	192,1
Avrupa Birliği	311,3	241,4
ABD	347	297,4
Türkiye	222,8	160,6

## 2.10. Kanser Hücrelerinin Değişen Metabolizması ve Bağımlılıkları

Klinik kanser tablosunda, hücreler fazla miktarda ve zamansız bölünerek çok sayıda metabolik değişiklik geçirirler. Kanser hücrelerinde oluşan bu değişiklikler sonucunda kanser hücreleri bir takım özellikler kazanır. (75)

Kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelerden farklı olarak metabolik süreçlerde üç önemli basamak özelliğini kaybetmiştir. Bu basamaklardan birincisi, hücre bölünmesinin gerekli sinyal doğrultusunda gerçekleşmesidir. Bu özelliğin zarar görmesi ile hücrenin büyüme faktörleriyle veya hormonlar yoluyla aktifleşen bölünme emri artık engellenemez hale gelmektedir. Kanserli hücrelerde değişikliğe uğrayan diğer basamak ise, hücreler mutasyon veya anormal çevresel etmenlerle karşılaşp DNA hasara uğradığında hasarlı hücreyi apoptoza sürükleyememesidir. Bu mekanizmayı kontrol eden p53 ve retinoblastoma genlerinde oluşan mutasyon sonucu kanserli hücreler apoptozdan kaçarak tümörleşmeyi hızlandırır. Değişikliğe uğrayan son basamak ise her hücrenin belirli bir bölünme kapasitesi olmasıyla alakalıdır. Telomerler kromozomların uçlarında bulunan ve her hücre bölünmesinde kısalan DNA tekrarlarıdır. Sağlıklı hücrelerde bölünmeyle birlikte bu telomerler zamanla kısalır ve en sonunda biterek hücre artık bölünemez hale gelir. Ancak kanserli hücrelerde durum bundan farklıdır. Kanser hücreleri sınırsız bölünme kapasitesi kazanmak için telomerase enzimi ile kromozomun uçlarına yeni DNA tekrarları ekleyerek hücreyi senesense girmekten kurtarır. (75)

Kanser hücreleri hücre bölünmesiyle ilgili kazandığı yeni özelliklere ek olarak metabolik yollarda da birçok farklı modifikasyon sağlamaktadır. Kanser hücreleri artan enerji ve makromolekül ihtiyacını karşılayabilmesi için karbohidrat, protein ve lipid metabolizmasını yeniden düzenlemiştir. (76)

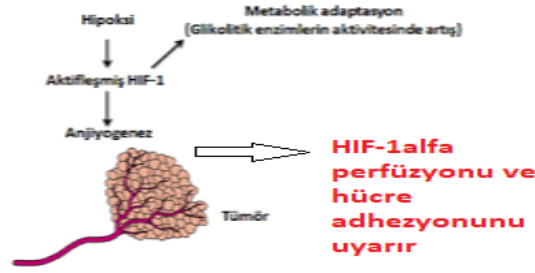
### **2.10.1. Kanser Hücrelerinde Karbohidrat Metabolizmasındaki Değişiklikler**

Tümörenezisde, kanser hücrelerinin bağımsız olarak büyümesi ve hayatta kalabilmesi metabolik çözümlerle yakından ilişkilidir. Kanserli hücrelerdeki bu işgalci çözümler karbohidrat metabolizmasında yapıtaşları glikoz ve glutamin aminoasitinden kaynak bulur. Kanserli hücrelerde proliferasyon sırasında hücreler yalnızca DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi için gereken enerjiyi üretmekle kalmayarak makro molekül ihtiyacını ve hücrel redoks satabilitesini de sağlamak zorundadır. (77)

Prolife olan hücrelerin karbohidrat metabolizmasında karşılaştığı ön önemli özelliklerden biri hipoglisemi diğeri ise hipoksidir. Tümörleşme süresince, kanserli hücrede intraselüler ortama asidoz ve hipoksi eşlik eder. Bu süreçte kanser hücrelerinin çok hızlı ve kontrolsüz çoğalmasıyla birlikte düşük miktarda kanlanmaya bağlı olarak hipoksi oluşmaktadır. Sağlıklı hücrelerin büyüme ve bölünmeleri için son derece elverişsiz olan bu ortam kanserli hücrelerin gelişimini tam aksine uyarmaktadır. Hipoksik koşullar perfüzyonu zayıf olan normal hücreler de glikoz ve diğer moleküllerin hücre içine alınımını engellese bile kanserli hücrelerde böyle bir durum oluşmaz. Tümör dokusunda hücre içinde oksijenlenme az ancak glikoz bakımından zengin hipoksik şartlar hakimdir. Bu duruma göre kanser hücrelerin tercih ettiği enerji yolu ‘aerobik glikoliz’dir. Warburg etkisi olarak bilinen bu metabolik yolda kanserleşen hücreler glikozu oksijenli ortamda laktata dönüştürmektedir. Bu sayede prolife olan hücreler daha hızlı kısa sürede daha fazla enerji ve makromolekül sentezlemektedir. Kanser hücrelerinin bu yolu tercih etmesindeki diğer bir avantaj ise piruvattan elde edilen laktatın bir atık değil aynı zamanda neovaskülarizasyonu destekleyici, hücre göçünü uyarıcı ve radyoaktif-kemoterapik direnci geliştirici metabolik bir ürün olmasından kaynaklanır. (78-79)

Kanser hücresinde Warburg etkisini destekleyen bir transkripsiyon faktörü olan hipoksi ile uyarılan ‘faktör 1-alfa’ diğer adıyla HIF-1alfa, neovaskülarizasyonu ve perfüzyonu indüklemektedir. Bu sayede kanser hücreleri daha kolay damarlanma sağlayarak çevresindeki dokulara invaze olmaktadır. HIF-1alfa faktörünün miktarı hücrede oksijenlenme arttıkça azalmakta ve hipoksi koşullarında sabit kalmaktadır. Bu transkripsiyon faktörü ayrıca hücre içi asitliğin ve bazlığın düzenlenmesinde, aminoasit ve nükleik asit metabolizmasının kontrolünde ve mitokondrinin çalışmasının baskılanmasında da işlev görmektedir. Yapılan bir çalışmaya göre HIF-1alfa düzeyi yükseldikçe kanser hücrelerinin ilaçlara karşı direnci artmakta ve hücreler daha adhesif hale gelmektedir. (80)

### Tümör Dokusunda Anjiyenez Gelişimi



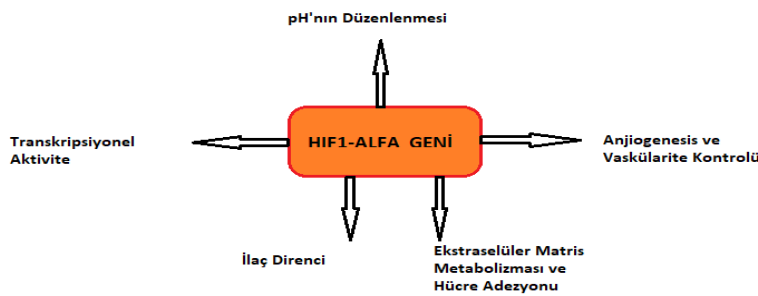
**Şekil 8.** HIF-1alfa'nın Tümörleşmedeki Etkisi (88)

Hızla prolife olan hücrelerin normal hücrelere kıyasla glukoza 5-10 kat fazla afinitesinin olması ve kendi kütlelerinin %30'undan fazla glukoz harcayabilmesinde hücre yüzeyinde bulunan glukoz taşıyıcılarının ve karbohidrat metabolizmasında görevli hız kısıtlayıcı enzimlerin inhibe olmasının da etkisi mevcuttur. GLUT olarak kısaltılması yapılan glukoz transporterlarının birçok tipi bulunur. Kanser hücrelerinde bu glukoz taşıyıcılardan tip1, tip3 ve tip4 aktifleşmiş durumdadır. Bu etkinin oluşmasında tümör baskılayıcı gen olan p53'ün mutasyonu ile inhibe olması sorumludur. Karbohidrat metabolizmasının kontrolünü, ileri ya da geri ilerlemesini sağlayan hız kısıtlayıcı enzimler degrade olduğunda hücrede glikoliz kontrolsüz olarak hızlanmaktadır. Karbohidrat metabolizmasında anahtar rol oynayan üç enzim bulunmaktadır. Bunlar Hezokinaz, Fosfofruktokinaz ve Piruvat Kinaz'dır. Bu enzimlerin herhangi biri ya da birkaçında oluşan bozukluklar, kanser hücrelerinin oksijen olup olmasına bakmaksızın piruvatı laktata çevirmesini sağlar. (79-81)

Tümör hücrelerinin enerji elde edebilmesinde temel metabolik yol olan aerobik glikolizi seçmesinin bazı özel sebepleri vardır. Oksijen bakımından yetersiz kalan kanser hücrelerinde mitokondri fonksiyonunu kaybederek Krebs döngüsü ve elektron taşıma evresi görevini yerine getiremez hale gelmektedir. Oksijenli ortamda normal hücreler glikolizin sonunda oluşan piruvatı Asetil Ko-A'ya piruvat dehidrogenaz enzimi ile dönüştürerek piruvatı Krebs döngüsüne yönlendirir. Bu noktada önemli rol oynayan piruvat dehidrogenaz enziminin fosforile hali inaktif olup defosforile hali aktiflik göstermektedir. Burada devreye HIF1-alfa transkripsiyon faktörü girerek piruvat dehidrogenaz enzimini fosforile ederek inhibe olmasını sağlar. HIF1-alfa laktat dehidrogenaz hızının da katalizlenmesini sağlar. Bunun sonucunda piruvat Krebs

döngüsüne ve dolayısıyla elektron taşıma sistemine giremeyerek birikir. Biriken pirüvatlar laktata dönüşmek üzere laktat dehidrogenaz enzimi ile laktata çevrilir.

Birçok kanser vakasında laktat dehidrogenaz enzim aktivitesinde oldukça yüksek bir artış görülür. Laktat üretiminin artmasıyla hipoksiye eşlik eden asidoz oluşarak böbrek foksionları zayıflamaktadır. Sonuçta kanserli hücreler tarafından yoğun miktarda tüketilen glikoz ile insülin hormonunun da işlevini yerine getiremez hale gelmesiyle kanser hastalarında hipoglisemi baş göstermektedir. (80-82)



**Şekil 9.** Kanser Metabolizmasında HIF-1 alfa'nın Fonksiyonları (81-88)'den Uyarlanmıştır

### 2.10.2. Kanser Hücrelerinde Protein-Lipit Metabolizmasındaki Değişiklikler

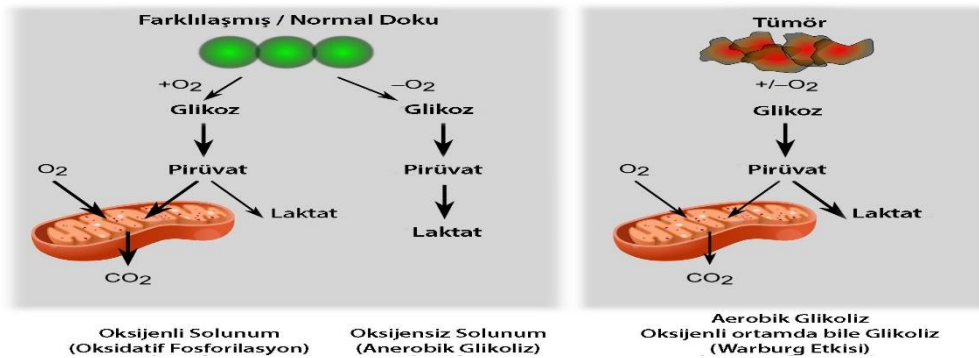
Kanser hücreleri karbohidrat metabolizması gibi protein ve lipit metabolizmasını da yoğunlukla kullanırlar. Proteinlerin diğer makro moleküllerden en büyük farkı yapılarında amin grubu azot içermeleridir. Kanser hücrelerinin enerji ve glikoz ihtiyacını karşıladığı glikolizi ve yetmediği durumlarda diğer makro moleküllerden glikoz kaynağı elde etmenin yolu olan glukoneogenezi sıklıkla kullandığı için vücutta yağ ve protein katabolizması daha aktifleşmiş durumdadır. (83) Tümör varlığında lipid metabolizmasında da ciddi değişiklikler oluşmaktadır. Kanser kaşeksisine bağlı kilo kaybının büyük bir bölümü lipitlerden sağlanmaktadır. Hipoglisemi, iştahsızlık, glukoz kullanımındaki bozukluklarla birlikte büyüme hormonlarının salınımıyla serumda lipid katabolizmasına bağlı olarak serbest yağ asidi miktarı artmaktadır. Ayrıca tümöral dokudan salgılanan yağ salınımını uyarıcı faktör ve tümör nekroz faktör alfa da yağ mobilizasyonu hızlandırır. Adipoz dokunun uyarılmasıyla artan serbest yağ asidi konsantrasyonu glukoneogenez yolağına geçerek glikoz elde edilir. Glukoz eksikliğine

bağlı gelişen hipoglisemi siklik AMP (c AMP) artışını indükleyerek adipoz dokudan serbest yağ asidi salınımını artırır. Kanserli dokularda normal hücrelerde olmayan fukolipid, dezmosterol gibi bir takım lipidler sentezlenir. (84)

### 2.10.3. Kanser Hücrelerinde Pentoz Fosfat Yolağındaki Değişiklikler

Hücrelerde glikozun glikoliz veya glukoneogenez dışında da katabolik sonları mevcuttur. Bu yollardan biri olan pentoz fosfat yolu veya diğer ismiyle heksoz monofosfat yolu hücrede sitozolde gerçekleşir. Pentoz fosfat yolu iki oksidatif geri dönüşümsüz tepkime ve devamında da şeker-fosfat dönüşümünü içeren geri dönüşümlü tepkimeden oluşmaktadır. Pentoz fosfat yolunun hücrede üç önemli görevi vardır. Bu enerji dönüşüm yoluyla amaç; hücrede biyokimyasal süreçlerde görevli indirgeyici bileşen olan NADPH'ın sentezini yapmak, nükleik asit biyosentezi için gereken riboz-fosfatları üretmek, üç veya yedi karbonlu şekerlerin birbirine dönüşümünü ve glikolizde kullanılabilir hale gelmesini sağlamaktır. Pentoz fosfat yolu eritrositlerde reaktif oksijen radikallerini glutatyon peroksidaz (GSH) yardımıyla temizler. GSH üretimi için gerekli NADPH ise pentoz fosfat yolunda üretilir. (85)

Pentoz fosfat yolunun varlığını ve NADP'yi keşfeden Otto Warburg 1930 yılında yaptığı çalışmalarla bu yolun glukoz oksidasyonunda önemli bir yol olduğunu ispatladıktan sonra Dickens ve arkadaşları ise bu yolu dahada aydınlatmıştır. Pentoz fosfat yolunda ribonükleotidler ve fosfopentozların sentezlenmesine ek olarak hücrel redoks dengesinde korunmasını sağlamaktadır. Kanser hücrelerinde DNA replikasyonunda kullanılan pentoz-fosfatların çoğunluğu bu yoldan sentezlenir. Pentoz fosfat yolu kanser hücrelerinde yalnızca gereken nükleik asit kaynağını sağlamaz ayrıca laktat kaynağını da oluşturur. Dahası yağ asitlerinin ve oksidatif strese karşı hücreyi koruyan NADPH'ın da asıl üretim merkezidir. (86-87)

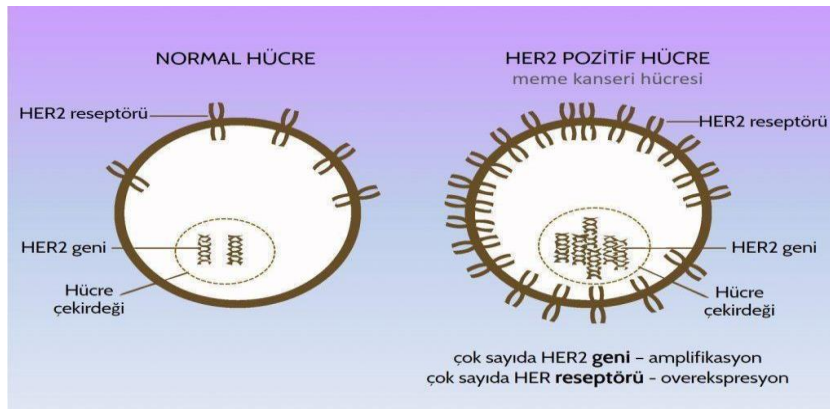


## Şekil 10. Warburg Etkisi-Normal ve Kanserli Hücrelerde Laktat Yolağı (89)

### 2.10.4. Kanser Hücrelerindeki Membran Modifikasyonları

Yazarlara göre, kanser aslında sadece metabolik yollarda meydana gelen modifikasyonlara bağlı kalmamakla birlikte aynı zamanda hücre membran kapasitesi ve yapısı da değişmektedir. Kanserde hücre membranında bir çok değişiklik oluşmaktadır. Bu değişikliklere değinilirse;

- Kanser hücrelerinde enerji ihtiyacının karşılanmasına yönelik olarak hücre membranında karbohidrat ve aminoasit taşınımı artmaktadır.
- Hücre zarında bulunan spesifik glikoproteinlerde değişiklik oluşarak yeni karbohidrat türevleri oluşmaktadır.
- İmmün sistemi zayıflatmak amacıyla doku uyumluluğu antijeni olan MHA kaybı gerçekleşir.
- Doku ve hücrelerin önemli bir bileşeni olan sialik asit konsantrasyonundaki artış sonucu hücre zarının negatif yükü artış gösterir.
- Onkojenik antijenlerden olan (karsinoembriyonik antijen) CEA oluşumu gözlenir.
- Hücre zarında bulunan büyüme faktörü veya hormonların reseptörlerinde farklılıklar oluşmaktadır. Örnek verilecek olursa, HER2 pozitif meme kanseri olan bireylerde insan epidermal büyüme faktörü reseptörü çok fazla miktarda sentezlenir. Bunun sonucunda hücrelerde büyüme ve proliferasyon gözlemlenir.



Şekil 11. HER2 + Meme Kanseri Hücre Zarında Artan HER Reseptörü (90)

- Kanser hücrelerinde hücre zarında bulunan bazı enzimlerinde yapısında değişiklik görülmektedir.
- Hücre zarında oluşan bir diğer değişiklik ise kanserli hücrelerin kontak inhibisyona uğrama özelliğini yitirmesidir. Normal hücrelerin belirli bir bölünme sınırı olup bu sınıra ulaştığında hücrelerin temas inhibisyonu ile bölünme durur. Ancak neoplastik hücreler ard arada ve birbiri üzerine kümelenerek bölünmeye devam ederler. (88)



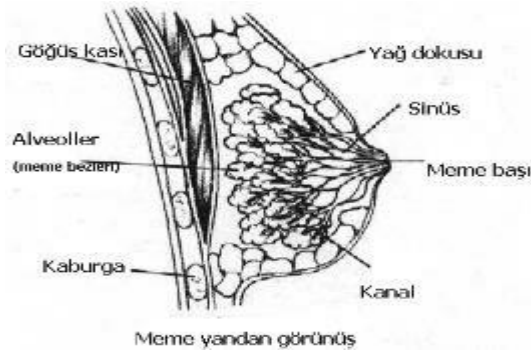
### **3. MEME KANSERİ**

#### **3.1. Meme Yapısı**

Meme, vücutta göğüs kafesinin üstünden koltuk altına buradan kaburgaların alt bölgesine kadar uzanan ve dokusunun büyük kısmı yağdan oluşan bir organdır. Meme dokusu duktuslar, lobüller, yağ ve bağ dokudan oluşmaktadır. Duktuslar, süt kanallarını oluştururken lobüller ise süt üretimini sağlayan bezleri oluşturmaktadır. Lobüller ve duktuslar arasındaki bölge ise yağ ve bağ dokulardan oluşmaktadır. Lobüller bir araya gelerek lobları meydana getirir. Lobüller birbiriyle süt kanalları yoluyla bağlantı kurmaktadır. Genel bir ifadeyle meme dokusu; süt bezleri( lobüller), süt kanalları(duktuslar), kas dokusu, sinir bağlantıları, yağ ve bağ doku, kan damarlarından



meydana gelmektedir. Meme gelişimi ve işleyişi başlıca östrojen-progesteron hormonları yoluyla düzenlenmektedir. (93)



Şekil 12. Memenin Genel Anatomisi (93)

### 3.2. Meme Kanseri ve Fizyolojik Alt Tipleri

Meme kanseri, memeyi meydana getiren hücrelerin memenin farklı bölgelerinde kontrol dışı çoğalarak vücudun başka organlarına yayılması ile sonuçlanan bir kanser türüdür.

Meme kanseri lobüller karsinom, duktal karsinom ve inflamatuvar karsinom olarak üç farklı tipte bulunmaktadır. Meme kanserinin yaklaşık bir ifadeyle %70 kadarını duktal karsinomlar, yine yaklaşık olarak %30 kadarını lobüller karsinomlar oluştururken çok nadir olarak %1-2 oranında inflamatuvar karsinom gözlenmektedir.

Meme kanserinin lobüller karsinom tipi, İnvaziv lobüller karsinom ve İn-situ lobüller karsinom (LCIS) olarak ikiye ayrılmaktadır. Meme kanserinin duktal karsinom tipi ise, İnvaziv duktal karsinom ve İn-situ duktal karsinom (DCIS) olarak ikiye ayrılmaktadır. (91-93)

*İn-situ* meme kanserleri invaziv özellik göstermezler. *İn-situ* meme kanserinde kanser hücreleri bir bölgede sabit olup memenin herhangi bir bölgesine yayılım göstermezler. *İn-situ* duktal karsinom (DCIS) yalnızca süt kanalları içinde bulunmaktadır. *İn-situ* lobüller karsinomun (LCIS) bulunduğu bölge ise yalnızca süt bezleriyle sınırlıdır.

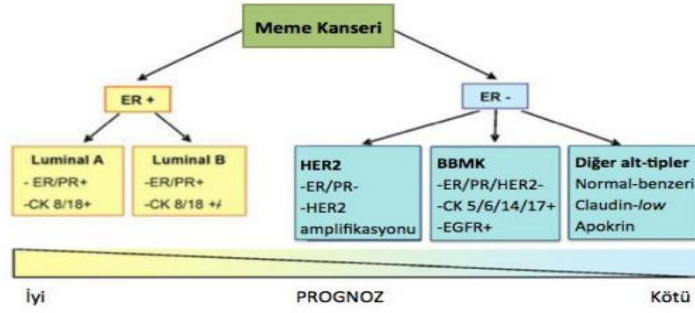
İnvaziv meme kanserleri ise bulunduğu bölgede büyüyerek memenin çevre dokularına dağılabilen kanser tipleridir. İnvaziv duktal karsinomlar memede süt kanallarından başlayarak bütün memeye dağılırlar. İnvaziv lobüller karsinomlarda neoplastik doku süt bezlerine lokalize olup daha sonra tüm meme dokusuna yayılım gösterir.

İnflamatuvar meme karsinomunda (İMK) memede şişkinlik, kızarma, enflamasyon, deride kalınlaşma ve enfeksiyon görülmektedir. Tedavi edilmesi oldukça güç olup agresif bir prognoz sergiler. İnflamatuvar meme kanserinde memede kitle mevcut olmayıp meme derisi tutulumu vardır. Memenin pütürlü görünümünün nedeni meme derisinin lenfatiklerinin kanser hücreleriyle kaplanmasından oluşmaktadır. (93)

Duktal karsinomların ileri evrelerinde meme kanseri hücreleri ilk olarak lenf damarlarına oradan koltuk altındaki lenf nodüllerine yayılırlar. Yayılım ilerledikçe kanser meme çevresi dışında farklı organlara yayılarak kemik, akciğer, karaciğer gibi organlara metastaz yapmaktadır. Meme kanserinde en sık metastaz gelişen organlar sıralamasında kemik metastazı %71 ile ilk sırada, akciğerler %69 ile ikinci sırada ve karaciğer %49 ile üçüncü sıradadır. (93-92)

### **3.3. Meme Kanseri ve Moleküler Alt Tipleri**

Meme kanseri, gün geçtikçe artan ve tüm dünyayı ilgilendiren bir sağlık problemi olmasından ötürü tedaviye cevap verme ve hastalığın klinik seyri açısından oldukça kompleks ve homojen olmayan bir hastalıktır. Meme kanseri tanısı almış hastaların fizyolojik, patolojik ve moleküler alt tiplerinin belirlenip buna uygun spesifik tedavinin uygulanabilmesi için meme kanserinin hangi subtipe ait olduğu belirlenmelidir. Klinik vakaya ait meme kanseri hücrelerinin sellüler görünümü, taşıdığı mutasyon tipi, gen profilleri ve histolojik özellikleri incelenerek meme kanserinin bulunduğu kategori belirlenmektedir. (94-97)



**Şekil 13.** Meme Kanserinin Moleküler Alt Tipleri ve Prognoz Şiddetleri (97)

Meme kanseri moleküler alt tiplerine göre incelendiğinde östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), bazı sitokeratinler (CK14 gibi), p53, Ki67 ve insan büyüme faktörü-2 reseptörüne (HER-2) ait belirteçlerin ekspresyonu temel alınır. Bu bilgiye göre meme kanseri moleküler olarak Luminal A, Luminal B, Bazal benzeri, Normal meme benzeri (Triple/Negatif), Klaudin düşük, Apokrin ve HER-2 olarak farklı tiplere ayrılmaktadır. Bu gruptan farklı olarak triple negatif meme kanseri olarak isimlendirilen bazal benzeri meme kanseri ise ER-PR-HER2 belirteçleri bakımından negatif bir grubu temsil eder. (95-96)

**Tablo 4.** Meme Karsinomunda Gen Ekspresyon Bazlı Kategorileşme (96)

Luminal A	ER ve/veya PR(+) ve HER-2 (-) Ki67 < %14
Luminal B	ER ve/veya PR(+) ve HER-2 (-) Ki-67 ≥ %14
Bazal -like	ER/PR/HER-2 (-)
HER-2	ER/PR(-) ve HER-2(+)
Normal meme benzeri	Non-epitelial hücre gen ekspresyonu (+)

### 3.4. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi

Dünya çapında ve Türkiye’de kadınlar arasında görülen en yaygın malign kanser türü meme kanseridir. Meme kanseri kadınlarda kanser teşhislerinin %33’ünden ve kanserden ölümlerin %22’sinden sorumludur. Meme kanseri dünya çapında mortalitesi ve yayılımı akciğer kanserinden sonra en yüksek kanser türüdür. Dünya genelinde meme kanseri insidansı yaşam tarzı, çevre kirliliği, genetik yatkınlıklar gibi sebeplerle ülkeden ülkeye farklılıklar teşkil etmektedir. (69)

Yapılan araştırmalara göre, yaşamlarının herhangi bir evresinde yaklaşık olarak her 10 kadından biri meme kanserine yakalanma riski altında olup teşhis alan kadınların ise üçte birinin meme kanseri sebebiyle hayatını kaybettiği bildirilmiştir. Dünya Sağlık rgt'nün 2002 yılında yayınladığı istatistiklere göre dünya genelinde teşhisi yeni tanımlanmış 1.150.000 meme kanseri vakası alınmış olup bu vakaların 2020 yılında 2.500.000 meme kanseri vakası olacağı tahmin edilmiştir. Meme kanserinin ülkemizdeki yaygınlığı giderek artış göstermektedir. Öyle ki, 2007 yılında yapılan kanser kayıtlarına göre tanı almış vaka sayısı 44,253 kişiyken, 2012 yılında alınan verilere göre bu sayı 51.990 kişiyi bulmuştur. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de meme kanserinin insidansı bölgeden bölgeye farklılık göstermektedir. Bu insidans ülkemizin doğu bölgelerinde 100.000'de 20 iken, batı bölgelerinde 100.000'de 50 oranında bir yayılıma sahiptir. (70-71)

### **3.5. Meme Kanserinin Etiyolojisi**

Meme kanserinin tam olarak hangi nedenlerle oluştuğu bilinmemekle birlikte meme kanseri oluşumunu tetikleyici birçok unsur mevcuttur. Genel olarak risk faktörleri üç ana gruba ayrılmaktadır.

#### **3.5.1. Meme Kanserinde Değiştirilemeyen Risk Etkenleri**

- Yaş: Dünya çapında her 8 kadından birinde meme kanseri görülmektedir. Yaş ilerledikçe rölatif risk artmaktadır. Meme kanseri hastalarının  $\frac{3}{4}$ ' postmenapozal dönemde teşhis alırken,  $\frac{1}{4}$ ' premenapozal dönemde teşhis almaktadır.
- Cinsiyet ve Etnik Irk: Kadın cinsiyetine sahip olmak en önemli risk etkeni olup 100 kat artmış riski belirtir. Meme kanseri beyaz ırkta siyahi ırka göre daha fazla görülmektedir. Ancak siyahi ırkta meme kanserinin invaziv ve kötü prognoz sergileyen tipi görülmektedir.

- Genetik Etkenler: Meme kanserinde genetik faktörler diğer risk faktörlerinin %5-10'unda etkilidir. *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonu, p53 gen mutasyonu, *PTEN* mutasyonu meme kanserli hastalarda sıkça görülmektedir. Bu genlerden *BRCA1* geni otozomal baskın gen olup 17.kromozom üzerinde lokalizedir. *BRCA2* geni ise 13.kromozomda bulunmakta olup bu iki genin mutasyonu meme ve over kanseriyle çok yakın ilişkilidir. *BRCA1* geninde mutasyon taşıyan bir kişinin yaşamı süresince meme kanserine yakalanma olasılığı %85, *BRCA2* mutasyonu taşıyan bireyin yaşamının herhangi bir evresinde meme kanserine yakalanma ihtimali ise %45 civarındadır. (98-101)
- Ailede Meme Kanseri Hikayesi: Ailede birinci derece akrabalarda meme kanseri öyküsü olan kişiler %15 risk altındadır. Bir ailede aynı çeşit kanserin görülmesi halinde kalıtsal kanser, farklı tip bir kanserin görülmesi halinde kanser ailesi tanımı yapılır.
- Kişisel Kansere Geçmişi: Bireyin yaşamında daha önceden meme kanseri tanısı almış olması diğer memede kanser oluşma olasılığını yılda %0.5-1 artırır. Eğer kişi over ve endometrial kanser tanısı almışsa meme kanseri gelişme riski de 2 kat artar.
- Menarş Düzeni-Menopoz Yaşı: 12 yaşından önce menarş geçirmiş olmak meme kanseri için önemli bir risk faktörüdür. Geç dönemde menarş geçirilmesi doğurgan dönemin geç başlaması ve dolayısıyla östrojene daha az maruz kalınacağı için meme kanseri için daha az risk oluşmaktadır. Meme kanseri bileteral olmaya yatkın olup menopoz dönemi öncesi veya sonrasında gelişebilir. 50 yaşından daha geç menopoza giren kadınlarda daha uzun süre östrojen üretiminden dolayı meme kanseri riski 2-4 kat artış gösterir. Menopoz yaşı 45 yaş altında olduğunda over ve meme kanseri riski azalmaktadır.
- Doğum Yaşı- Laktasyon: Doğum yapmış kadınların doğum yapmamış kadınlara kıyasla meme kanserine yakalanma ihtimalinin daha düşük olduğu bildirilmiştir. Laktasyon döneminin uzunluğunun meme kanserine yakalanma riskini azaltması yönünde bulgular mevcut olup postmenapozal kadınlar arasında yapılan meme kanseri araştırmasında tam bir hamilelik geçirmiş ve 12 ay emziren kadınlarda meme kanseri insidansının daha az olduğu tespit edilmiştir. (91-92-98)

### 3.5.2. Meme Kanserinde Çevresel Risk Faktörleri

- Ekonomik Gelir Düzeyi: Yüksek gelir düzeyi meme kanseri için 2 kat artmış risk ifade etmekle birlikte bu parametre reproduktif etkenlerle (menarş yaşı, doğum yapma, laktasyon vb.) birlikte şekillenmektedir.
- Radyasyona Maruziyet: Memenin aktif olarak gelişim gösterdiği 10-14 yaş döneminde radyasyona maruz kalma ilerleyen yaşlarda meme kanserini tetiklemektedir. Ayrıca bireyin 30 yaşına kadar olan döneminde toraks bölgesine uygulanan radyasyon terapide meme kanseri oluşumunu uyarmaktadır.
- Alkol kullanımı: Yakın zamanlarda yapılan toplum temelli bir çalışmada alkol kullanımının kanda östradiol seviyesini yükselttiği ve bu nedenle alkol kullanan kadınlarda östrojen pozitif meme kanseri gelişme riskinin daha fazla olduğu görülmüştür.
- Fiziksel Aktivite Sıklığı: Yoğun egzersiz yapan bireylerde ve sporcularda fiziksel aktiviteler anovulatuvar döngülerin sıklığını artırarak meme kanseri riskini azaltmaktadır.
- Beslenme Düzeni-Obezite: Bazı çalışmalar uzun süre yüksek miktarda yağ içeren diyetle beslenmenin kanda serum östrojen düzeyinin yükselmesine sebep olarak meme kanserini tetiklediğini öne sürmektedir. Karın bölgesindeki yağlanmanın ve kısa süre içerisinde 25 kilodan fazla alınmasının da meme kanseri oluşum riskini artırdığına yönelik tartışmalar bulunur. Yakın geçmişte yapılan çalışmalarda diyetle birlikte D vitamini alınımının meme kanserine karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir. (91-98-101)

### 3.5.3. Meme Kanserinde Hormonların Etkisi

- Östrojen: Meme kanserinin etiyolojisinde en önemli faktörü östrojen hormonu sağlamaktadır. Çevresel veya reproduktif risk faktörlerinin çoğunluğu doğrudan veya dolaylı olarak östrojen etkisine bağlıdır. Meme kanserinde hormonlar doğrudan mutajenik veya toksik etki göstermezler. Ancak hormonlar hücrelerde bulunan hormon reseptörlerini ve büyüme faktörlerini uyararak hücre bölünmesi ve büyümesini tetiklemektedir. İnsanda over ve memeler hormonların kontrolünde olan organlar olmasından dolayı bir organın fonksiyonunu ve

gelişimini etkileyen hormonun aşırı sekresyonu o bölgede invaziv hücre proliferasyonunu artırarak kanser oluşumunu başlatmaktadır.

- Androjen: Epidemiyolojik ve klinik araştırmalara göre androjenlerin postmenapozal kadınlarda meme kanseri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Menapoz sonrası kadınlarda serum östrojen seviyesi belirgin olarak düşüş sergilemektedir. Ancak serum testesteron ve androstenedion düzeyleri yüksektir. Dolaşımdaki androjenler memede tek adımla östrojene dönüşebildiği için östrojenin ana kaynağını meydana getirirler. (100)
- Oral Kontraseptifler: Etkileri tam olarak kesin olmamakla birlikte meme kanseri riskini artırdığına yönelik raporlar bulunmaktadır. İçeriğinde östrojen bulunan oral kontraseptiflerin uzun süre kullanımı ovulasyonu düzenlerken aynı zamanda meme hücrelerinin büyümesini ve mitojenik büyüme faktörlerinin salgılanmasını da uyarmaktadır. Oral kontraseptif kullanımı ile hormon reseptör meme kanseri arasında ilişki vardır.
- Hormon Yerine Koyma Tedavisi: Erken menapoz tehlikesi nedeniyle uzun süre boyunca hormon preparatları kullanımı ile meme kanseri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Ancak hormon tedavisi almayarak menapoz giren kadınlarda ise erken yaşta kalp ve iskelet hastalıkları meydana gelmektedir. Hormon replasman tedavisi uygulanması gereken hastalarda düşük doz ve kısa süre kullanım meme kanseri riskini düşürmektedir. (98-99)

### **3.6.Meme Kanserin Klinik Belirtileri**

Tüm kanser türlerinde olduğu gibi meme kanserinde de belirti ve bulguları erken evrede yakalayıp spesifik tedavinin uygulanması tedavinin başarıyla sonuçlanması için gereklidir. Meme kanserinde en sık görülen belirti memede ele gelen şişlik ve kitledir. Genel olarak memede kanser şüphesi oluşturan belirtiler arasında; gözle görülen meme boyutunda ve görünümünde değişiklik, meme çevresinde kızarıklık, şişlik ve çöküntü, renk değişikliği, akıntı ve ağrı oluşması, koltuk altında meydana ağrılı veya ağrısız lezyonlar olarak sayılabilir. (91-99)

### **3.7. Meme Kanserinde Evrelendirme**

Tüm kanser tiplerinde tümörün hangi evrede olduğunun ve ne kadar yayılım gösterdiğinin tespit edilebilmesi için evrelendirme yapılır ve çıkan sonuca uygun tedaviye başlanır. Meme kanseri başladıktan ortalama olarak 5-6 yıl içerisinde tümör çapı 1 cm çapına gelinceye çok az belirti görülmektedir. Meme kanserinde evreleme için tümör çapı, koltuk altında bulunan lenf bezi sayısı ve metastaz durumu belirlenerek durum sonuçlanmaktadır. Meme kanserinde 4 evre bulunur. İlk 3 evre erken dönem meme kanseri olarak kabul edilmektedir. (100)

- Evre 0:Duktal Karsinom *İn-situ* veya Lobüler Karsinom *İn-situ* şeklinde görülmekte olup yayılım gelişmemiştir.
- Evre 1:Neoplastik hücrelerin oluşturduğu tümör çapı 2 cm'den küçük olup lenf nodüllerine geçmemiştir.
- Evre 2:Tümör çapı 2 ile 5 cm arasındadır. Çevresindeki lenflere dağılım göstermiş olabilir veya olmayabilir.
- Evre 3:Tümör 5 cm'den fazla bir büyüklüğe ulaşmış olup lenf nodlarına yayılmıştır.
- Evre 4:Tümör çevresindeki doku ve organlara yayılım gösterdikten sonra vücudun diğer organlarına metastaz yapmıştır.

Meme kanserinde risk ve evrelendirmede kullanılan bilgisayar modellemeleri arasında Gail modeli, Claus modeli, BRCA pro modeli en sık kullanılan analiz yöntemleridir. (98-100)

### **3.8. Meme Kanserinde Teşhis Yöntemleri**

Bütün kanser tiplerinde olduğu gibi meme kanserinde de hastanın erken tanı alması tedaviden alacağı sonucun başarısı açısından oldukça önemli bir etkidir.. Evre 0'da teşhis alan bir meme kanseri hastası ile Evre 3'te teşhis alan meme kanseri hastası arasında tedaviden elde edeceği başarı oranı ve hastalığın bir daha nüks etmeme oranı arasında büyük fark vardır.

Meme kanserinde erken teşhisi kolaylaştıran yöntemler arasında kendi kendine meme muayenesi, senelik mamografi ve doktor muayenesi bulunur. Meme kanserinde



teşhis görüntüleme sistemleri ve klinik muayeneler yardımıyla konur. Görüntüleme sistemlerinde en sık kullanılanlar mamografi, ultrasonografi ve manyetik rezonans görüntülemedir. Dünya genelinde mamografi ile senede bir kez yapılan meme kanseri taramalarının erken teşhiste payı büyüktür. 1960'lı yıllarda mamografi ile meme kanseri taramasına ilk başlandığı yıllardan günümüze kadar yapılan birçok araştırmada yüksek risk grubunda olan bireylerde manyetik rezonans görüntülemenin, mamografi ve ultrasonografiye göre hassasiyetinin ve seçiciliğinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Öyle ki yüksek maliyetli olmasına karşın manyetik rezonans görüntülemenin duyarlılığı %70-100 iken mamografinin duyarlılığı %13-40 arasındadır. (98)

Risk grubuna sahip kadın popülasyonunda meme kanseri tabanlı mamografi taramaları için başlangıç yaşı, ailesel meme kanseri taşıyan vakalarda 40 yaş iken, BRCA gen mutasyonu olmayan vakalarda 30 yaş alt sınır olarak kabul edilmektedir. Çalışmalara bağlı olarak 20'li yaşlarda yüksek doz mamografi etkisine maruz kalmamak için bu yaşlarda mamografik tarama tavsiye edilmemektedir. Mamografi ile varlığı tespit edilemeyen tümörlerde ultrasonografi veya manyetik rezonans ile görüntüleme ve işaretleme yapılır. Şüpheli durumlarda biyopsi alınarak kesin tanı koyulur. (91-99)

### **3.9.Meme Kanseri Tedavi Metotları**

Meme kanseri teşhisi alan hasta için tedavide uygulanacak prosedür vakanın yaşı, klinik seyri, tümör boyutu, tümör tipi, kanserin bulunduğu evreye göre karar verilir.

#### **3.9.1.Cerrahi Tedavi**

Meme kanserinde tedavi seçeneklerinden en sık uygulanan yöntem olmakla birlikte hastalığın evrelendirilmesi ve kontrol altına alınmasında da kullanılmaktadır. Güncel olarak meme cerrahisinde daha sık kullanılan yöntem olan meme koruyucu cerrahide, tümör etrafındaki dokuyla beraber uzaklaştırılır. Meme kanserinde uygulanan cerrahi tedavide mastektomi, tümör eksizyonu ve lumpektomi yöntemi tümörün çapı ve bulunduğu lokasyona göre uygulanan cerrahi yöntemler arasındadır. Meme kanserinde Evre 2'ye kadar olan hastalarda meme koruyucu cerrahi ile birlikte kemoterapi ve radyoterapi sıklıkla kullanılmaktadır. Tümör çapının 2 cm'den büyük olduğu durumlarda

meme ise mastektomisi olarak adlandırılan memenin ve koltuk altında bulunan lenf nodülleriyle birlikte çıkarılır. (99)

Mastektomi yönteminin bir dalı olan basit mastektomide meme tümüyle birlikte çıkarılırken koltuk altındaki lenf dokusuna dokunulmamaktadır. Radikal mastektomi işleminde ise memenin tümü ve koltuk altındaki lenf nodülleri tamamen çıkarılır. Lumpektomi işleminde ise yalnızca memedeki tümör kitlesi ve etrafındaki dokular uzaklaştırılır sonrasında radyoterapi ile desteklenir. Eğer cerrahi işlem sonrasında radyoterapi yerine kemoterapi uygulanacaksa radyoterapi en son işlemde tercih edilir. (91)

### **3.9.2.Radyoterapi Tedavisi**

Radyoterapi cerrahi işlem sonrasında meme çevresi ve koltuk altına verilen ışınlarla cerrahiden arta kalan olası kanser hücrelerini yok etmeyi amaçlamaktadır. Hastalığı tekrar etme riski bulunan olgularda ve memenin geriye kalan kısmını korumak içinde uygulanmaktadır. (91)

### **3.9.3.Kemoterapi Tedavisi**

Meme kanseri birçok faktöre dayalı bir hastalık olmasından dolayı kemoterapi yaklaşımlarında hastanın genetiği, endokrin durumu ve tümör içeriğine uygun tedavinin yapılması kaçınılmazdır. Bu durumda kişiye ve tümöre özgün tedavi ve doz seçimi için farmakogenetik yaklaşım gerekmektedir. Meme kanserinde ilaç yoluyla tedavi başlığı altında kemoterapi, hormon tedavisi, moleküler yaklaşımlar bulunur. Meme kanseri taşıyan olgularda eğer kanser metastaz yapmadıysa cerrahi işlem sonrasında iyileşmeye yardımcı ve yeni kanser oluşumunu engelleyen koruyucu tedavi olarak adlandırılan ‘adjuvant kemoterapi’ uygulanmaktadır. Burada temel amaç mikrometastazları en aza indirmek ve kanseri tam olarak iyileştirmektir. (92)

Yakın geçmişte paklitaksel, dosetaksel gibi kemoterapik ajanların kullanımı tedaviden elde edilen başarıları artırmıştır. HER2 antijeni bakımından pozitif olgularda

kemoterapi ilaçlarına monoklonal antikor olan transtuzumabın entegrasyonu başarıyı kuvvetlendirmiştir. (98)

Tamoksifen meme kanseri tedavisinde etkin bir şekilde kullanılan seçici bir östrojen reseptör uyarlayıcısıdır. Özellikle östrojen reseptörü pozitif meme kanseri tiplerinin endokrin tedavisinde kullanılan başarılı bir ilaçtır. Tamoksifen kullanımında hormonal ilaç etkinliğini artırmak amacıyla farmakogenetik bir yaklaşım sergilenmelidir. (98)

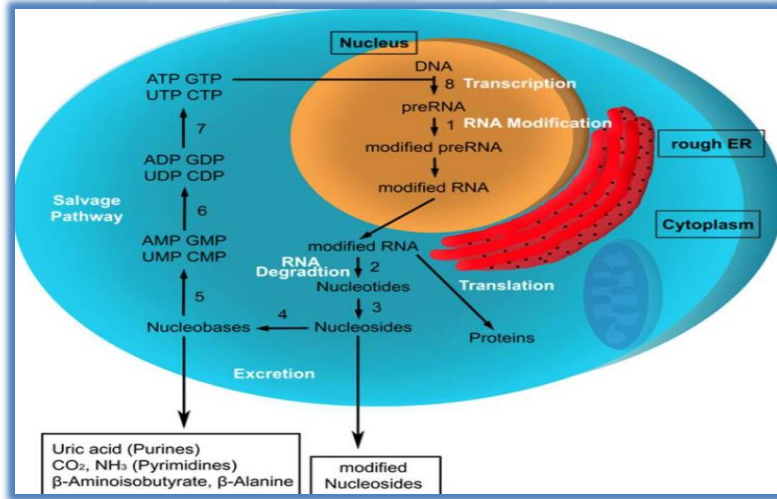
Meme karsinomlarının ileri evrelerinde kullanılan güçlü bir kemoterapötik ajan olup erken evrelerde de cerrahi tedaviye destek olarak kullanılan ilaç gruplarından biridir. Tamoksifen kullanımında hastaya kullanılan dozun miktarı önemli olduğundan ciddi yan etkileri değerlendirmek gerekir. Onkologların en iyi tavsiyesine göre tamoksifen'in önerilen günlük miktarı 20-40 mg/gün düzeyindedir. Tamoksifen ile yapılan deneylerde, tamoksifen kullanan meme kanseri grubu kullanmayan gruba göre hastalığın seyrini düzeltme yönünden daha başarılı olduğu görülmüştür. Meme kanseri hastalarında tamoksifen ile kemoterapi beş sene sürmekte ve ilave olarak beş sene de ikame doz uygulanmaktadır. Tamoksifen kullanılan hastalarda gözlemlenen ilgi çekici bir detay ise, tamoksifenin kısa süreli kullanımlarında (1-2 yıl) tedavi bırakıldığında kanserin tekrar nüksetmesine ve üstelik ilaca karşı direnç geliştirilmesine yol açmasıdır. Bu mekanizma farkedildikten sonra tamoksifen tedavisi 5 yıl ve üzeri devam ettirilmiştir. Tamoksifen ile tedavi edilen meme kanseri hastalarında tekrar hastalığın oluşma riski %30 ile %40 azalırken, meme kanserinden kaynaklı ölümlerin ise %25 oranında azaldığı tespit edilmiştir. (91-102)

### **3.10. Kanser Hücrelerinde Farklılaşmış RNA Metabolizması**

Kanserde hücrel metabolizmanın tekrardan düzenlenmesi hücrenin onkogenik değişiminin bir sonucu olarak bilinmektedir. İnsan meme kanseri hücrelerinde ciddi oranda bir heterojenite mevcut olup bu heterojenitenin sonuçları hücre düzeyinden organ ve metabolizma düzeyine kadar yayılmıştır. Bu heterojeniteyi hedef alan metabolomik teknoloji sayesinde genlerde oluşan mutasyonlar, RNA ekspresyon seviyeleri, polimorfizmler, protein ekspresyonları, metabolizma yan ürünleri gibi pek çok metabolik parametre kapsamlı olarak tespit edilmektedir. (103)

Kanser hücrelerinde sitogenetik mekanizmanın ve metabolik yolların tekrar şekillenmesi, tahminen onkogenезin bir sonucu olarak görülür. Tekrar düzenlenen tümör metabolizmasının karakteristik yönleri, insan kanserlerinde terapötik hedeflere yol göstermektedir. İnsan vücudunda farklı fonksiyonları olan birçok metabolik yolağın ve genetiğinin aydınlatılmasıyla metabolitlerin ve küçük ara moleküllerin kanserogenezdeki spesifik etkisinin anlaşılmasını daha da kolaylaştırmıştır. Dünya genelinde Kanser Genom Atlası (TCGA) çalışmalarına veri sağlayan binlerce kanser hastasından birçok farklı kanser tipi üzerinden elde edilen data lar tümör hücrelerinin genetiğini ve geçirdiği metabolik değişimleri göstermiştir.

Meme kanserinin heterojen yapısının belirlenmesinde güncel ve sistematik birçok teknoloji kullanılarak yapılan analizlerin iskeletini metabolomik, proteomik, genomik gibi 'omik' alanlar tamamlar. Birçok biyolojik sistemde eksojen ve endojen metabolitin izlenmesinde ve değerlendirilmesinde kullanılan yegane alan metabolomiktir. (109)



**Şekil 14.** Hüresel RNA Metabolizması-Modifiye Nükleozitlerin Oluşumu (103)

Bütün hastalıklarda olduğu gibi kanserde çok şiddetli metabolik bozuklukların olduğu, enzim aktivitesi, hücre turnover hızı, DNA ve RNA ekspresyonları üzerinde spesifik sonuçlar gösterir. Metabolik programlama üzerinde oluşan yeniden düzenleme

ile nükleozid sekresyonunda da değişiklikler oluşmaktadır. Değişmiş nükleosidler kanser hastalarının idrarlarında, hücreler arası sıvılarında veya karsinojenik bölgeden alınan hücrelerin süpernatantlarında tespit edilmiştir.

Biyolojik sistemlerde birçok önemli metabolik yolak birbiriyle ilişkilidir. Kanser oluşumuyla bazı metabolizma akıllarında oluşan bozulmalar etkileşimde olduğu diğer yolakları da etkilemektedir. Bu yolaklardaki temel bileşiklerin ve onların yan ürünlerinin metabolomik analizi, kanser teşhisindeki muhtemel moleküllerin çeşitliliği ve sınıflandırılması için büyük bir anlam taşır. (103-104)

### **3.11. Modifiye Nükleozidler**

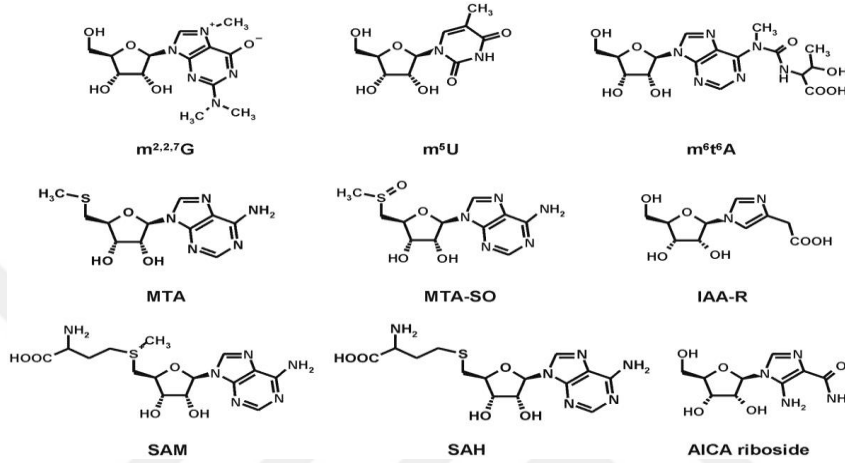
Bir nükleobaza beta-glikozidik bağ ile bir riboz parçasının eklenmesiyle oluşan yapı nükleozit olarak adlandırılır. RNA bir kısım ortak nükleozite ve modifiye nükleozite sahiptir. Adenozin (A), guanozin (G), sitidin (C) ve üridin (U) ortak nükleositleri meydana getirirken ek grupların eklenmesi, metilasyon, indirgeme, hidroksilasyon gibi mekanizmalarla modifiye edici enzim kompartmanları yardımıyla modifiye nükleositler oluşmaktadır. Polinükleotit molekülünde oluşan modifiye nükleositler üzerinde gerçekleşen süreçler post-transkripsiyonel düzeydedir. Nükleositlerin modifiye nükleositlere dönüştürülmesindeki asıl amacın, biyokimyasal mekanizmalarda RNA'nın etkinliğinin, bütünlüğünün ve aktivitesinin korunması olduğu tahmin edilmektedir. (104-106)

Güncellenen verilere dayanarak ökaryotlarda 100 civarında modifiye edilmiş nükleosit formunun taşıyıcı RNA (tRNA), mesajcı RNA (mRNA), ribozomal RNA (rRNA) ve küçük çekirdek RNA (snRNA) gibi farklı RNA çeşitlerinde oluştuğu bilinir. (104-103)

Post translasyonel RNA yıkımı esnasında polinükleotit molekülleri enzimatik olarak parçalara ayrılır. Polinükleotitlerin hidrolizi sonrasındaki süreçte defosforilasyonla fosfat kısımları da uzaklaştırılır. Ortamda bu işlemde geriye ortak nükleozitler olan G,U,A ve C kalır. Hücre içinde RNA'yı yeniden kurtarma yoluyla ortak nükleositler tekrardan fosforile olarak kendilerine karşılık gelen trifosfatlara dönüşerek yapılanma sağlanmış olur. Ancak bu yolak modifiye nükleozitler için kapanmıştır. Bunun sebebi ise modifiye nükleozitler için gereken özel fosforilazların olmamasındandır. Yeniden kurtarma

yolağına girmeyen modifiye nükleozitler metabolik son ürün olarak hücrelerden kan dolaşımına buradan da idrara gönderilerek vücuttan atılır. (103-108)

Kanserde modifiye nükleosit seviyelerinde ciddi bir değişiklik olup RNA metabolizması bozulmuştur. Neoplastik dokuda t-RNA devir oranı sağlıklı dokudaki t-RNA devir oranına göre çok fazla olduğu saptanmıştır. Bunun sonucunda modifiye nükleositler daha hızlı ve fazla miktarda parçalanarak atılmaktadır. (103)



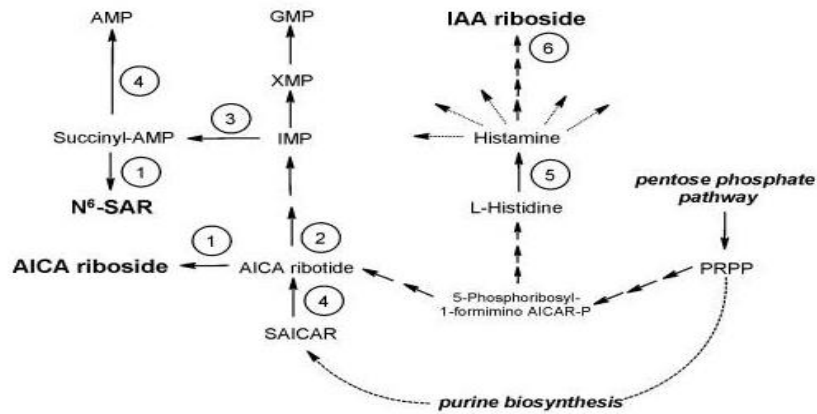
**Şekil 15.** Bazı Modifiye Nükleozid Çeşitleri (103)

Son zamanlarda kanser metabolitlerine dayalı çalışmalarda meme kanseri için duyarlılığı yüksek ve karakteristik biyobelirteçler tanımlamak için kanser teşhisli hastalardan alınan kan, idrar ve meme kanseri hücre hatlarının süpernatantları araştırılmaktadır. Kanda, idrarda ve meme kanseri hücre hatlarının süpernatantlarında değişen modifiye nükleozit seviyelerinin analizinden yararlanarak kanserin erken teşhisi için kullanılacak biyobelirteçler üzerine yapılan çalışmalar umut vericidir. Bu nedenle genomik ve proteomik verilerin yardımıyla metabolomik yönden meme kanseri için spesifik biyobelirteçlerin tanımlanması meme kanserinin erken evre teşhisinde oldukça büyük bir önem taşır.

Hücre kültürü süpernatantlarından elde edilen metabolik profillemeler kan ve idrardan elde edilen verilere kıyasla daha avantajlıdır. Çünkü kan dolaşımı boyunca enzimatik durumların oluşması idrarda ise atılım ve takip eden işlemler sırasında bakteri ve çeşitli doku metabolitlerini de analiz edilecek sıvıda içermesinden dolayı tam olarak yeterli hassasiyette analiz gerçekleştirilemez. Bu yüzden hücre kültürü

süpernatantlarından elde edilecek lizatların metabolomik yönden profillenmesi hücrel kaynaklı değişmemiş metabolit sonuçları elde etmeyi mümkün kılmaktadır. (104)

Meme kanseri hastalarının idrarlarında yüksek miktarda 1-metilinosin ve N,2 N,2-dimethylguanosine (m, 2 2 G) modifiye nükleositlerine rastlanması metabolitlere dayalı çalışmaları güçlendirmektedir. Ayrıca lösemi çeşitlerinde ve akciğer karsinomlarında da modifiye nükleositlerin kan ve idrarda artan oranları dikkat çekmektedir. (104-105)



Şekil 16 RNA Metabolizmasıyla İlişkili Yolaklar (104)

Tümör mikro çevresinin parankim ve stroma hücrelerinden veya kanserli dokuya tepki gösteren bağışıklık hücrelerinden birçok metabolit üretilmektedir. Bu üretilen metabolitler tümör biyobelirteçleri olup, metabolitlere dayalı işlemlerin biyokimyasal analizlerinde önemlidir. Tümör biyobelirteçleri olarak tanımlanan bileşikler arasında proteinler veya RNA-DNA temelli bileşikler olabilir.

Meme kanserinin prognozunda tümör bağlantılı antijenlerden CA (Karbohidrat antijeni) ve CEA (Karsinoembriyonik antijen) tümör biyobelirteci olma konusunda tartışmalı sonuçlar göstermektedir. Bundan dolayı meme kanserinin teşhisi veya tedavisinde tavsiye edilmemektedir. Bu yüzden meme kanserinin tanısında kullanılmak üzere daha özel biyobelirteçleri bulmak için yapılan çalışmalar modifiye nükleositler alanına yoğunlaşmıştır. (108)

Modifiye nükleositlerin kan, idrar ve meme kanseri hücre hatlarının süpernatantlarından elde edilen verilere göre tanımlanması ve nicelenmesinde birçok araç kullanılmaktadır. Bu araçlar arasında; UV teknikleri, Matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF), kapiller elektroforez (CE), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografisi-uçuşzamanlı kütle spektrometresi (LC/Q-TOF/MS), elektrosprey iyonizasyon iyon kapanı kütle spektrometresi (ESI-MS) gibi teknikler kullanılarak modifiye nükleosit yapılarının tanımlaması sağlanır. (104)

**Tablo 5.** Modifiye Nükleosid Örnekleri (104-108)

HPLC Ayırılmasında Standart Olarak Baz Alınan Modifiye Nükleosid Örneklerinden Bazıları		
• Cytidine	• N6-methyladenosine (m6A)	• 3-methyluridine (m3U)
• uridine (U)	• inosine (I)	• 1-methylguanosine (m1G)
• adenosine (A)	• 1-methylinosine (m1I)	• 5-methyluridine (m5U)
• 1-methyladenosine (m1A)	• guanosine (G)	• AICA-Riboside
• Nicotinamide	• 5,6-dihydrouridine (DHU)	• Adenylosuccinic acid
• $\beta$ -Pseudouridine	• Isoguanosine	• N6-Succinyl Adenosine (N6-SAR)

Metabolomik alanında yapılan araştırma ve tekniklerin geliştirilmesi ile binlerce metabolitin eşzamanlı ve dinamik olarak analizinin yapılmasıyla; karakteristik birçok metabolitin varlığı, miktarı ve akışının belirlenmesi kanserleşmede etkili olan yolların tanınmasında etkilidir. Metabolitlerin ve yolların tanımlanması hem hücre içi hem hücre dışı etkileşimlerin açığa çıkarılması bakımından önemli ayrıca yeni tedavi stratejileri geliştirmek için değerli veriler sağlamaktadır. (105)





## **4.ISI ŞOK PROTEİNLERİ**

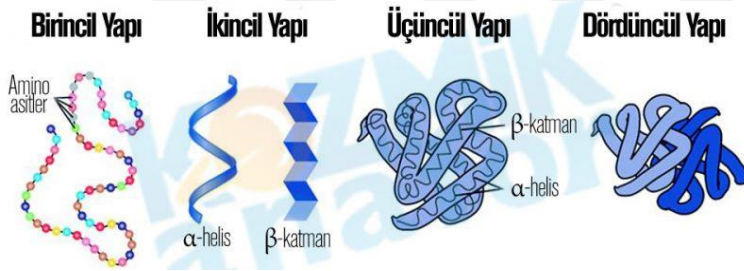
### **4.1. Protein Katlanması**

Proteinleri canlılığın yapı taşlarından olup fizyolojik koşullarda katlanıp yeniden açılarak düzen ve düzensizlik arasında geçiş formlarına sahiptir. Proteinler yapı taşları olan aminoasitlerin belirli bir türde, sayıda ve sırada spesifik olarak birbirine kovalent bağla bağlanmasıyla oluşmuş biyolojik polimerlerdir. Proteinler temel birimi olan amino asitler karboksil, amino, H atomu ve radikal gruptan oluşurlar. Radikal grup değişken olup her amino asitte farklıdır.

Proteinler birincil (primer), ikincil (sekonder), üçüncül (tersiyer) ve dördüncül (kuarter) yapılarını meydana getirerek kararlılıklarını oluştururlar. Proteinlerin primer yapısı peptit dizisindeki aminoasitlerin peptit bağıyla lineer bir şekilde oluşturduğu dizidir. Sekonder yapısında polipeptit zincirleri ana zincir atomlarının hidrojen bağı etkileşimleriyle katlanmış konformasyonudur. Sekonder yapıda görülen alfa-sarmal ve

beta-pileli tabaka ey yaygın görülen ikincil katlanmalardır. Üçüncül yapıda amino asitlerin radikal grupları arasındaki etkileşimler sonucu oluşur. Van der Waals etkileşimleri ve disülfid kovalent bağları üçüncül yapının stabilitesini güçlendirir. Bazı proteinlerin ise işlevsel yapısını kazanabilmesi için dördüncül yapıya katlanması gerekir. Dördüncül yapıda birden fazla polipeptit zinciri alt birimler oluşturarak etkileşim halindedir. (110-111)

Proteinlerin stabilitesini korumasında ve üç boyutlu yapısına katlanmasında zayıf etkileşimler ve kovalent bağlar önemli role sahiptir. Organizmada oldukça önemli fonksiyonlara sahip olan proteinlerin işlevlerini yerine getirebilmeleri için uygun konformasyonda üç boyutlu yapılarına katlanmaları gerekmektedir. Proteinin doğru pozisyonda katlanabilmesi ve kararlılığını koruyabilmesi için gereken bilgi proteinin primer yapısında saklıdır. Böylece uygun konformasyonda katlanan protein molekülü fonksiyonunu gerçekleştirmek için uygun üç boyutlu polipeptit yüzey paternine kavuşmuş olur. (111)



**Şekil 17.** Proteinlerin Yapıları (110)

Fizyolojik koşullar altında ufak proteinler tersiyer yapıya kolay şekilde katlanırken büyük proteinlerin doğru konformasyona katlanabilmesi için yardım gerekir. Stresle indüklenmiş hücrelerde ya da moleküler trafiğin yoğun olduğu sitoplazmada proteinlerin doğal yapısına katlanması zorlaşır. Doğru katlanamamış ya da hiç katlanamamış proteinler belli bir eşik değerin üzerinde birikerek birçok nöro-dejeneratif hastalığa ve kansere neden olmaktadır. (112)

#### 4.2. Isı Şoku Proteinleri (Heat Shock Protein; Hsp)

Hücrelerde genetik bilginin protein kompartmanlarına dönüşebilmesi için sentezlenen polipeptitlerin uygun biçimde katlanması gerekir. Bunun için hücrelerde moleküler şaperon sistemleri tarafından polipeptitlerin ribozomal çıkış ünitelerinden itibaren doğru katlanabilmeleri ve olgunlaşmaları sağlanmaktadır. Parkinson, kistik fibrozis veya Alzheimer gibi hastalıkların oluşmasının arka planında yatan yaygın sebeplerden biri de intraselüler ortamda protein katlanmasının bloke olmasıdır. (112)

Organizmalarda hücre içi veya hücre dışı stres koşullarına karşı üretilen hücresel stres proteinleri olarak da isimlendirilen ısı şok proteinleri (heat shock proteins; Hsps) ilk defa 1962 yılında Ferruccio Ritossa tarafından *Drosophila melanogaster*'ın (Sirke sineği) yüksek ısıya bağlı olarak tükürük sekresyonunda bir çeşit proteinlerin varlığını tespit etmesiyle literatüre geçmiştir. (113)

Isı şok proteinleri isminden anlaşılacağı gibi hücrelerin yüksek ısı (yaklaşık olarak 42-46 derece) ile indüklenmesi sonucu ciddi oranda sentezlenmesi artan protein grubudur. Isı şok proteinlerinin sentezinin artmasına sadece yüksek ısı koşulları değil aynı zamanda enflamasyon, ağır metaller, ultraviyole ışık, su kaybı, enfeksiyonlar, bazı kimyasallar da sebep olmaktadır. Bu sebeple ısı şok proteinleri diğer adıyla 'stres yanıtı proteinleri' hücresel strese bir yanıt olarak üretilmektedir.

Canlı sistemlerin hücrelerinde fizyolojik koşullar altında protein sentezi stabil olamayıp sık sık değişkenlik göstermektedir. Fakat hücreler stresle karşılaştığında fizyolojik koşullarda sentezlenen bütün proteinlerin üretiminde azalma gerçekleşirken ısı şok proteinlerinin sentezinde dramatik bir artış gözlemlenir. Isı şok proteinleri hücrede normal veya stres koşullarında, sinyalleşmede, kanser, immün sistem ve apoptoz da önemli rollere sahiptir. (113-114)

Isı şok proteinleri prokaryot ve ökaryotlar arasında evrimsel süreçler boyunca korunan proteinlerdir. Hücrede taşıdığı fonksiyonlara göre iki önemli gruba ayrılırlar. İlk grupta fizyolojik koşullarda sürekli olarak üretilip ribozomda sentezlenip sitoplazmaya uzanan polipeptit zincirini translasyon sonrası dağal konformasyonuna katlanmasını sağlayan moleküler şaperonlar bulunur. Diğer grupta ise stres uyarımlı proteinler olup hücre içi veya dışında oluşan hasarı engellemek, proteinlerin katlanamayıp çökmesini önlemek, strese bağlı hücre ölümünün önüne geçmek için üretilen ısı şok proteinleri bulunur. (116-112)

Isı şok proteinleri moleküler ağırlıklarına göre isimlendirilir. Ağırlıkları 15kDa ile 110kDa arasındadır. Genel olarak ısı şok proteinleri 6 alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar; Küçük ısı şok proteinleri (Hsps), Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 olarak tanımlanır. Molekül ağırlığı fazla olanlar ATP-bağımlı olup molekül ağırlığı az olanlar ATP bağımlı değildir. (114)

Hsp	LOKALİZASYON	İŞLEV
Hsp27	Sitoplazma	protein agregasyonunun engellenmesi, hücre büyümesi, farklılaşması
Hsp40	Sitoplazma	Hsp70'in koşaperonu
Hsp60	Sitoplazma, mitokondri	protein agregasyonunun engellenmesi, protein katlanması
grp78	Endoplazmik retikulum	protein taşınımı ve katlanması
Hsp70	Sitoplazma	protein agregasyonunun engellenmesi, protein katlanması
Hsp75	Mitokondri	bilinmiyor
grp94	Endoplazmik retikulum	protein kalite kontrolü
Hsp90	Sitoplazma	protein agregasyonunun engellenmesi, protein stabilizasyonu, transferi
Hsp104	Sitoplazma	proteinlerin agregatlardan serbestleştirilmesi

**Şekil 18.** Isı Şok Proteinlerinin Hücrede Lokalizasyonları ve Fonksiyonları (115)

#### 4.2.1. Küçük Isı Şok Proteinleri (s-Hsps)

Moleküler ağırlıkları yaklaşık olarak 12-43 kDa olan ısı şok proteinlerinin en küçük üyesidir. Hücrede fizyolojik koşullarda stres etkenlerinin olmadığı durumlarda hücre sitoplazmasında bulunarak hücre büyümesini ve olgunlaşmasını düzenlerler. ATP' ye bağımlı olmadan çalışırlar ve hücrel stres koşullarında sentezleri artar. ATP bağımlı ısı şok proteinlerinin regülasyonunda, oksidatif strese bağlı oluşan protein agregasyonunun önlenmesi fakat proteinlerin tekrar katlanması ATP-bağımlı olup enerji gerektirdiğinden bu görevi Hsp70 yerine getirir. (114-115)

Küçük ısı şok proteinleri (s-Hsps), kanser hücrelerinde de yoğun miktarda sentezi artmış proteinlerdir. Bu grubun üzerinde en çok çalışma yapılan üyesi Hsp27 olup, tümöral bölgede yüksek oranda ifade edilmesiyle programlı hücre ölümü (apoptoz) durmaktadır. Hsp27 yaptığı fonksiyonlar bakımında Hsp70'e benzetilmektedir. Grubun majör elemanı olan Hsp27 tümörleşmeyi hızlandırırken aynı zamanda kanser hücrelerinin yaşlanmasını engelleyerek kanserin progresyonunu artırıcı invaziv davranışlar oluşturur. Fizyolojik koşullarda sHsp'ler ökaryot hücrelerin iskeletini oluşturan mikrotübül, aktin, miyozin gibi proteinleri 'alfa-crystalin' ile birleştirerek hücre iskeletini ve dolayısıyla hücreyi oksidatif hasara veya ısıya karşı korur. (113-114)

#### 4.2.2.Hsp40 (DNA J)

Hsp40'ın birçok alt üyesi memeli genomunda kodlanır ve bunlardan bazılarının tümör gelişimiyle ilişkilendirilebileceği kanıtlanmıştır. Yazarlara göre, birçok kanser türünün tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı direnç oluşmasında Hsp'lerin fazla üretilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Hsp'lerin tümörgeneziste son derece yaygın ifade edilmesi birçok Hsp türünün kanserin erken teşhisinde kullanılabileceği düşüncesini akla getirmektedir. Bu fikri destekleyen kanıtlar arasında akciğer karsinomunda Hsp40'ın yüksek düzeyi dikkat çekmektedir. Hsp40'ın bir diğer önemli özelliği ise hücrede önemli görevleri olan Hsp70'in ko-şaperonu olarak protein agregasyonunun önlenmesinde yardımcı olmasıdır. Hsp40 hücrede sitozolde bulunmaktadır. (113-114-115)

#### 4.2.3.Hsp60 (Şaperoninler)

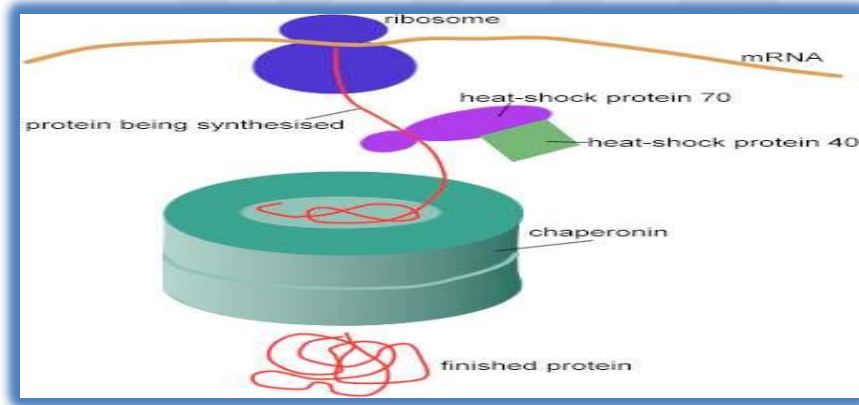
Hücre dışı ve sitozolde bulunan büyük kompartmanlı protein kompleksi olmasına rağmen yoğun olarak mitokondri matriksinde bulunmasından dolayı daha çok mitokondri şaperonu olarak bilinmektedir. En bilinen fonksiyonları arasında henüz olgunlaşmamış proteinlerin doğal konformasyonuna katlanmasında, sitozol içindeki protein akışının düzenlenmesinde, hücre sinyalleşmesinde, bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde, apoptoz gibi süreçlerde görevleri bulunur. Hsp60 ve ko-şaperonu olan Hsp10 ile birlikte işlev göstermektedir. Araştırmalar, Hsp60 gen mutasyonlarının birçok mitokondriyal hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hücre membranında da bulunan Hsp60 şaperon kompleksinin aminoasit transferi ile de bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Kanser hücrelerinin membranında normal hücrelere kıyasla daha fazla Hsp60 kompleksinin bulunması ayrıca rahim ve adrenal kanserler gibi birçok kanser türünde Hsp60'ın artan seviyesi onun agresif bir prognostik faktör olduğunu yansıtmaktadır. Yapılan *in-vitro* çalışmalardan elde edilen bulgulara göre Hsp60 inhibisyonunun osteosarkoma ilerlemesini azalttığı belirtilmiştir. (114)

#### 4.2.4.Hsp70 (DnaK)

Bütün ısı şok proteinleri arasında hücresel fonksiyonları en çok araştırılmış olan şaperon türü Hsp70'dir. Hsp70 hücre sitozolünde iki esas yapıda bulunmaktadır. Bunlardan ilki stres koşullarında üretimi artan Hsp72 ( Hsp70 ), diğeri ise hücrede üretimi devamlı olan

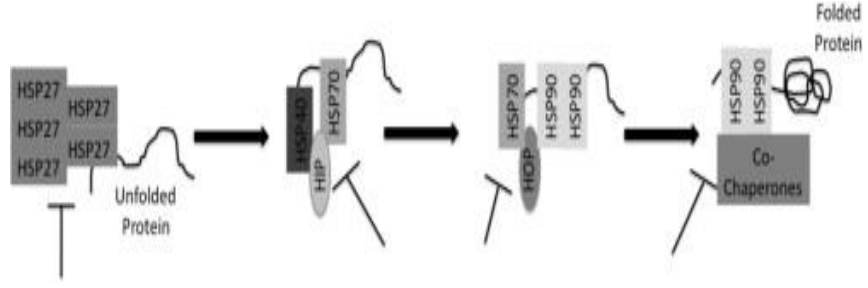
Hsp73'tür. Hsp70 protein ailesi yaklaşık 66-78 kDa ağırlığa sahip olan canlılar arasında en iyi korunmuş ve en iyi karakterize edilmiş Hsp ailesidir. Bu proteini kodlayan genler insanda 21,14 ve 6 kromozomda bulunur. Hsp70 yalnızca ökaryotlarda değil prokaryotlarda da bulunur ve ökaryotlarda sitoplazma, mitokondri, ER, kloroplast ve hücre dışında da mevcuttur. Ekstraselüler ortamda Hsp60 ile lokalize haldedir. ( 114-119)

Protein katlanmasında görevleri en fazla olan moleküldür. Genel fonksiyonları arasında; ribozomal translasyonu tamamlanmış proteinlerin natif konformasyonuna getirilmesinde, çökelmiş proteinlerin tekrar katlanmasında, protein transportunda, düzenleyici proteinlerin regülasyonunda görevlidir. Bu bağlamda Hsp70 protein katlanmasının en önemli elemanı olup onkogeneze, hücre yaşlanmasında, apoptozda ve immün yanıtta geniş görev yelpazesine sahiptir. (120)



**Şekil 19.** Hsp70'in Yeni Sentezlenmiş Proteinleri Katlama Prosesi (122)

Basit olarak, Hsp70'in protein katlanmasındaki çalışma prensibi; katlanması gereken peptitlerin hidrofobik rezidüleriyle enerji harcayarak etkileşir ve proteinin doğal yapısına getirilmesini sağlar. Hsp70 proteininin regülasyonu, ifade edildiği gen bölgesi, diğer ısı şok proteinleri ve ko-şaperonları ile kontrol edilmektedir. (112)



**Şekil 4.4.** Katlanmamış Proteinlerin Hsp70 ve Ko-şaperonlarıyla Katlanma Süreci (121)

Hsp70 yalnızca yanlış katlanmış yada hiç katlanmamış proteinleri yeniden uygun pozisyona katlamakla kalmaz. Aynı zamanda yeni sentezlenmiş olan proteinlerin sitozolik koşullarla etkileşime girip çökmesini engellemek için ko-şaperonu olan J domain ile işbirliği yaparak peptit zincirini hidrofobik segmentlerinden kuşatarak katlanmasını sağlar. Isı şok proteinlerinde bu yetenek sadece Hsp70 molekülünde bulunur. Ayrıca ortamda eğer çökmüş bir protein grubu varsa Hsp100 ile koordine olarak çöken proteinleri çözdürülebilir hale getirerek katlanmasını sağlarlar.

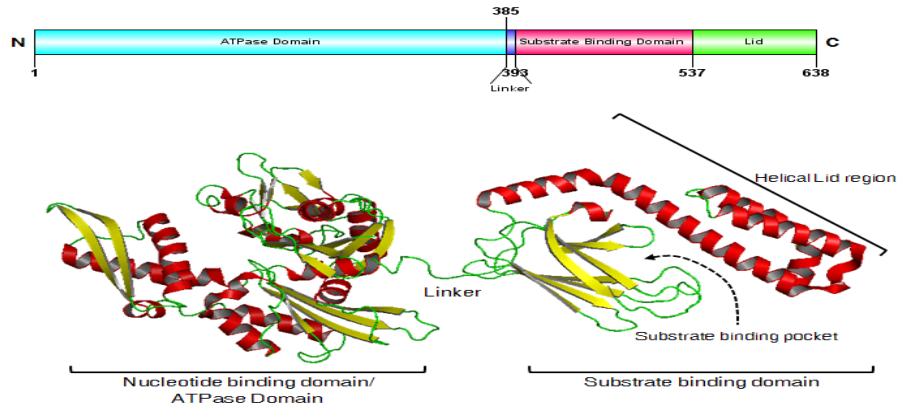
Hsp70 hücre göçü, hücre farklılaşması, apoptoz ve homeostasis, sinyal iletimi gibi kritik hücresel süreçlerde Hsp90 ile birlikte işlev görürler. Güncel çalışmalara göre, Hsp70'in apoptozu bloke etmesinin kaspaz aracılı olduğu bilinmektedir. Bunun sonucunda Hsp70 seviyesindeki ciddi artışların apoptozda kritik öneme sahip 'tümör nekroz faktör-a gibi elemanların etkisini inhibe ederek tümörogenezisi hızlandırır. Dolayısıyla Hsp70 seviyesinin azaltılmasına yönelik kullanılan inhibitörler tümör proliferasyonunu azaltarak apoptozu hızlandırır.

HSF-1 (Heat Shock Factor I) uzun süren çevresel veya sitozolik stres koşullarında, hücre büyümesi ve farklılaşması sırasında ısı şok proteinleri üyelerini aktive ederek stres yanıtının düzenlenmesinde önemli görev alır. (114-122)

#### 4.2.4.1. Hsp70'in Yapısı

Hsp70'in şaperon işlevini yerine getirmesini sağlayan üç domaini bulunur. Bunlar; nükleotit bağlanma domaini (NBD), substrat bağlanma domaini (SBD) ve C-terminal domain (CTD) domainleri arasındaki allosterik etkileşimlerle kontrol altındadır.

N-terminal nükleotit bağlanma domaini (NBD), ATPaz aktivitesi içeren oldukça korunmuş olan esnek bağlayıcı bölgeyi ifade eder. Nükleotit bağlanma domain yapısının esnek olmasından dolayı nükleotit bağlanma çukurunun kolaylıkla açılıp kapanmasına avantaj sağlar. Gerektiğinde nükleotitin bağlanıp gerektiğinde salınmasına yardım eder. Nükleotit bağlanma domaininde N-terminal domain 44 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Nükleotit bağlanma bölgesinde ATP ayrışması gerçekleşerek bitişiğinde bulunan substrat bağlanma domainine haber gönderilir. Böylece Hsp70'in substrata daha sıkı bağlanması sağlanmış olur. N-terminal domain kendisine ait iki alt domain içerir. Bu alan merkezde bir çukur oluşturacak biçimde lokalize olup çukur olan bölgeye nükleotit bağlanır. Nükleotit bağlanma domaini ATPaz bağlanma çukurunu sarmalayan dört alandan (IA-IB-IIA-IIB) meydana gelir. (118-119-120)

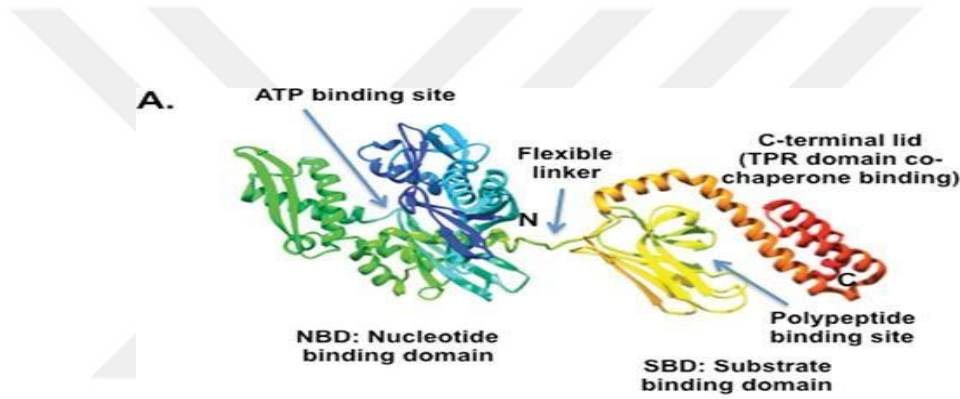


**Şekil 4.5** Hsp70'in ATPaz Domaini-Substrat Bağlanma Domaini-C-Terminal Domaini (Sığır Hsp70'i) (123)

Substrat bağlanma domaini (SBD), Hsp70 ailesinde oldukça yüksek seviyede korunmuş olup iki subdomain yapısından oluşur. 25 kDa molekül ağırlığına sahip olan  $\beta$ -tabaka subdomain ve 10 kDa heliks alandan oluşur. Substrat bağlanma domaininin bir subdomaini olan heliks tabakası esnek bir kapak motifi oluşturarak katlanacak olan substratın bu bölgeyle etkileşmesiyle kapak yapısı kapanarak substrat bağlanmış olur. Substrat bağlanma bölgesindeki hidrofobik aminoasitlerin gerilmeleriyle iletişime giren substrat molekülü olması gereken yapıya getirilir. Sonuç olarak, NBD'indeki çukura yeni bir ATP'nin gelip bağlanması ile helikal kapak yapısı açılarak substrat molekülü ortama salınır. Böylece Hsp70 kompleksi bir sonraki sıklusa hazır hale gelir. (120-123)

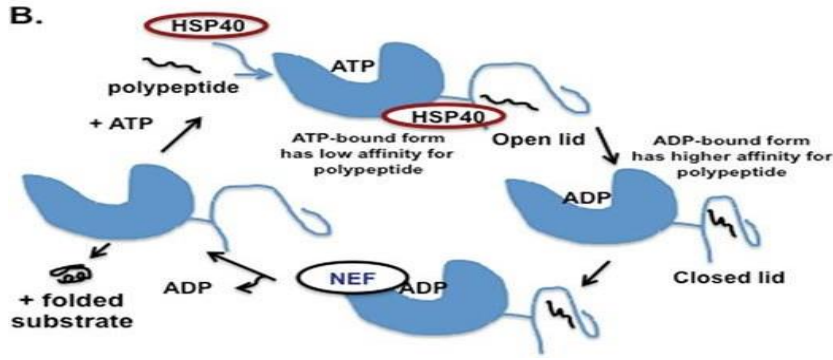


C-terminal domain Hsp70 ailesi içinde en az korunandır. Bunun muhtemel sebebinin farklı Hsp70 üyelerinin diğer yardımcı üyelerle etkileşimini kolaylaştırmak amaçlı olduğu düşünülmüştür. Bu domain 18 kDa ağırlığa sahip olup substrat bağlanma domaini ile açılır kapanır kapak vazifesi görür. Bu domain ökaryotlar içinde yüksek korunumlu bir peptit rezidüsü içerir. C-terminal alanında bulunan son dört aminoasit ‘tetratriopeptit’ yapısı oluşturarak proteinlerle etkileşime girebilen bir aminoasit tanımlaması olan ‘EEVD’ motifi oluşturur. EEVD motifinin görevinin, ko-şaperonların ve farklı Hsp’lerin bağlanmasını kolaylaştırmak olduğu tahmin edilmektedir. (119-120)



**Şekil 20.** E.coli Hsp70’inin NBD-SBD-CTD Sulu Çözeltideki Gösterimi (120)

Hsp70-substrat kompleksinin affinitesinin sağlanmasından sorumlu olan bazı faktörler bulunur. Bunlardan biri olan ve N-terminal ATPaz domainde işlev gören Nükleotid değişim faktörleri (NEF)’dir. Nükleotid bağlanma domaininin çukurunda bulunan ATP bağlanma bölgesinde ATP/ADP değişiminde kapağın yeniden açılarak substratın serbest bırakılmasında yardımcı bir göreve sahiptir. Ayrıca substrat-Hsp70 ilişkisinde sadece NEF’ler değil aynı zamanda Hsp40 molekülüde (J Domain Protein) yardımcıdır. (119-120)



**Şekil 21.** Hsp70 ve Ko-şaperonu Hsp40 ile etkileşimi (120)

Hsp70 ailesinin kendi üyeleri arasında ve türler arasındaki domainler farklılık göstermektedir. Domainler karşılaştırıldığında benzerlikler kadar protein işlevselliğini etkileyen ciddi farklılıklarda tespit edilmiştir. Hücrede birçok farklı Hsp70 formunun bulunması; her birinin farklı ko-şaperonlarla veya substratlarla bağlantısı arasındaki mekanizmalar hala kesinleştirilememiştir. (124)

#### 4.2.4.2. Hsp70'in Onkogenezde Etkisi

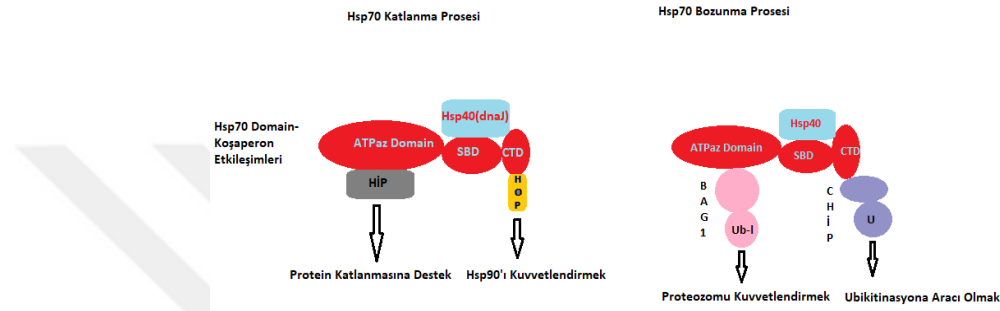
Yazarların fikrine göre, Hsp70 kodlayan gen ve burdan eksprese edilen proteinin kanser başlangıcında bir prekürsür olabileceğini savunmaktadır. Fareler üzerinde yapılan deneylerde Hsp70 up-regülasyonunun fibroblast hücrelerinde karsinom oluşmasını indüklediğini ve fare bağışıklık hücrelerinin tümörü yok etmeye duyarsızlaştığı görülmüştür. (120)

Yakın bir zamanda yapılan çalışmada ise meme kanseri hücre hatlarında HER2 reseptörünün onkogenik karakter kazanmasıyla birlikte Hsp70 sentezinde artmıştır. Kanser hücrelerinde gösterdiği bir diğer etki ise, Hsp70'in up-regülasyonunun MCF-7 hücre hatlarında hücre siklusundaki G0-G1 bölgesini kısaltarak malign proliferasyonu hızlandırmasıdır. Bazı araştırmacılar bu bilgiler ışığında Hsp70'in bir onkogen olabileceğini öne sürmektedir. Hsp70'in inhibisyonunun birçok hücrede kaspaz ilişkili apoptozu indüklediği düşünülmektedir. Ayrıca Hsp70 inhibisyonu sağlıklı hücrelerin ömrünü etkilememiştir. Hsp70 over-ekspresyonu ile tümör ömründe ve ilaç direncinde artışın gözlemlendiği, kanser hastalarının prognozunda ise kötüleşme olduğu

bildirilmiştir. Hsp70'in tümör genetikteki etkilerinden biri de tümör supresor gen olan p53'ü baskılamasıdır. (112-115)

#### 4.2.4.3. Hsp70 Şaperon Kompleksi (CHİP-BAG-HİP-HOP)

Hsp70 şaperon kompleksinde major görevli elemanlar Hsp40, HIP, HOP, CHIP, BAG proteinleridir. (124)



**Şekil 22.** Hsp70 Aracılı Protein Katlanması-Protein Degredasyonu (124)'den Uyarlanmıştır

Hsp70 aracılı protein katlanması veya protein degradasyonu için Hsp70'in N-terminal ve C-terminal bölgesine hangi ko-şaperonların bağlandığı seçilecek yolu belirler. Burada önemli olan 2 durum vardır. Bunlardan birincisi; protein katlanmasına destek olan 'HIP'in ve tam tersi durumla proteozom kompleksini kuvvetlendiren 'BAG1'le Hsp70'in ATPaz domaini için yarışıyor olmasıdır. HIP VE BAG1 için; her ikisinde ATPaz alanına afinitesi yüksek olduğundan ATPaz bölgesine hangisinin bağlandığı hücrenin protein katlanmasına mı yoksa protein bozunmasına mı gideceğini belirler. HOP Hsp90'a bağlanarak Hsp70 şaperon kompleksinin kararlılığını artırır. (124-125)

Aynı zamanda HOP VE CHİP'te C-terminal domain (helikal kapak kısmı) için rekabet halindedir. İki durum içinde ortak alan, Hsp70'in Hsp40 ile yaptığı ko-şaperon birlikteliğidir. (120)

Hsp70'i hedefleme prosesinde Hsp70'e bağlanarak proteozomu güçlendiren BAG1 proteininin ubiquitin-benzeri bölgesini kullanarak işlemi kolaylaştırır. BAG1 Hsp70'e bağlanarak proteozomu indüklerken BAG3 makrofaji fonksiyonunu düzenler. CHİP aynı

zamanda Ubiquitin-ligaz gibi fonksiyon göstererek proteozom-substrat etkileşiminde görev alır. (124-125)

#### 4.2.4.4. Kanserde Hsp70 Hedeflenmesi ve Hsp70 İnhibitörü PES

Sağlıklı hücreler dışındaki proliferatif hücrelerin çoğu farmakolojik tedavi süresince bile çeşitli tümörogeniz basamaklarındaki sitolojik stresle baş etmek için yoğun miktarda Hsp70'i sentezler. Kanser hücrelerinin malignite boyunca gösterdiği bu şiddetli bağımlılığı kanıtlayan çalışmalar neticesinde kanser tedavilerinde Hsp70'in hedeflenmesi klinik araştırmalarda popüler hale gelmiştir. Malignitede Hsp'lerin ciddi oranda artışını saptayan in-vitro araştırmaların öncülüğünde Hsp türlerinin biyolojik destek ve kanser hücrelerinde moleküler şaperon olarak görev yapmasından dolayı Hsp inhibitörlerinin onkogeneizde bir araç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. (123-125)

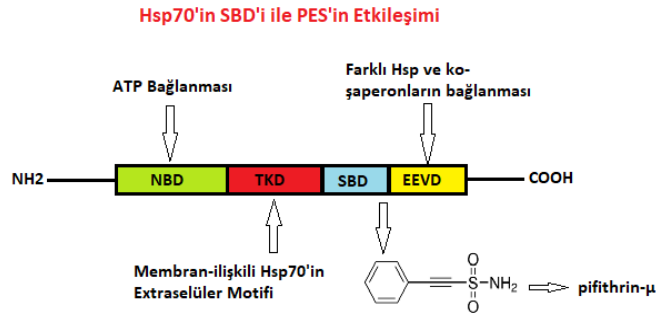
Genel olarak Hsp70 inhibitörleri; protein aptamerleri, antikolar ve küçük moleküler inhibitörler olarak üç gruba ayrılır. Hsp70'e karşı spesifik küçük molekülü bir inhibitörün geliştirilmesi zor olsa bile yakın zamanlarda bu alanda çalışmaları başarılı olan bir inhibitör keşfedilmiştir. Bu, kısaca PES olarak adlandırılan 2-feniletinülfonamid veya diğer adıyla pifitrin- $\mu$  molekülüdür. (125)

İlk defa Gudkow tarafından ve p53 tümör baskılayıcı genin mitokondri trafiğini bloke eden küçük bir bileşik olarak keşfedildi. İlerleyen zamanlarda PES ile ilgili önemli bir detay keşfedilmiştir. Hsp70'in inhibisyonu PES aracılı sitotoksitenin azaltılmasında etkili olduğu gösterilmiştir. PES molekülü stres uyarımlı Hsp70'in Substrat Bağlanma Domaininin C-terminal kısmına bağlanmasıyla beraber Hsp70'in C-terminal domainine bağlanan ko-şaperonları olan CHİP ve HOP'un bu domaine artık bağlanamamasına neden olur. Böylece tümörlerde lizozomal degradasyon ve sitoproteksiyonda etkili yolları baskılayarak tümörlerin kaspaz-bağımsız yolla ölmesini sağlar. (120)



### Şekil 23. PES'in (2-phenylethynesulfonamide) Genel Yapısı

Hsp70 ailesinin izoformları anti-tümör tedavilerinde bir hedef olarak görülmektedir. İnsan Hsp70 ailesinin üyeleri sitoplazma (HSPA1A ve HSPA1B), ER (HSPA5), mitokondri (HSPA9) yerleşimli olabilir. Hsp70 inhibitörlerinin geliştirildiği çalışmalardan çıkan bir sonuca göre; stres kaynaklı sitozolik Hsp70 üyesi Hsp70, Hsp70-1 ve Hsp70-2 ile beraber yapısal olarak hücrede bulunan formu olan Hsc70 (HSPA8)'in birlikte yok edilmesinin gerekmesidir. Görece yapılan *in-vitro* testlere ilişkin olarak; Pes'in yapısal Hsc70 ve stres uyarımlı Hsp70 arasında seçim yapmadan bağlandığını göstermiştir. (126)



### Şekil 24. Hsp70 ve PES Hedefleme Stratejisi (125)'den Uyarlanmıştır

#### 4.2.5 Hsp90 (HtpG)

Hsp90 ökaryot hücrelerin mitokondri, ER, sitoplazmasında yüksek miktarda bulunan bir ısı şok proteinidir. Ökaryotlarda protein katlanması, protein matürasyonu, stabilizasyonunda önemli görevleri vardır. Hsp90 diğer Hsp'lerle yakın etkileşimde olup hücrede birçok ko-şaperonu bulunan protein katlanma sisteminin merkezindeki bir moleküldür. Bu sebeple hücrede 100 üzeri proteinin hedefi konumundadır. Protein katlanma sisteminin merkezinde olması nedeniyle birçok metabolik yolda özel

fonksiyona sahiptir. Özellikle yapısal Hsc70 ile multi-şaperon birlikteliği oluşturarak hücrede protein katlanması ve aktivasyonunun modülasyonunu sağlarlar. Bu multi-şaperon kompleksinin diğer önemli görevi ise hormon-reseptörlerinin matürasyonunu düzenlemesidir. (113)

Hsp90 mutasyona uğramış p53 proteini, hormon-reseptörleri, kanser türlerinde fazla eksprese olan membran reseptörleri (meme kanserinde HER2 gibi), transkripsiyon enhancer-silencer ve çeşitli kinazları hedef alan oldukça geniş etkileşimli bir ısı şok proteinidir. Hsp90'ın pasif formunda ATP bağlı değilken aktif formunda ATP bağlıdır. Hsp90 homodimerlerden oluşur. Genel olarak Hsp90 izoformları ATP bağlanma ve ayrışmanın olduğu NTD, orta bölge MD ve ATP hidrolizi için gerekli yüksek korunmuş CTD oluşmaktadır. (115)

Hsp90'ın hücre büyüme sinyallerinin yürütülmesindeki öncü moleküllerden biri olmasından dolayı birçok kanser türündeki hücrelerin malignite başlangıcında, hücrelerin adhezyonunda ve kötü prognozla ilişkili bir moleküldür. Çünkü Hsp90 hücre büyümesiyle ilişkili birçok yolak, transkripsiyon faktörleri, membran reseptörleri ile etkileşim halindedir. Araştırmalara göre Hsp90 ifadesi birçok kanser türünde 10 kat artmış durumdadır. Bu nedenle kanser tedavi yöntemlerinde ve yeni ilaç adayları moleküllerin geliştirilmesinde Hsp90 inhibisyonu hedeflenir. Önemli Hsp90 inhibitörlerinden biri de Geldanamisin'dir. (120-125)

#### **4.2.6. Büyük Hsp'ler**

Büyük Hsp ailesinin üyeleri molekül ağırlığı büyük katlanmış proteinleri bile çözündürüp ayırma özelliğine sahiptir. Normal hücre koşullarında bu protein ailesi moleküler şaperon olarak davranarak protein katlanmasında görevlidir. Hsp110 ve Grp170 dev şaperonları ısı stresi ve glikoz eksikliğiyle uyarılırlar. Hsp100 agregat oluşturan proteinlerin çözülmesini sağlarken Hsp104 kümelenen proteinleri gevşeterek katlanma prosesine yönlendirir. Bazı kanser türlerinde Hsp110 miktarında artışlar olduğu belgelenmiştir. Hsp110 kanserle ilişkili Wnt sinyal yolağında fonksiyon gösterir. Wnt sinyal yolağına

sinyal gönderen genlerin up-regülasyonu meme ve kolon kanseri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.(125)

#### **4.2.7. Kanser Tedavilerinde Kombine İnhibitör Kullanmanın Avantajları**

Günümüz teknoloji ve sağlık yatırımlarının artmasıyla kanser dahil birçok hastalığa etkili cevap veren tanı ve tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Kanser heterojenitesinin karmaşıklığı ve birçok metabolitin birbiriyle etkileşimli olmasından dolayı hücrel büyüme ve sinyalleşmeyi bozan yeni spesifik hedef inhibitör kombinasyonları keşfedilmeye başlanmıştır. Ayrıca bazı kanser türlerinde uzun süreli aynı ilacın kullanımı tümör direnci geliştirdiğinden ilaç kombinasyonlarının kullanılması daha olumlu sonuçlar oluşturabilir. Bu sebeple şimdilerde hem ilaçtan alınacak yararlanımı artıracak hem de hastada daha az yan etki oluşturacak yalnızca kanser hücrelerini hedef alan ve kombine kullanıldığında birbirlerinin sinerjik etkilerini kuvvetlendirecek moleküler inhibitörlerin tasarlanmasının ve klinikte uygulanmasının avantajı büyüktür. (127)

## **5. MATERYAL-METOD**

### **5.1 Analizlerin Yapıldığı Tarih ve Konum**

Bu tez çalışmasında deneyler Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi ilgili laboratuvarlarında Ocak 2018-Mart 2019 tarihlerinde yapılmıştır.

### **5.2 Kullanılan Malzemeler**

MCF-7 (ATCC), Fetal Bovine Serum (FBS) (Thermo Fisher), DMEM—Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Fisher), Phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma), Tripsin (Thermo Fisher), Penisilin-Streptomisin (Sigma), Distile su (Kurum içi), %70'lik Etanol, XTT Kit (Sigma), DMSO (Sigma), Metanol (Merck)

### **5.3 Kullanılan Cihazlar**

Flow akışlı kabin (Biohazard), İnkübatör (Nittalab), +4 Buzdolabı (Bosh), -80 Soğutucu, Vorteks (İsolab), Santrifüj (Laborteks), Pipet tabancası (İsolab), İvert Mikroskop



(Nükleonlab), Elisa Okuyucu (Thermo-Scientific), Distile Su Cihazı (Mikroteklab), Hplc Cihazı ( Shimadzu), LC MS MS (Thermo Orbitrap Exactive)

#### **5.4 İncelenecek Hücre Hattının Özellikleri**

##### **MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattının Taşıdığı Özellikler:**

İlk kez 1970’te 69 yaşındaki meme kanseri hastasının metastatik dokusundan izole edilmiştir. MCF-7 hücrelerinin östrojen ve progesteron reseptörü pozitif, olup araştırmalarda sıkça kullanılmaktadır. Adherent bir yapıya sahip olmasından dolayı hızlıca büyür ve dış etkenlere oldukça dayanıklıdır. Büyüme inhibisyonları tümör nekroz faktör alfa karşısında duyarlıdır. *İn vitro* ortamda çoğaltılmaları kolay olsa da büyümeleri yavaş etkinlik gösterir. (132)

##### **5.5 Hsp70 İnhibitörü KBR1307’nin *İn-silico* Modellemesi**

İlaç adayı molekülümüz KBR1307, ısı şok protein ailesinden Hsp70 proteinini inhibe etmek için geliştirilen bir inhibitördür.

Hsp70 inhibitörü olarak tasarlanan KBR1307’nin protein ve ligand etkileşimleri için gereken docking hesaplamaları ‘Autodock’ (<http://autodock.scripps.edu/>) programıyla yapılmıştır. Hsp70’in kristal yapısı PDB (Protein Data Bank) veri tabanından alınmıştır. İnaktive Hsp70 proteininin kristal yapısı veri tabanında henüz tanımlanmadığından Hsp70’in domain kodları verilmiştir. Bunlar; ATPaz domain PDB kodu 1S3X, SBD (Substrat Bağlanma Domaini) ve (CTD) C-terminal Domain PDB kodu 1DKZ olarak belirtilmiştir.

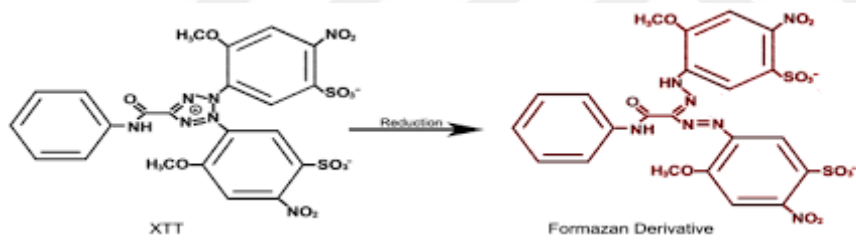
Uygulanan docking çalışmalarında Hsp70’in KBR1307 ile bağ ve enerji etkileşimleri bakımından en stabil formu bulunmuştur. Docking hesaplamasında inhibitörümüz KBR1307, Hsp70 proteininin (ligand) reseptör bağlanma alanlarına hedeflendirilmesi yapılmıştır. Kbr1307 ligandının yapısı ‘MedChem Designer’ programı ile çizilmiştir.

Çizilen inhibitörün Hsp70 proteini ile modellenmesi 'Pymol' (<https://pymol.org/2/>) yazılımıyla görüntülenmiştir.

Bu çalışmada, laboratuvarımızda tasarladığımız ve patent çalışmaları devam eden KBR1307'nin kontrolü olarak PES (2-phenylethynylsulfonamide) uygulanmıştır.

### 5.6 Sitotoksite Testinde Kullanılan XTT Bileşiği Hakkında

2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid (XTT) bileşiği kolorimetrik yöntemleri esas alınarak geliştirilmiştir. Tetrazolyum tuzları ile hücrelerin boyanarak renk değişikliği yoluyla da canlılığının ölçüldüğü in-vitro bir sitotoksite testidir. Tetrazolyum bileşiği yapısında heterosiklik halka içeren ve birçok üyesi olan kimyasal grubudur. XTT testinde renk değişikliği oluşturan bu halka, elektron alan bu tuzların indirgenmesi ile birlikte 'formazan' yapısının oluşmasıyla sonuçlanmaktadır.



Şekil 5.6. XTT – Formazon Dönüşümü

Bu testi spesifik yapan özellik; tetrazolyum tuzunda bulunan heterosiklik halkanın yalnızca canlı hücrelerin mitokondrileri tarafından açılıp somut renk değişikliğini oluşturmasıdır. Canlılığını yitirmiş hücreler ise heterosiklik halkayı kıramazlar ve dolayısıyla açık pembeden koyu turuncuya dönüşen renk değişimi gözlenmez. Dolayısıyla bu test sadece canlı hücreleri tespit etmek için faydalı bir yöntemdir.

XTT bileşiği negatif yüklü olduğu için hücre zarından geçemez. Dolayısıyla elektron indirgemelerini sağlayan bileşiklerin ilavesiyle membrandan geçerek aldığı elektronla tetrazolyum tuzunu indirger ve formazan oluşumu gerçekleşir. Sonrasında

spektrofotometrik yöntemle ölçüm yapılarak oluşan sinyalle canlı ve ölü hücre miktarı tespit edilir. (131)

### 5.7 Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar

**DMSO (Dimetilsülfoksit):** Hücre kültüründe dondurma ve çözündürme aşamaları esnasında hücrelerde deformasyon oluşmasını engellemek için kullanılan kriyoprotektif bir kimyasal ajandır. Bu kolligatif kimyasal küçük molekül boyutuna sahip olup hücre zarından geçebilecek özelliktedir. Böylece donma sırasında hem hücre içindeki sıvı değişikliklerinden oluşan boşlukları önlemekte hem de hücre içinde kristal oluşumunu engellemektedir.

**DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium):** Hücrelerin gereksinimi olan temel vitaminleri, aminoasitleri, mineralleri, serumu (büyüme faktörleri, hormonlar içerir) ve glikozu barındıran besi yeri solüsyonudur. Düşük glukozlu yada yüksek glukozlu varyantları mevcuttur. Yüksek glikoz içeren besi yerinin bir dezavantajı mevcuttur. Fazla glikoz olan ortamda hücreler daha çok glikolizi tercih eder ve bu yolak sonunda oluşan laktat pH'yı düşürerek hücre üremesini baskılar. Kültüre alınan hücre tipine uygun besi yeri ortamı ve dozu seçilmelidir. Ayrıca hücre içindeki hemostatik ve osmotik dengenin sağlanması için HEPES gibi hücre içi tamponlayıcı sistemlerde besi yerine ilave edilir. DMEM'ler renksiz veya bir belirtecin eşlik ettiği kırmızı renkte olabilir. DMEM'e kırmızı rengi veren fenol kırmızısı pH değişikliğini anlamak için ya da olası kontaminasyonları görmek için eklenir. (128)

**FBS (Fetal Bovine Serum):** Fetal buzağuların kanından elde edilen çeşitli büyüme faktörleri, çok sayıda besinsel makromoleküller içeren sıvıdır. Hücrelerin büyüme ve gelişmeleri için oldukça önemli faktörler içerir. Ayrıca tripsinin inhibisyonunu sağlamak içinde kullanılmaktadır. (129)

**Antibiyotik:** Besiyeri ortamındaki bakteri, küf kontaminasyonlarının önüne geçmek için besi yerine eklenmektedir. Genel olarak kullanılan Streptomisin derişimi 50 µg/ml, Penisilin derişimi 100 IU/ml olarak kullanılır.

**PBS (Phosphate Buffered Saline):** Yaygın kullanılan bir tampon solüsyonudur. Sodyum klorür, sodyum fosfat ve potasyum fosfat gibi tuzlar içeren izotoniklerdir. Yıkama işlemlerinde, besi yerinin seyreltilmesinde kullanılmaktadır. (128)

## **5.8 Çalışmada Uygulanan Hücre Kültürü Protokolleri**

### **5.8.1 Hücre Çözdürme**

Hücre kültüründe kullanılacak hücrelerin öncelikle çözündürülmesi gerekmektedir. Hücre çözdürme işlemi ileri aşamalarda sonuçları doğrudan etkileyeceğinden oldukça hassas ve dikkatli bir şekilde prosedür uygulanmalıdır.

Firmadan dondurulmuş şekilde gönderilen cryo tüpler steril edilmiş 37 °C su banyosunda çözünmesi beklendi. Sonrasında çözünen cryo tüp alkolle silindikten sonra flow kabin içerisine alındı. Kapakları dikkatli bir şekilde açılan tüplerin içeriği pipet pompası ile çekilerek falkonlara koyulur ve üzerine 15 ml DMEM ilave edilerek 700 rpm de 6-7 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstteki süpernatant uzaklaştırıldı ve dipte çöken hücreler yavaşça pipetaj yapılarak 10 ml DMEM ilave edilmiş olan 75 ml hacimli flasklara koyuldu. Ek olarak flaskın üzerine 1 ml FBS ve birkaç damla antibiyotik çözeltisi ilave edildi. Ardından flasklar kapatılarak CO<sub>2</sub> ikamesi yapılan ve 37 °C sıcaklıktaki inkübatöre yerleştirildi.

### **5.8.2 Hücrelerin Yıkanması**

Kültür ortamında çoğalan hücreler ortamdaki besini tüketerek zamanla besi yerine atık maddeler salarak canlı hücrelerinde ölümüne sebep olur. Ölen hücreler yaşayan hücreler için toksisiteye neden olur. Bu nedenle flaskların belirli süre aralıklarında yıkanarak ölü hücrelerden ve atıklardan arındırılması gerekmektedir.

Bu işlemde kullandığımız hücre hatları monolayer (yüzeye yapışık olarak büyüyen kültür) kültür olduğu için yıkama işleme buna göre uygulandı. Flasklarda bulunan besiyeri ortamı pipet pompası ile uzaklaştırıldı ve flaskta bulunan yapışan hücreleri yapışmayan ölü hücrelerden temizlemek için ve sonraki aşamada uygulanacak Tripsinin etkinliğinin DMEM tarafından azaltılmaması için 15 ml PBS solüsyonu ile yıkandı. PBS solüsyonunda boşaltıldıktan sonra 3-4 ml Tripsin ilave edilerek 5 dakika inkübatörde bekletildi. Tripsin (hücre yüzey glikoproteinlerini parçalayan bir enzim) sayesinde flask tabanına yapışan hücreler arası bağlantılar kopar ve hücreler serbest hale gelir. 5 dakika sonunda Tripsinin işlevini ortadan kaldırmak ve tripsini inhibe etmek için flask üzerine 10 ml DMEM ilave edildi. Ortalama 15 ml solüsyon oluşan ortamdan 7-8 ml alınarak başka bir flaska koyuldu. Her bir flaskın üzerine 7-8 ml daha DMEM koyuldu. Bütün flaskların üzerine 1,5 ml FBS ve birkaç damla antibiyotik eklenerek inkübatöre kaldırıldı. Böylece flasklardaki hücre yoğunluğu seyreltildi. Bütün bu işlemler flow kabin içinde kontaminasyonu minimuma indirmek için uygulandı.

### **5.8.3 Hücrelerin Platelere Ekimi**

Tekrardan pasajlanacak kadar dolan subkültürlerden uygun flasklar seçilerek yıkama ve pasajlama prosedürleri aynı şekilde uygulandı. Tripsinle kaldırılan ve üzerine DMEM ilave edilen ortam falkon tüplere alınarak 1500 rpm de 10 dakika santifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı atıldı dipte kalan hücre yığını ile ilerleyen işlemlere devam edildi. Çökelti üzerine 15 ml DMEM ve 1,5 ml FBS ilave edildi ve yavaşça ortamın süspanse edilmesi için pipetaj yapıldı. Thoma lamı ile her kuyucuğa koyulacak hücre miktarı hesaplandıktan sonra gereken seyreltmeler uygulandı. 96 kuyucuklu platelere her kuyucuğa 200 µl hacim olacak şekilde çoklu pipetle koyuldu. Sonrasında platelerin kapakları kapatılarak inkübatöre kaldırıldı.

### **5.8.4 Platelereki Hücrelere İlaç Eklenmesi**

Platelere ekilen hücreler 24 saat geçtikten sonra ilaç uygulanmak üzere flow kabine alındı. Steril falcon tüp içerisinde 30 ml DMEM ve 3 ml FBS karışımı hazırlandı.

Hücrelere uygulanacak olan PES ve KBR13017 uygun derişimleri hesaplanarak DMSO çözücüsünde çözüldü. Oluşan karışımı homojen hale getirmek için vorteks uygulandı.

Platelerin içindeki DMEM karışımı uzaklaştırılarak plate PBS ile yıkandı. Sonrasında hesaplanan miktarda DMEM ve ilaç çözeltisinden ilave edildi. 96 kuyucuklu plateler ilaç ve kontrol uygulaması sonrasında inkübatöe koyularak 24 saat bekletildi.

### **5.9 Hücre Proliferasyon Testi (XTT Testi) Uygulanması**

Ticari olarak ATTC'den satın alınan XTT kiti ile çalışma protokolü uygulandı.

#### **İlk gün:**

1. Hücre yoğunluğu fazla olan flasklar seçilerek 3 ml Tripsin-EDTA solüsyonu 4-5 dakika 37°C/5% CO<sub>2</sub> etüvde tripsinlenmesi sağlandı. Ardından tripsini inhibe etmek için DMEM–Dulbecco's Modified Eagle Medium tripsin hacminin 2 katı ilave edildi ve steril falkon tüpte 1000 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi.
2. Santrifüj sonunda medium uzaklaştırılacak ve dipte çöken hücreler 1ml mediumda tekrar süspansiyon edildi. Sonrasında ml başına hücre miktarı sayıldı ve kaydedildi.  
96 kuyucuklu platede her kuyucukta 2000 hücre sayımı yapılmalıdır.
3. Seyreltme:  $C1.V1=C2.V2$  formülüyle gerekli seyreltme yapılarak ml başına 25.000 hücre stoğu hazırlandı. Hücreleri seyreltmek için DMEM–Dulbecco's Modified Eagle Medium kullanıldı. (tercihen medium fenol kırmızısı içermelidir.)
4. Her kuyucuğa 200 µl hücre ve DMEM+ %10FBS karışımı eklenecek ve 24 saat 37°C ve 5% CO<sub>2</sub> etüvde inkübe edildi.

#### **İkinci gün:**

5. 96 kuyucuklu platelerdeki DMEM+FBS karışımı atıldı ve PBS ile yıkama yapıldı.

6. İnhibitörlerin stok konsantrasyonlarından gerekli hesaplamalar yaparak seyreltmeler sonucu kullanılacak inhibitör konsantrasyonu bulundu. Bulunan derişimden başlayarak üçlü tekrarlar yaparak gittikçe seyreltildi.
7. Her kuyucuğa son hacim 200 µl DMEM+%10FBS+İnhibitör karışımı eklenecektir. 24 saat ve 48 saatlik inkübasyonlar uygulanacaktır. KBR1307 konsantrasyonu sabit tutulup PES-Tamoksifen dozları değiştirildi ve PES-Tamoksifen konsantrasyonu sabit tutulup KBR1307 inhibitörlerinin konsantrasyonları değiştirilerek MCF-7 hücrelerine bu şekilde ilaç inkübasyon uygulamaları yapıldı.

### **Üçüncü gün:**

8. Platelere bulunan DMEM+FBS+inhibitör karışımı laminar flow kabinde dikkatlice uzaklaştırıldı. PBS ile yıkama yapıldı.
9. XTT Reaktif ve XTT Aktivatörü karıştırılarak XTT Çalışma Çözeltisi hazırlandı. Buna göre her 5 ml XTT Reaktifine 100 µl XTT Aktivatörü ilave edilerek XTT Çalışma Çözeltisi oluşturuldu.
10. Her kuyucuğa 100 µl fenol kırmızısı içermeyen DMEM ve 50 µl XTT Çalışma Çözeltisi eklenecektir.
11. Platelere 37°C/5% CO<sub>2</sub> inkübatörde 4 saat inkübe edildi. 4 saat sonunda 450 nm dalga boyunda absorbansı okundu.  
XTT testi kolorimetrik bir yöntemdir ve metabolik aktivite arttıkça boya yoğunluğuda artacaktır. 4 saat sonra gözlenecek turuncu kuyucuklar canlı hücrelerin mitokondrial dehidrogenaz enziminin XTT tetrazolyum kristalini substrat olarak kullanıp XTT formazon yapısına dönüşümü sonucu oluşacaktır. Bu turuncu kuyucukların olması canlı hücre aktivitelerinin hala devam ettiğini gösterir ancak renksiz kuyucuklar da canlılık kaybedilmiş ve inhibitörlerin etkinliği gözlenmiş olacaktır.
12. Elde edilen data ile inhibitörlerin IC<sub>50</sub> değerleri saptandı ve etkin doz tespit edildi.

### **5.10 Hücre Süpernatanlarının Eldesi:**

IC50 değeri belirlenen inhibitörlerden etkin çıkan dozlar 25 cm<sup>2</sup> lik flasklarda yetiştirilen MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarına DMEM ilave edilmeden sonra gereken miktarda eklendi ve 24 saat veya 48 saat inkübe edildi. Ardından inhibitör tarafından defekte uğrayan hücre ve DMEM karışımı steril falkon tüpte 2000 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi ve yapılacak işlemlere kadar -80 derece saklandı.

### **5.11 HPLC Sisteminde Referans Olarak Kullanılan Standart Kimyasallar ve Metabolik Farklılıklar:**

Sıvı kromatografisi için Merck / VWR'den (Darmstadt, Almanya) satın alınan metanol LiChroSolv, hipergrad kullanıldı. Kurum içi çift damıtma sisteminden çift distile su kullanıldı. Kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik ölçüdedir.

Kullanılan standartlar ile (mali olarak sınırlı bir bütçe kullanıldığı için) MCF-7 hücreleri üzerinde PES, KBR1307, tamoksifen ve kombinasyonlarının arasında oluşan farklar belirlenememiştir.

HPLC ayırma ve hücre kültürü süpernatantlarında bileşik tanımlama için referans olarak kullanılan standartlar: DHU, y, C, U, A, m 1 A, m 6 A, I, m 1 I, G, m 3 C, 5-metilsitidin ( m, 5 ° C), m 1 G, K 2 -methylguanosine (m 2 G) m 2 2 G, m 3 u, m 5 U, X, N- 4 -acetylcytidine (AC 4 ° C), t 6 A, m 2 2,7 G, MTA, AICA riboside, SAM, SAH, nikotinamid (MS 3 için taban standardı NA-R), imidazol-4-asetik asit (sodyum tuzu, MS taban standardına parçalanma karşılaştırma 3 IAA-R ile parçalanma karşılaştırılması) ve adenilosüksinik asit (sodyum tuzu, MS taban standardına 3 N parçalanma karşılaştırma 6 -succinyloadenosine ( K 6 -SAR).

### **5.12 Hücre Kültürü Süpernatantından Nükleozitlerin Ekstraksiyonu ve Yapısal Olarak İlişkili Bileşikler:**

Bileşik tanımlama işlemi için yarı kantitatif metabolit analizi LC-MS sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. HPLC ayrışmasından önce metabolitler hücre kültürü süpernatantlarından cis-diol spesifik affinite kromatografisi ile fenilboronik asit jeli uygulanarak izole edildi.

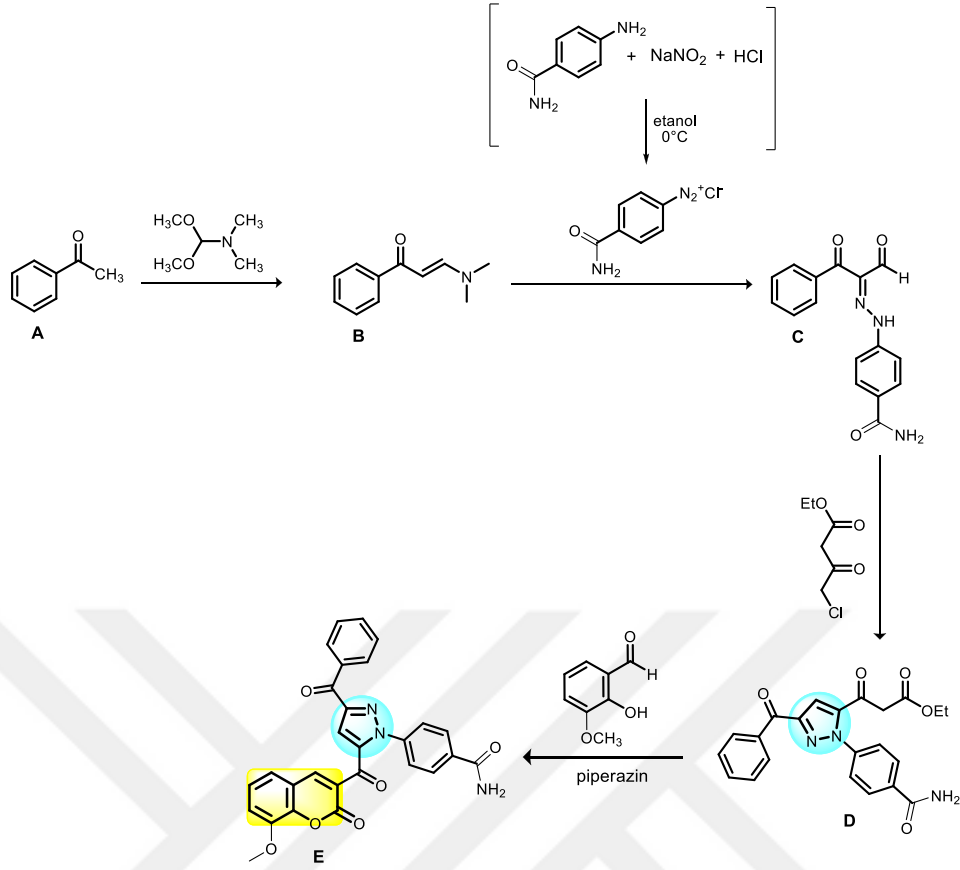


Bu yöntem Liebich ve arkadaşları tarafından 1997 yılında geliştirildi. 10 ml hücre kültürü süpernatantı, 100 ul iç standart çözeltisi (0.25 mM izoguanosin) ile yükseltilmiş, % 2.5 amonyak çözeltisi ile pH 8.8'e alkalize edildi ve daha sonra sütuna konuldu. (500 mg Affigel boronat, kolon boyutları: 150 × 15 mm). Nükleozitler ve yapısal olarak ilgili bileşikler, tersine çevrilebilir ve özellikle riboz yapısında bulunan cis-diol grubunda bağlanır. 25 mL amonyum asetat çözeltisi (0.25 mM, pH 8.8) ve 6 ml metanol / su (1: 1, v / v) ile yıkandıktan sonra, metanol / su içinde 50 mL 0.2 M formik asit ile elüsyon oluşturuldu (1: 1, v / v). Çözücü bir döner buharlaştırıcı kullanılarak çıkarıldı ve nükleositler tekrar 0.5 ml amonyum format çözeltisi (5 mM, pH 5) içinde çözüldü. Kalıntıların 10 mcL'si HPLC-MS sistemine enjekte edildi.

## **6. BULGULAR**

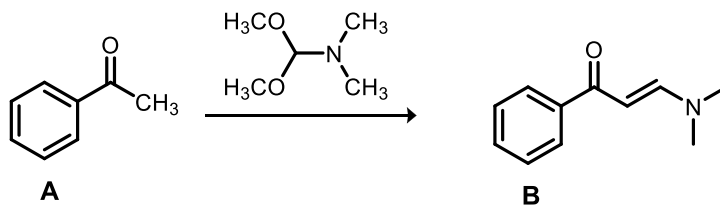
### **6.1. Dizayn edilen inhibitörün sentez edilmesi**

Belirlenen aday inhibitörümüz Bozok Üniversitesi organik Kimya A.D öğretim üyesi Doç. Dr. İrfan Koca tarafından sentez edildi (Şekil 3.6).



Şekil 25. KBR1307 inhibitörünün sentez şeması

### 6.1.1. (E)-3-(dimetilamino)-1-fenilprop-2-en-1-on (B) bileşiğinin sentezi

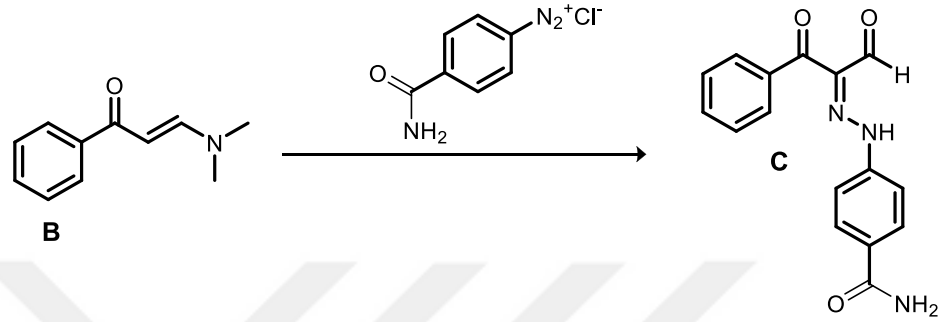


Şekil 26. (E)-3-(dimetilamino)-1-fenilprop-2-en-1-on (B) bileşiğinin sentezi

100 ml'lik tepkime balonuna 1 mmol asetofenon ve 1,2 mmol dimetilformamitdimetilasetal (DMF-DMA) reaktifi konuldu. Daha sonra bu karışım üzerine 20 ml ksilen ilave edildi. Tepkime karışımı manyetik karıştırıcı üzerinde ve geri soğutucu altında 24 saat süreyle kaynatıldı. Tepkimenin tamamlanıp tamamlanmadığı Insight Segmentation and Registration Toolkit (ITK) ile takip edildi. Tepkime sonunda reaksiyon balonu buzdolabında bir gün süreyle soğumaya bırakıldı. Bu işlemde sonra reaksiyon balonunda çöken katı madde su trompu yardımıyla vakum yapılarak süzüldü.

Sarı renkli ham ürün 45°C'lik etüvde kurutulduktan sonra devam reaksiyonlarda kullanıldı.

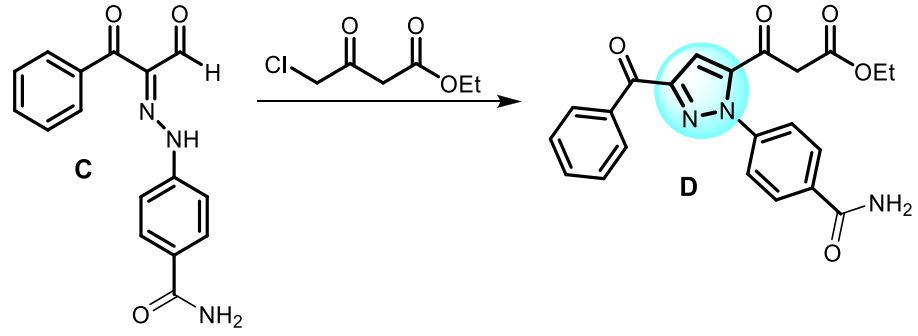
**6.1.2. (E)-4-(2-(1,3-diokso-1-fenilpropan-2-yliden)hidrazinil)benzait (C) bileşiğinin sentezi**



**Şekil 27** (E)-4-(2-(1,3-diokso-1-fenilpropan-2-yliden)hidrazinil)benzait (C) bileşiğinin sentezi

Bir mmol 4-aminobenzamid asidik ortamda (HCl) amin tuzuna dönüştürüldükten sonra eşdeğer miktardaki sodyumnitritin sudaki çözeltisiyle 0°C'de reaksiyona sokularak diazonyum tuzuna dönüştürüldü. Bu diazonyum tuzu çözeltisi, sıcaklığı 0°C'de sabitlenen reaksiyon balonundaki (E)-3-(dimetilamino)-1-fenilprop-2-en-1-on (1mmol, B) ile sodyumasetatın (1 mmol) etanoldeki çözeltisine damla damla ilave edildi. Beş dakika sonunda reaksiyon ortamında çöken sarı renkli diazo bileşiği (C) su trompu yardımıyla vakum yapılarak süzüldü. Ham ürün etanolle yıkandıktan sonra devam reaksiyonlarda kullanıldı.

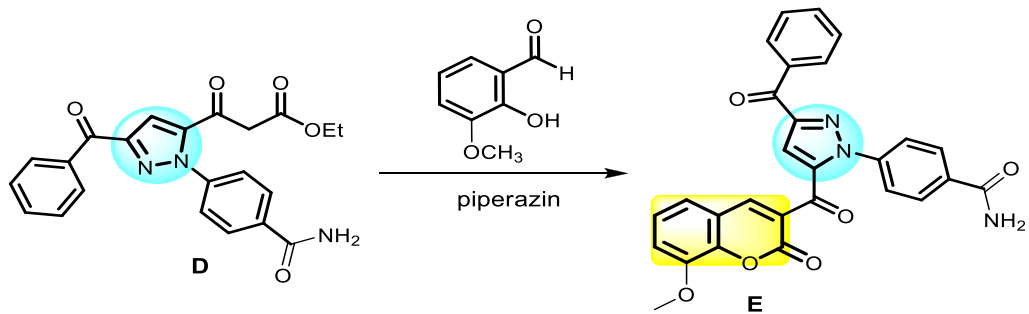
**6.1.3. Etil 3-(3-benzoil-1-(4-karbamoilfenil)-1H-pirazol-5-il)-3-oksopropanoat (D) bileşiğinin sentezi**



**Şekil 28.** Etil 3-(3-benzoil-1-(4-karbamoilfenil)-1H-pirazol-5-il)-3-oksopropanoat (D) bileşiğinin sentezi

C türevi bileşik (1,00 mmol) 40 ml asetonda çözüldü. Üzerine 1,20 mmol etil-4-kloro-3-oksobütanoat ve 1,00 mmol potasyumkarbonat eklendi. Tepkime karışımı manyetik karıştırıcı üzerinde ve geri soğutucu altında 24 saat süreyle kaynatıldı. Tepkimenin tamamlanıp tamamlanmadığı İTK ile takip edildi. Bu süre sonunda reaksiyon ortamındaki çözünmeyen madde filtrasyonla süzülerek uzaklaştırıldı. Daha sonra süzütünün çözücüsü döner buharlaştırıcı vasıtasıyla uzaklaştırıldı. Geride kalan ham ürün üzerine 1-propanol eklenerek yarım saat oda sıcaklığında karıştırıldı ve çöken ürün su trompu yardımıyla vakum yapılarak süzüldü. Ham ürün 1-propanol kullanılarak kristallendirildikten sonra önce 55°C'deki etüvde kurutuldu. Daha sonra vakum desikatöründe, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> üzerinde, 3 gün bekletilerek çözücü buharları ve nemin maddeden olabildiğince uzaklaşması sağlandı.

#### 6.1.4. -(3-benzoil-5-(8-metoksi-2-okso-2H-kromen-3-karbonil)-1H-pirazol-1-il) benzamit (E) bileşiğinin sentezi



**Şekil 6.1.4.** -(3-benzoil-5-(8-metoksi-2-okso-2H-kromen-3-karbonil)-1H-pirazol-1-il) benzamit (E) bileşiğinin sentezi

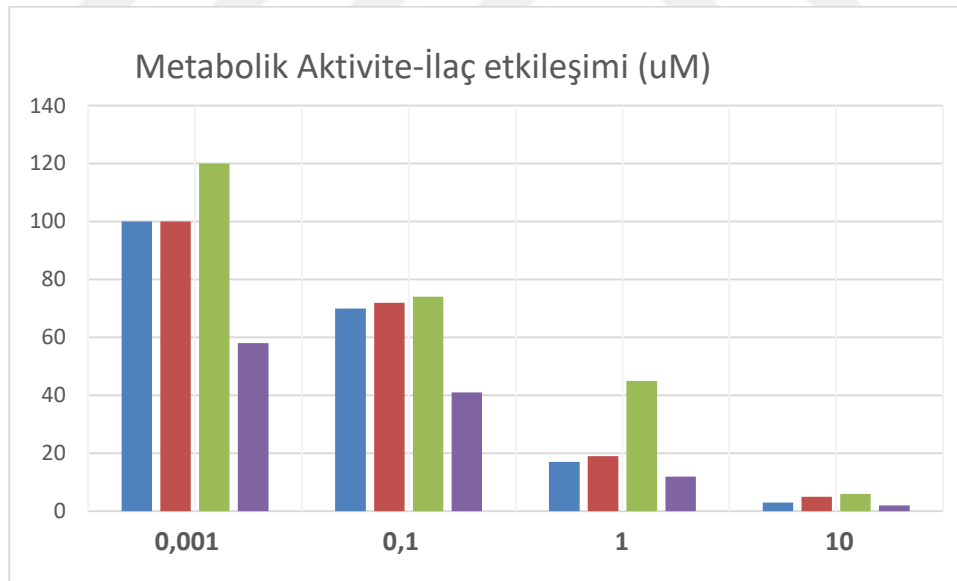
100 ml'lik reaksiyon balonuna D bileşiği (1 mmol), eşdeğer miktarda 2-hidroksi-3-metoksibenzaldehit (1 mmol) reaktifi ve 30 mL metanol konularak oda sıcaklığı koşullarında homojen bir karışım oluşturuldu. Bu karışıma katalitik miktarda piperazin

ilave edildi. Tepkime karışımı manyetik karıştırıcı üzerinde ve geri soğutucu altında üç saat süreyle kaynatıldı. Tepkimenin tamamlanıp tamamlanmadığı İTK ile takip edildi. Tepkime sonunda reaksiyon ortamında çöken sarı renkli ürün su trompu yardımıyla süzülerek alındı. Ham ürün, sırasıyla kloform, asetonitril ve dietileterle yıkandı. Daha sonra DMF-Su (20:1) çözücü çifti ile kristallendirilerek saflaştırıldı. Saflaştırılan ürün 55°C'deki etüvde kurutuldu. Daha sonra vakum desikatöründe, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> üzerinde, 3 gün bekletilerek çözücü buharları ve nemin maddeden olabildiğince uzaklaşması sağlandı (116Z053 numaralı proje).

## 6.2. KBR1307 ile PES'in Tek başına ve Klinik İlaç ile kombinasyonu Sonucu MCF-7 Metabolik Aktivitesi

Sırasıyla KBR1307, PES, tamoksifen ve KBR1307+tamoksifen Kombinasyonunun MCF-7 sağ kalımına etkisi belirlenmiştir.

**Tablo 6.** KBR1307, PES, Tamoksifen ve KBR1307+tamoksifen Kombinasyonunun MCF-7 Sağ Kalımına Etkisi

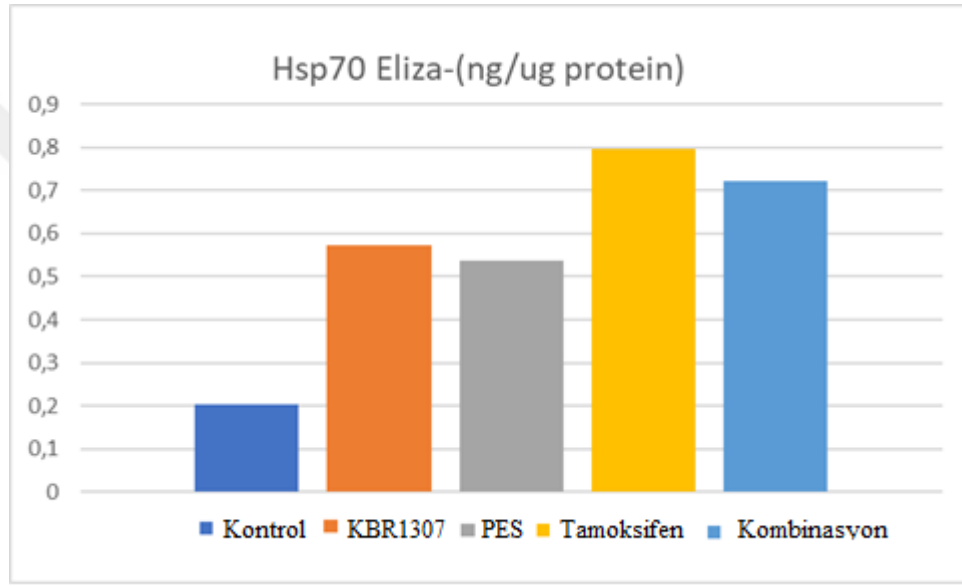


Tamoksifen tek başına etkinliği kısıtlı olmasına rağmen KBR1307 ile etkileşimi 1 uM konsantrasyonda sinerjetik etkisini göstermektedir.

### 6.3. ELİZA yöntemi ile MCF-7 Hücre Hattında Hsp70 Aktivitesinin Belirlenmesi

XTT yöntemi ile MCF-7 hücre hattında KBR1307 bileşiği, PES ve KBR1307-tamoksifen kombinasyonu etkisi Hsp70 inhibisyon profilleri belirlendi. Hiçbir ilaç eklenmemiş MCF-7 hücreleri kontrol olarak kullanıldı (Human HSP70 Platinum Elisa kit).

**Tablo 7.** ELİZA yöntemi ile MCF-7 Hücre Hattında Hsp70 Aktivitesinin Belirlenmesi



İnhibitörler ve klinik ilaç varlığında Hsp70 protein ifadesi artmaktadır. Bu sonuç farklı Hsp70 izoformlarından kaynaklanmaktadır. Stres altında indüklenebilir Hsp70 yapısında artış beklenen bir etkidir.

#### 6.4. İnhibitörlerin Hsp70 ATP hidrolizi üzerindeki etkileri

**Tablo 8.** İnhibitörlerin Hsp70 ATP hidrolizi üzerindeki etkileri

	ATP Hidroliz (nmol/mg/dk)
HSP70	0,87
KBR1307 + HSP70	1,28
Hücre lizati	18
KBR1307 + Hücre lizati	6,98
PES + HSP70	1,08
PES + Hücre lizati	14,2
KBR1307 + tamoksifen	7,25

Deneyler laboratuvarımızda HSP sistemleri için optimize edilen ATP/NADH eşlenik tepkimeleri ile gerçekleştirildi. Bu deneyde ATP hidrolizi NADH'ın yükseltilmesine eşlendi. ATP hidrolizi sonrası fosfoenolpiruvat, piruvat kinaz (PK) ile piruvata çevrilir. Bu esnada ADP ATP'ye çevrilir. Piruvat laktatdehidrogenaz (LDH) ile laktata çevrilir. Bu çevrimde yükseltgenen NADH molekülünün 340 nm'de absorbansı ölçülerek ATP hidrolizi belirlenir.

Deneyde saflaştırılmış 10 µg/µl nükleotit içermeyen protein 37 °C de 5 dakika 500 µl, pH 7.4 reaksiyon karışımında (50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM NADH, 0,5 mM PEP, 18 ünite LDH, 24 ünite piruvat kinaz/1 ml) inkübe edildi. 10 dakikalık hidroliz sonucu 340 nm de absorbans ölçümleri alındı ve ATP hidrolizleri hesaplandı (116).

KBR1307 Hsp70 ATP hidrolizini etkilemektedir. Hücre lizati içerisindeki diğer Hsp proteinleri hidrolizi artırsalar da KBR1307 ATP hidrolizini düşürerek etkisini göstermektedir. Klinik ilaç ATP hidrolizine anlamlı bir katkı sağlamamaktadır. Dolayısı ile kombinasyon etki proteinin farklı makromoleküller ile etkileşiminde pertürbe yaptığı kanısına ulaşılmıştır.

## 7. TARTIŞMA-SONUÇ

Bu çalışma ile Hsp70 inhibisyonu gerçekleştirilerek metabolik hızları oldukça yüksek kanser hücrelerinin inhibe edilerek kanserin progresyonu ve proliferasyonunun düşürülmesi planlanmıştır. Bu kapsamda daha önce tamamladığımız TÜBİTAK projelerinden elde ettiğimiz KBR1307 molekülü klinik ilaç tamoksifen ve piyasada bulunan Hsp70 substrat bağlanma domaini inhibitörü PES ile karşılaştırılmıştır.

KBR1307 oldukça etkin bir inhibitör olmasına rağmen klinik ilaçlar ile sinerjetik etki yapması potansiyel bir ilaç olma yolunda biyokimyasal parametreleri oldukça olumlu olan umut vaat edici bir moleküldür.

Hücre kültürü deneyleri ile yapılan kombinasyon çalışmaları dirençli kanser hücrelerinde denenerek trastuzumab etkisinin minimize edileceği düşünülmektedir. Yapı sinerjik etki göstermesi diğer kanser türlerindeki klinik ilaçlar ile kombinasyonunun potansiyel tedavi etkisinin bulunması ve artırılmasını sağlayabilecektir.

Farklı biyokimyasal deneyler karşılaştırıldığında moleküler mekanizmanın oldukça karmaşık bir yolak izleyebileceği anlaşılmaktadır; ATP hidrolizi ve Hsp70 protein ifadesi hücre kültüründe belirlenen sinerjiye tekabül etmemektedir. Buna rağmen Hsp kompleksinin farklı izoformlarının olması ve koşaperonların varlığı mekanizmanın zaten kompleks yapısını daha komplike bir hale getirmektedir.

KBR107'nin bu çalışma ile ortaya çıkarılan sinerjetik etkisi arayüz inhibitörü olduğu düşünüldüğünde kanser biyolojisi ve ilaç tasarımı için iyi bir hedeftir. Yapılacak komplementer deneyler moleküler mekanizmanın detaylarını ortaya çıkarabilecektir.

KBR1307 meme kanseri üzerine tanımlansa da farklı kanser hatları üzerine denemeleri devam etmektedir. Patentleme sürecinde olan molekül ile yeni yapıların ortaya çıkarılması beklenmektedir.



Küçük moleküller ile yapılan protein inhibitörlerinde klasik anlayıştan farklı olarak arayüz etkileşimlerinin engellenmesi özellikle protein kompleksleri ile aktive olan biyokimyasal yollar için etkin bir ilaç geliştirme metodu olmaktadır. Bu arayüz inhibitörleri aynı zamanda ATP ligandının pertürbe ederek kendisinin bağlanması inhibisyonu güçlendirmektedir. HSP kompleksleri farklı biyokimyasal mekanizmalara etki etmesi ve tümör hücrelerinin sağkalımına yardımcı olduklarından etkin şekilde inhibisyonu tedavi yaklaşımlarını güçlendirmektedir. Ayrıca direnç mekanizmalarında rol alan yapılar HSP komplekslerinin substratları olmasından dolayı geliştirilen inhibitörler zaman içerisinde gelişen direnç mekanizmalarını etkisiz hale getirmekte önemli rolleri olacaktır. Benzer şekilde bu inhibitörlerin klinik ilaçlarla oluşturduğu sinerji, tedavinin etkinliğini artırmada önemli rol alacağından yaptığımız bu çalışmanın önemi ortaya çıkmaktadır. Metabolitlerin etkileri yapılacak ileri çalışmalarla ortaya çıkarılması ve ilaç mekanizmalarındaki etkilerinin belirlenmesi özellikle çoklu hedefler ile oluşturulan ilaç kokteyllerinin daha etkin olmasını ve kişiye özel kokteyl ilaç tasarımını kolaylaştıracaktır.

## 8. KAYNAKLAR

[1] Arslan S, Bölükbaş N. Kanserli hastalarda yaşam kalitesinin değerlendirilmesi.

Atatürk Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi, 2003, 6: 38-47.

[2] Sağlıkın Teşviki ve Geliştirilmesine Yönelik Dönüm Noktaları: Global Konferanslardan Bildiriler. 1. Baskı Nisan 2011, ANKARA

[3] [www.turkkanser.org](http://www.turkkanser.org)

[4] Kutluk T, Kars A. Kanser konusunda genel bilgiler.

<http://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/kanser.pdf>. 11 Temmuz 2013.

[5] Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics 2001. CA Cancer J Clin. 2001; 51:15–36.

[6] Hulka BS, Stark AT. Breast cancer: cause and prevention. Lancet. 1995; 346: 883–887.

[7] Hames, D. And Hooper, N.(2010). Biyokimya, Tutar, Y.and Geçgil, H. And Karataş, M., Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 44-49

[8] Fiaux J, Horst J, Scior A, Preissler S, Koplín A, Bukau B, Deuerling E. Structural analysis of the ribosome-associated complex (RAC) reveals an unusual Hsp70/Hsp40 interaction. J Biol Chem. 2010 Jan 29;285(5):3227-34.

[9] Rutkowska A, Beerbaum M, Rajagopalan N, Fiaux J, Schmieder P, Kramer G, Oschkinat H, Bukau B. Large-scale purification of ribosome-nascent chain

complexes for biochemical and structural studies. FEBS Lett. 2009 Jul 21;583(14):2407-13.

[10] Calderwood SK, Khaleque A, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. Trends in Biochemical Sciences 2006; 3(31):164-72.

[11] Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. Review. Cell Mol Life Sci 2005; 62:670–684.

[12] Sherman M, Multhoff G. Heat Shock Proteins in Cancer. Ann NY Acad Sci 2007;1113:192–201.

[13] Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. Trends Biochem Sci. 2006 Mar;31(3):164-72.

[14] Workman P. Altered states: selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone. Trends Mol Med 2004; 10: 47–51.

[15] Granchi C, Fancelli D, Minutolo F. An update on therapeutic opportunities offered by cancer glycolytic metabolism. Bioorg Med Chem Lett 2014; 24: 4915-4925.

[16] Salamon S, Podbregar E, Kubatkac P, et al. Glucose metabolism in cancer and ischemia: Possible therapeutic consequences of the warburg effect. Nutrition and Cancer 2017; 69: 177-183.

[17] Bullinger D. et al. Metabolic signature of breast cancer cell line MCF-7: profiling of modified nucleosides via LC-IT MS coupling. BMC Biochemistry 2007, 8:25.

[18] Oakman C. et al. Uncovering the metabolomic fingerprint of breast cancer. *Send to Int J Biochem Cell Biol.* 2011 Jul;43(7):1010-20.

[19] Granato M. et al. HSP70 inhibition by 2-phenylethanesulfonamide induces lysosomal cathepsin D release and immunogenic cell death in primary effusion lymphoma. *Cell Death and Disease* (2013) 4, e730; doi:10.1038/cddis.2013.263.

[20] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.

[21] P. Boyle, J. Ferlay; Cancer incidence and mortality in Europe, 2004, *Annals of Oncology*, Volume 16, Issue 3, 1 March 2005, Pages 481–488,

[22] Atıcı, E. Tıp tarihinde kanser ve lösemi. *Türk onkoloji dergisi*, 2007. 22(4), 197-204.

[23] Suzuki, H., Asakawa, A., Amitani, H., Fujitsuka, N., Nakamura, N., & Inui, A. (2013). Cancer cachexia pathophysiology and translational aspect of herbal medicine. *Japanese journal of clinical oncology*, 43(7), 695-705.

[24] Kutluk, T. (1996). *Kanser konusunda genel bilgiler*. TC Sağlık Bak. Kanser Savaş Daire Bşk. Türk Kanser Arş. ve Savaş Kurumu.

[25] Taş, M. (2010). Kanserli olgularda mikronukleus sıklığının belirlenmesi ve mikronukleusların orijininin MN+ FISH yöntemi ile değerlendirilmesi (Master's thesis, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

[26] YOKUŞ, B., & ÇAKIR, D. Ü. (2012). Kanser biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (1), 7-18.

[27] Aslan G. Tümör immünolojisi. Turkish Journal of Immunology, 2010, 15: 7-13.

[28] Gündüz E, Gündüz M, Beder L, Yamanaka N, Şımızı K, Nagatsuka H. p53 tümör baskılayıcı genin 72. kodon polimorfizminin baş-boyun kanserlerindeki prognostik rolü. Yeni Tıp Dergisi, 2009, 26: 96-101.

[29] KARAMAN, A. (2003). Mide kanserinde p53 tümör supresör geninin rolü. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 23(1), 67-73.

[30] Yılmaz E, Altunok V. Kanser ve p53 geni. Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2011, 1: 19-23.

[31] Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, and Harris CC.. Mutations in the p53 Tumor Suppressör Gen: Clues to Canser Etiyoloji and Molecular Pathogenesis. Canser Research 1994; 54:4855-78.

[32] Gelmann EP. Oncogenes in human breast Cancer. In: The Breast: Comprehensive management of benign and malignant Diseases. Vol I. Ed: Bland KI, Copeland EM. WB saunders Company, USA, 1998, p:499-517.

[33] Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenec and tumorsupressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapetic applications. Oncologist. 9:361-77,2004.

[34] <http://dijitalpatoloji.medicine.ankara.edu.tr>

[35] Güllüoğlu, M. (2000). Dizdaroğlu F. Tümör anjiogenezi, Ulusal Cerrahi Dergisi, 16, 279-290.

[36] Fidler IJ. Angiogenesis and cancer metastasis. *CancerJ Sci Am*, 6 Suppl 2:S134-S141, 2000.

[37] AKBULUT, H. & YILDIRIM, İ. S. (1992). Kanser Metastazı Ve Antimetastatik Tedavi Yaklaşımları. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 12(6), 437-443.

[38] AK, D. (2006). Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri Olgularında Radyoterapinin Serum Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü ve Periferik Kan Trombosit Düzeyleri Üzerine Etkisi (tez). İstanbul: TC Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi.

[39] Freeman CS , Martin MR, Marks CL . An overview of tumor biology. *Cancer Investigation* 1990; 8(1 ):71 -90.

[40] Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.

[41] Abercrombie, M. (1970). Contact inhibition in tissue culture. *In vitro*, 6(2), 128-142.

[42] Kim, J. W., & Dang, C. V. (2006). Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer research*, 66(18), 8927-8930.

[43] Pavlides, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A. K., Frank, P. G., ... & Pestell, R. G. (2009). The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell cycle*, 8(23), 3984-4001.

[44] Zetter, B. R. (1998). Angiogenesis and tumor metastasis. *Annual review of medicine*, 49(1), 407-424.

[45] Liotta, L. A., Steeg, P. S., & Stetler-Stevenson, W. G. (1991). Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, 64(2), 327-336.

[46] Hirayama, A., Kami, K., Sugimoto, M., Sugawara, M., Toki, N., Onozuka, H., ... & Esumi, H. (2009). Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer research*, 69(11), 4918-4925.

[47] Kleeff, J., Beckhove, P., Esposito, I., Herzig, S., Huber, P. E., Löhr, J. M., & Friess, H. (2007). Pancreatic cancer microenvironment. *International journal of cancer*, 121(4), 699-705.

[48] Cahill, D. P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Lengauer, C. (1999). Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends in cell biology*, 9(12), M57-M60.

[49] Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7), 1073-1081.

[50] Bower, J. E. (2008). Behavioral symptoms in breast cancer patients and survivors: fatigue, insomnia, depression, and cognitive disturbance. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(5), 768.

[51] <https://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/kanser.pdf>

[52] <http://bilheal.bilkent.edu.tr>

[53] Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C., & Barton, M. (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 104(6), 1129-1137.

[54] Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., & Lowe, S. W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *cell*, 108(2), 153-164.

[55] Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., & Kroemer, G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature reviews immunology*, 8(1), 59.

[56] Canatan, H. (2013). İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ve hücre tedavisi. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 4(4), 550-561.

[57] Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.

[58] Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., ... & Cameron, D. (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 353(16), 1659-1672.

[59] Şakalar, Ç., İzgi, K., & Canatan, H. (2013). Kanser İmmün Terapi ve Monoklonal Antikorlar. *FÜ Sağ. Bil. Tıp Derg*, 27(2), 105-111.

[60] Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group. (2005). A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 353(26), 2747-2757.

[61] Dowsett, M., Cuzick, J., Ingle, J., Coates, A., Forbes, J., Bliss, J., ... & Coombes, C. (2009). Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of



aromatase inhibitors versus tamoxifen. *Journal of Clinical Oncology*, 28(3), 509-518.

[62] Göksoy E. (2001). Onkolojik Cerrahinin Temel İlkeleri. Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu. İstanbul.

[63] Bulak, H. (1999). Meme kanserinin cerrahi tedavisi. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 19(6), 352-357.

[64] Küçüköner, M., & Isikdogan, A. (2013). Kanser tedavisinde mTOR sinyal yolu ve mTOR inhibitörleri/mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in the treatment of cancer. *Dicle Tıp Dergisi*, 40(1), 156.

[65] Ataergin, A. S., Özet, A., & Arpacı, F. (1999). Kanser Tedavisinde Anjiyogenez İnhibitörlerinin Yeri. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 19(2), 100-105.

[66] Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., & Forman, D. (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *The lancet oncology*, 13(8), 790-801.

[67] Cancer Fact sheet February 2018. World Health Organization.

<http://www.who.int/en/newsroom/fact-sheets/detail/cancer>

[68] [http://www.tuik.gov.tr/basinOdasi/haberler/2017\\_24\\_20170504.pdf](http://www.tuik.gov.tr/basinOdasi/haberler/2017_24_20170504.pdf)

[69] <http://canceratlas.cancer.org/assets/uploads/2015/04/The-Cancer-Atlas-Second-Edition-in-Turkish1.pdf>

[70] <http://www.turkkanser.org/uploads/dosyalar/istatistikler/turkiye-kanser-istatistikleri.pdf>

[71] [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye\\_Kanser\\_Istatistikleri\\_2015.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf)

[72] Bilir, N. (2009). Türkiye Tütün Kontrolünde Dünyanın Neresinde?. Turk Toraks Dergisi/Turkish Thoracic Journal, 10(1).

[73] Tuncer, M. (2007). Kanser in ülkemiz ve dünyadaki önemi, hastalık yükü ve kanser kontrol politikaları. Türkiye’de Kanser Kontrolü, Sağlık Bakanlığı Yayınları, (707), 5-9.

[74] Gültekin, M., Özgül, N., Olcayto, E., & Tuncer, A. M. (2010). Türkiye’de palyatif bakım hizmetlerinin mevcut durumu. Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi, 13(1), 1-6.

[75] Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. cell, 144(5), 646-674.

[76] Cairns, R. A., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. Nature Reviews Cancer, 11(2), 85.

[77] Hsu, P. P., & Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. Cell, 134(5), 703-707.

[78] Weljie, A. M., & Jirik, F. R. (2011). Hypoxia-induced metabolic shifts in cancer cells: moving beyond the Warburg effect. The international journal of biochemistry & cell biology, 43(7), 981-989.

- [79] Marín-Hernández, A., López-Ramírez, S. Y., Mazo-Monsalvo, D., Gallardo-Pérez, J. C., Rodríguez-Enríquez, S., Moreno-Sánchez, R., & Saavedra, E. (2014). Modeling cancer glycolysis under hypoglycemia, and the role played by the differential expression of glycolytic isoforms. *The FEBS journal*, 281(15), 3325-3345.
- [80] Brahimi-Horn, M. C., Chiche, J., & Pouyssegur, J. (2007). Hypoxia and cancer. *Journal of molecular medicine*, 85(12), 1301-1307.
- [81] Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 378-389.
- [82] Semenza, G. L. (2004). Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. *Cancer cell*, 5(5), 405-406.
- [83] Das, S. K., Eder, S., Schauer, S., Diwoky, C., Temmel, H., Guertl, B., ... & Zimmermann, R. (2011). Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. *Science*, 333(6039), 233-238.
- [84] Santos, C. R., & Schulze, A. (2012). Lipid metabolism in cancer. *The FEBS journal*, 279(15), 2610-2623.
- [85] Wood, T. (1986). Physiological functions of the pentose phosphate pathway. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 4(4), 241-247.
- [86] Jiang, P., Du, W., & Wu, M. (2014). Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein & cell*, 5(8), 592-602.
- [87] Kısaçam, M. A., & Ozan, P. S. T. (2017). Kanser Hücrelerinin Metabolik İhtiyaçları ve Bağımlılıkları.

- [88] Erdamar, H., Kazancı, F., Gök, S. (2015). Kanserde Biyokimyasal Değişiklikler. Journal of Clinical and Analytical Medicine.
- [89] Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. science, 324(5930), 1029-1033.
- [90] <https://www.drozdogan.com/reseptor-nedir-kanserlesmede-ve-kanser-tedavilerinde-rolu-nedir/>
- [91] [http://www.tmhdf.org.tr/Uploads/Editor/files/MemeKanseri\\_KETEM.pdf](http://www.tmhdf.org.tr/Uploads/Editor/files/MemeKanseri_KETEM.pdf)
- [92] <http://e-kutuphane.teb.org.tr/pdf/mised/eylul05/8.pdf>
- [93] [http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/anasayfalinkler/belge/meme\\_ca\\_2014.pdf](http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/anasayfalinkler/belge/meme_ca_2014.pdf)
- [94] Eliyatkin, N., Yalçın, E., Zengel, B., Aktaş, S., & Vardar, E. (2015). Meme Karsinomunda Moleküler Sınıflama: Gelenekselden Yeni Döneme Yolculuk. Meme Sagligi Dergisi/Journal of Breast Health, 11(2).
- [95] Ünçel, M., Aköz, G., Yıldırım, Z., Pişkin, G., Değirmenci, M., Solakoğlu Kahraman, D., ... & Diniz, G. Meme Kanserinin Klinikopatolojik Özelliklerinin Moleküler Alt Tipe Göre Değerlendirilmesi.
- [96] Nursal, A. F. Triple Negatif Meme Kanserin Moleküler Temeli. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 24(2), 251-259.
- [97] Karaşar, P. (2013). Meme Kanseri Hücrelerinde Kostimülatör B7 Ailesi Ligandlarının Ekspresyonu ve Yardımcı T Hücre Yanıtları Üzerine Etkisi.

[98] Koçak, S., Çelik, L., Özbaş, S., Sak, S. D., Tükün, A., & Yalçın, B. (2011). Meme Kanserinde Risk Faktörleri, Riskin Değerlendirilmesi ve Prevansiyon: İstanbul 2010 Konsensus Rapor. Meme Sağlığı Dergisi/Journal of Breast Health, 7(2).

[99] Tello, S., Halifeoğlu, İ., Bozkurt, M., & Bulmuş, Ö. (2008). Meme Kanseri Oluşturulmuş Ratlarda Isırgan Otunun Total Antioksidan Durumu Üzerine Etkisi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi, 22, 179-183.

[100] Gedikli, S. (2013). Melatoninin MCF-7 Hücre Kültüründeki Apoptoz Aktivasyonunun ve Sitotoksitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), MTT Hücre Canlılık Testi ve İmmünohistokimya Yöntemleriyle Araştırılması (Doctoral dissertation).

[101] Yılmaz, E. (2018). MCF7 meme kanseri ve MCF10A normal epitel hücre soyunda propolisin etken maddelerinin sitotoksik ve apoptotik etkinliğinin değerlendirilmesi/Eren, Yılmaz; danışman Oğuz Öztürk.

[102] [http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/kadin\\_hast/dr\\_serkan\\_celik.pdf](http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/kadin_hast/dr_serkan_celik.pdf)

[103] Willmann, L., Erbes, T., Halbach, S., Brummer, T., Jäger, M., Hirschfeld, M., ... & Kammerer, B. (2015). Exometabolom analysis of breast cancer cell lines: Metabolic signature. Scientific reports, 5, 13374.

[104] Bullinger, D., Neubauer, H., Fehm, T., Laufer, S., Gleiter, C. H., & Kammerer, B. (2007). Metabolic signature of breast cancer cell line MCF-7: profiling of modified nucleosides via LC-IT MS coupling. BMC biochemistry, 8(1), 25.

[105] Oakman, C., Tenori, L., Biganzoli, L., Santarpia, L., Cappadona, S., Luchinat, C., & Di Leo, A. (2011). Uncovering the metabolomic fingerprint of

breast cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(7), 1010-1020.

[106] Sheikh, K. D., Khanna, S., Byers, S. W., Fornace Jr, A. J., & Cheema, A. K. (2011). Small molecule metabolite extraction strategy for improving LC/MS detection of cancer cell metabolome. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 22(1), 1.

[107] Brauer, H. A., Makowski, L., Hoadley, K. A., Casbas-Hernandez, P., Lang, L. J., Romàn-Pèrez, E., ... & Troester, M. A. (2013). Impact of tumor microenvironment and epithelial phenotypes on metabolism in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(3), 571-585.

[108] Hennes, C., Bullinger, D., Fux, R., Friese, N., Seeger, H., Neubauer, H., ... & Kammerer, B. (2009). Prediction of breast cancer by profiling of urinary RNA metabolites using Support Vector Machine-based feature selection. *BMC cancer*, 9(1), 104.

[109] Tang, X., Lin, C. C., Spasojevic, I., Iversen, E. S., Chi, J. T., & Marks, J. R. (2014). A joint analysis of metabolomics and genetics of breast cancer. *Breast cancer research*, 16(4), 415.

[110] [http://eczacilik.anadolu.edu.tr/bolumSayfalari/belgeler/Peptitveprotein.\\_20140402061928.pdf](http://eczacilik.anadolu.edu.tr/bolumSayfalari/belgeler/Peptitveprotein._20140402061928.pdf)

[111] Koolman, J., Röhm, K. H., Wirth, J., & Robertson, M. (2005). *Color atlas of biochemistry* (Vol. 2). Stuttgart: Thieme.

[112] Tutar, L., & Tutar, Y. (2010). Heat shock proteins; an overview. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(2), 216-222.

[113] Öncel, M. (2012). Isı Şok Proteinleri ve Kanser. Eur J Basic Med Sci, 2(1), 16-23.

[114] Öztürk, E., Kahveci, N., Özlük, K., & Yılmazlar, T. (2009). Isı şok proteinleri. Turkish Journal of Surgery/Ulusal Cerrahi Dergisi, 25(4).

[115] Gül, A., İnan, M. N., Kaya, D., Küçük, K., Tekin, C. G., & Yurtcu, E. Isı Şoku Proteinleri ve Kanser.

[116] Tutar, Y. (2006). Heat shock proteins, substrate specificity and modulation of function. Protein and peptide letters, 13(7), 699-705.

[117] Lianos, G. D., Alexiou, G. A., Mangano, A., Mangano, A., Rauseri, S., Boni, L., ... & Roukos, D. H. (2015). The role of heat shock proteins in cancer. Cancer letters, 360(2), 114-118.

[118] Tutar, Y. (2011). Hsp70 in oncology. Recent patents on DNA & gene sequences, 5(3), 214-218.

[119] <https://hsp70.com/structure/>

[120] Murphy, M. E. (2013). The HSP70 family and cancer. Carcinogenesis, 34(6), 1181-1188.

[121] McConnell, J. R., & McAlpine, S. R. (2013). Heat shock proteins 27, 40, and 70 as combinational and dual therapeutic cancer targets. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 23(7), 1923-1928.

[122] Sarkar, S., & Roy, S. (2017). A mini review on heat shock proteins (HSPs): special emphasis on heat shock protein70 (HSP70). BN Seal Journal of Science, 9(1), 130-9.

[123] <http://pdslab.biochem.iisc.ernet.in/hspir/hsp70.php>

[124] Höhfeld, J., Cyr, D. M., & Patterson, C. (2001). From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. EMBO reports, 2(10), 885-890.

[125] Chatterjee, S., & Burns, T. (2017). Targeting heat shock proteins in cancer: a promising therapeutic approach. International journal of molecular sciences, 18(9), 1978.

[126] Schlecht, R., Scholz, S. R., Dahmen, H., Wegener, A., Sirrenberg, C., Musil, D., ... & Bukau, B. (2013). Functional analysis of Hsp70 inhibitors. PloS one, 8(11), e78443.

[127] Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl JMed.2001;344:783–92.

[128] [https://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/cell\\_culture.pdf](https://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/cell_culture.pdf)

[129] <https://www.labome.com/method/Fetal-Bovine-Serum.html>

[130] <https://neu.edu.tr/wp-content/uploads/2016/06/S.Vatansever>

[131] Tokur, O., & Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksosite testleri. Harran Univ Vet Fak Derg 2017; 6 (1); 112, 118.



[132] Karabekir, G., Demircan, G., & Özdaş, Ş. (2017). Resveratrolün MCF-7 hücre soyunda apoptotik etkinin araştırılması. İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi, 3(1), 27-34.



## 9. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Merve Nur AL
Doğum Yeri ve Tarihi	Tokat-08/10/1994
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyokimya A.D. 58000-Sivas
E-posta Adresi	<a href="mailto:mervenur.al@hotmail.com">mervenur.al@hotmail.com</a>
<u>Eğitim ve Akademik Durumu</u>	
Lise	Tokat Arif Nihat Asya Lisesi, 2012
Lisans	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Biyokimya, 2016
Yüksek Lisans	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyokimya, 2019