

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) DOKTORA PROGRAMI

MEME KANSERİ HÜCRE DİZİSİNDE (MCF-7)
OLEUROPEİN VE D VİTAMİNİNİN ANTİPROLİFERATİF,
APOPTOTİK VE ANTIOKSİDAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Murat ARI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Aslıhan BÜYÜKÖZTÜRK KARUL

İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Serhan SAKARYA

Bu tez Aydın Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-17035 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Murat ARI tarafından hazırlanan “Meme kanseri hücre dizisinde (MCF-7) oleuropein ve D vitamininin antiproliferatif, apoptotik ve antioksidan etkilerinin araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/09/2018

Üye (T.D.)	: Prof. Dr. Aslıhan KARUL	ADÜ
Üye	: Prof. Dr. Serhan SAKARYA	ADÜ
Üye	: Prof. Dr. Cevval ULMAN	CBÜ
Üye	: Prof. Dr. Fatma TANELİ	CBÜ
Üye	: Doç. Dr. Özge ÇEVİK	ADÜ

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca en iyi Şekilde yetiŐmemi ve geliŐmemi sağlayan her zaman desteğini hissettiğim tez danıŐmanım Prof. Dr. Aslıhan KARUL'a başta olmak üzere, hocam Prof. Dr. Serhan SAKARYA'ya, zaman ve yardımlarını esirgemeyen Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakóltesi Biyokimya Anabilim Dalı ailesinin diğer üyelerine, ÖzgeNur YILMAZ'a, istatistik değerlendirmelerinde destek olan değerli dostum Hakan CENGİZ'e ve uzaklarda da olsa desteğini her zaman hissettiğim arkadaŐım Dr. Salih SARI'ya,

Doktora eğitimimde önemli pay sahibi olan başta eŐim Uzm. Dr. Hatice Feray ARI olmak üzere sevgili annem Nayile ARI ve rahmetli babam Arif ARI'ya,

Bu çalışmanın gerçekteŐmesi için gerekli maddi desteği Bilimsel Araştırmalar Projesi aracılığıyla sağlayan Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne, Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline ve bugünlere ulaŐmamda katkıda bulunan herkese en içten teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.1.1. Kanser Oluşumuna Etki Eden Faktörler.....	5
2.2. Meme Kanseri.....	9
2.2.1. Meme Anatomisi	10
2.2.2. Meme Kanseri Evreleri.....	11
2.2.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri	12
2.2.3.1. Obezite.....	13
2.2.3.2. Beslenme	13
2.2.3.3. Fiziksel aktivite.....	13
2.2.3.4. Alkol	13
2.2.3.5. Sigara	14
2.2.3.6. Genetik kalıtsal özellikler.....	14
2.2.3.6.1. BRCA1 ve BRCA2 genleri.....	14

2.2.3.7. Östrojen	15
2.2.3.8. Serbest radikaller ve oksidatif stres	15
2.3. Antioksidanlar	20
2.3.1. Endojen antioksidanlar	21
2.3.1.1. Enzimatik olanlar.....	21
2.3.1.2. Enzimatik olmayanlar.....	21
2.3.2. Ekzojen Antioksidanlar	21
2.4. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı	22
2.5. Hücre Ölüm Mekanizmaları	22
2.5.1. Apoptoz (Programlı Hücre Ölümü).....	22
2.5.2. Nekroz	24
2.5.3. Apoptozda Görülen Morfolojik Değişiklikler	27
2.5.4. Kaspaz Aktivasyon Mekanizması	28
2.6. Oleuropein	29
2.6.1. Oleuropeinin Antikanserojenik ve Apoptotik ve Etkisi	31
2.7. Vitamin D	32
2.7.1. Vitamin D'nin Antikanserojenik ve Apoptotik Etkisi.....	37
2.7.2. Vitamin D ve Meme Kanseriyle ilgili Pre-Klinik Çalışmalar	38
2.7.3. Vitamin D ve Hücre Büyümesinin Durması ile İlişkisi.....	38
2.7.4. Vitamin D ve İnvazyon ve Metastazın İnhibisyonuna Etkisi	38
2.7.5. Vitamin D ve Anti-İnflamasyon Etkisi.....	38
2.7.6. Vitamin D ve Östrojen Yolağı İnhibisyonu.....	39
2.7.7. Vitamin D ve Epidemiyolojik Çalışmalar	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	40
3.1. Kullanılan Malzemeler	40
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	41

3.3. Kullanılan Çözeltiler.....	42
3.4. Deney Düzenineğinin Oluşturulması.....	42
3.4.1. Hücrelerin Çözdürülmesi.....	42
3.4.2. Hücrelerin Pasajlanması	43
3.4.3. Hücrelerin Sayılması ve Canlılık Kontrolü	44
3.4.4. Hücrelerin Dondurulması	46
3.4.5. MCF-7 Hücreleri İçin Complete Medium Hazırlanması.....	47
3.4.6. MCF-7 Hücrelerinin Kullanımı	47
3.4.7. Oleuropein Dozunun Belirlenmesi	47
3.4.8. Vitamin D Dozunun Belirlenmesi	48
3.4.9. Hücre Proliferasyon Analizi	49
3.4.9.1. WST-1 Testi (Water Soluble Tetrazolium Test)	49
3.4.10. Apoptotik Analizler	51
3.4.10.1. Anneksin V testi	52
3.4.10.2. Kaspaz-3/7 testi	53
3.4.11. Biyokimyasal Analizler	56
3.4.12. BCA Protein, SOD, GPx, MDA ve NO Analizleri için Hücrelerden Lizat Eldesi	57
3.4.12.1. Total protein tayini	59
3.4.12.2. Biyokimyasal TOS ve TAS analizleri	60
3.4.12.3. SOD aktivite tayini	62
3.4.12.4. G-Px aktivite tayini.....	64
3.4.12.5. MDA tayini.....	66
3.4.12.6. NO tayini	67
3.5. İstatistiksel Yöntemler.....	71
4. BULGULAR	72
4.1. Hücre Canlılığı Değerlendirme Bulguları	72

4.1.1. Etkin Oleuropein Dozunun Belirlenmesi	72
4.1.2. Etkin Vitamin D Dozunun Belirlenmesi	74
4.1.3. Oleuropeinin Anti-proliferatif Etkisinin WST-1 Yöntemiyle Belirlenmesi.....	76
4.1.4. Vitamin D'nin Anti-proliferatif Etkisinin WST-1 Yöntemiyle Belirlenmesi	78
4.2. WST-1 Yöntemiyle Elde Edilen Sitotoksosite Sonuçları.....	80
4.3. Apoptoz Değerlendirme Sonuçları	80
4.3.1. Anneksin V Testi Sonuçları.....	82
4.3.2. Kaspaz 3/7 Testi Sonuçları	83
4.4. Biyokimyasal Analizler	84
4.4.1. Total Protein Analizi Sonuçları	84
4.4.2. Biyokimyasal Total Oksidan ve Total Antioksidan Kapasitesi Analizi Sonuçları.....	85
4.4.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Sonuçları.....	89
4.4.4. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivite Sonuçları	90
4.4.5. Malondialdehit (MDA) Analizi Sonuçları.....	91
4.4.6. Nitrik Oksit (NO) Analizi Sonuçları	92
5. TARTIŞMA.....	93
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	112
KAYNAKLAR.....	115
ÖZGEÇMİŞ.....	136

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BCA	: Bicinchoninic asit
BMI	: Vücut kitle indeksi
BSA	: Sığır serum albumin
CAT	: Katalaz
Cd Granülleri	: Kadmiyum granülleri
DCIS	: Ductal carcinoma in Situ
DM	: Diabetes Mellitus
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPBS	: Dulbecco's phosphate buffer saline
ELIZA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	: Östrojen reseptörleri
G-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Redükte glutasyon
GST	: Glutasyon-s-transferaz
LCIS	: Lobular carcinoma in situ
MCF-7	: Michigan Cancer Foundation-7 (Mammary cell line)
MDA	: Malondialdehit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBT	: Nitroblue tetrazolium chloride
NNDA	: N-Naphtylethylene diamine
NO	: Nitrik oksit
OD	: Optik dansite
PTH	: Parathormon

RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reactive oxygen species
SF	: Serum fizyolojik
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAS	: Total antioxidant status (Total antioksidan kapasite)
TBA	: Tiobarbitürik asit
TCA	: Trikarboksilik asit
TOS	: Total oxidant status (Total oksidan kapasite)
TSG	: Tumor supressor gene (Tümör baskılayıcı gen)
WST-1	: Water soluble tetrazolium test

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kanserin Belirteçleri	5
Şekil 2. Hücre siklusu.....	7
Şekil 3. Tüm kanserler yaşa standardize insidans hızlarının cinsiyete göre dağılımı (Türkiye Birleşik Veri Tabanı) (Dünya Standart Nüfusu,100.000 Kişide)	8
Şekil 4. Erkeklerde en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları.....	8
Şekil 5. Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları	9
Şekil 6. Memenin ve toplayıcı lenf nodlarının anatomisi	10
Şekil 7. Serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarları	18
Şekil 8. Oksidan-antioksidan dengesi	18
Şekil 9. Apoptoz ve nekrozun birbirinden farklı yönleri.....	25
Şekil 10. Nekroz ve apoptozun yolakları (.....	27
Şekil 11. Apoptozda oluşan morfolojik değişiklikler.....	28
Şekil 12. Erken ve geç apoptozu belirlemek için kullanılan yöntemler	28
Şekil 13. Oleuropeinin kimyasal yapı formülü	30
Şekil 14. Oleuropeinin farmakolojik etkileri.....	31
Şekil 15. Vitamin D ₂ ve D ₃ moleküllerinin kimyasal yapısı	33
Şekil 16. Ergosterolden D ₂ vitamini oluşumu	33
Şekil 17. Kolesterolde D ₃ vitamini oluşumu	34
Şekil 18. Vitamin D metabolizması	35
Şekil 19. Vitamin D eksikliğinde etkili mekanizmalar ve ilişkili rahatsızlıklar	36
Şekil 20. Apoptoz değerlendirilmesi, sağlıklı ve işaretli apoptotik hücreler.....	51
Şekil 21. BCA kalibrasyon grafiği	60
Şekil.22. SOD kalibrasyon grafiği	64
Şekil.23. NO kalibrasyon grafiği.....	71

Şekil 24. Oleuropeinin 24. saatteki IC50 değeri	77
Şekil 25. Oleuropeinin 48. saatteki IC50 değeri	77
Şekil 26. Oleuropeinin 72. saatteki IC50 değeri	78
Şekil 27. Vitamin D'nin 48. saatteki IC50 değeri	79
Şekil 28. Vitamin D'nin 72. saatteki IC50 değeri	79
Şekil 29. Apoptoz değerlendirme sonuçları	80



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. İnkübasyon işlemi	43
Resim 2. MCF-7 hücre hattının çoğaltılması	44
Resim 3. Hücrelerin canlılık kontrolü.....	45
Resim 4. Hücrelerin invert mikroskopta görünümü (40X)	45
Resim 5. Hücrelerin sayılması (Arthur™ Automated Cell Counter, NanoEnTek)	46
Resim 6. Oleuropein ve vitamin D için doz hesaplamaları.....	48
Resim 7. Hücrelerin 96'lı plaklara ekimi.....	51
Resim 8. Hücrelerin 6'lı plaklara ekimi.....	55
Resim 9. Hücrelere IC50 dozlarının verilmesi.....	55
Resim 10. Hücrelerin eppendorflara aktarılması	56
Resim 11. Hücrelerin Muse® cell analyzer cihazında okutulması	56
Resim 12. 25'lik flasklara hücre ekimi	57
Resim 13. Hücrelerin cell scraper ile kaldırılması	58
Resim 14. 24 saat oleuropeine maruz kalmış WST-1 testi görüntüsü	72
Resim 15. 48 saat oleuropeine maruz kalmış WST-1 testi görüntüsü	73
Resim 16. 72 saat oleuropeine maruz kalmış WST-1 testi görüntüsü	73
Resim 17. 48 saat oleuropeine maruz kalmış hücrelerin mikroskopik görüntüsü (X40).....	74
Resim 18. 48 saat D vitaminine maruz kalmış WST-1 testi görüntüsü	75
Resim 19. 72 saat D vitaminine maruz kalmış WST-1 testi görüntüsü	75
Resim 20. 48 saat D vitaminine maruz kalmış hücrelerin mikroskopik görüntüsü (X40).....	76

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Meme kanserinin evrelemesi.....	12
Tablo 2. Oksidatif stres ile ilişkilendirilen durumlar	20
Tablo 3. Antioksidan sistemler	22
Tablo 4. Apoptoz ve nekrozda morfolojik ve biyokimyasal özellikler	24
Tablo 5. Oleuropeinin farklı kanser hücre hatlarında antitümör etkisi.....	32
Tablo 6. D Vitamini ve plazmadaki metabolitleri	35
Tablo 7. Kalsitriolün antikanser etkisinin mekanizması.....	37
Tablo 8. Çalışmada kullanılan hücre tipi ve hücrenin özellikleri	40
Tablo 9. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarflar.....	40
Tablo 10. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen yüzde oran (%) apoptoz (Anneksin V) değerleri ve standart hata değerleri (n=3).....	81
Tablo 11. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen yüzde oran (%) apoptoz (Kaspaz 3/7) değerleri ve standart hata değerleri (n=3).....	82
Tablo 12. Anneksin V testi sonuçları.....	82
Tablo 13. Kaspaz 3/7 testi sonuçları	83
Tablo 14. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen ortalama toplam protein miktarı ve standart hata değerleri (n=3).....	84
Tablo 15. BCA protein analiz sonuçları	85
Tablo 16. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen total oksidan kapasite (TOS) değerleri ve standart hata değerleri (n=3).....	85
Tablo 17. Total oksidan kapasite	86
Tablo 18. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen TAS değerleri ve standart hata değerleri (n=3)	86
Tablo 19. Total antioksidan kapasite	87

Tablo 20. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen OSİ değerleri ve standart hata değerleri (n=3)	87
Tablo 21. Oksidatif stres indeksi (OSİ)	88
Tablo 22. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen SOD değerleri ve standart hata değerleri (n=3)	89
Tablo 23. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi	89
Tablo 24. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen GPx değerleri ve standart hata değerleri (n=3)	90
Tablo.25. Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesi	90
Tablo 26. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen MDA değerleri ve standart hata değerleri (n=3)	91
Tablo.27. Malondialdehit (MDA) analizi	91
Tablo.28. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen NO değerleri ve standart hata değerleri (n=3) ...	92
Tablo.29. Nitrik oksit (NO) analizi.....	92

ÖZET

MEME KANSERİ HÜCRE DİZİSİNDE (MCF-7) OLEUROPEİN VE D VİTAMİNİNİN ANTİPROLİFERATİF, APOPTOTİK VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Arı M. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Doktora Tezi, Aydın, 2018.

Meme kanseri, kadınlarda en çok teşhis edilen kanser türü olup, dünya çapında kadınlarda ölüm sebepleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Bu kadar önemli bir sağlık sorununa çözüm bulunması amacıyla, tedaviye yönelik farklı çalışmalar yapılmakta ve farklı maddelerin bu hastalıklar üzerindeki etkileri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Bu çalışmada meme kanseri hücre dizisinde (MCF-7) oleuropein ve D vitamininin hem ayrı ayrı hem de kombine kullanımının antiproliferatif, apoptotik ve antioksidan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Kemoterapötik ajanlar neoplastik hücreleri tahrip ederken bazı normal hücreler de bundan etkilenmekte ve bu durum çeşitli yan etkilere neden olmaktadır. Oleuropeinin güçlü bir antioksidan etki göstermesi, özellikle kanser tedavilerinde kullanılan ilaçların yan etkilerinin azaltılması ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyesini azaltması açısından önem teşkil etmektedir. D vitamininin, kalsiyum emilimi ve kemik sağlığı açısından önemli olduğu bilinmektedir. Ancak, son zamanlarda yapılan çalışmalarda D vitamininin meme kanseri hücresinin büyümesini kontrol ettiğini ortaya çıkarmakta ve epidemiyolojik çalışmalarda da D vitamininin düşük kanser riski ile bağlantılı olduğu ileri sürülmüştür. Hatta D vitamininin antioksidan etki gösterdiğine dair çalışmalar da mevcuttur.

Çalışmada oleuropein ve D vitamininin IC₅₀ değerlerini belirlemek için MCF-7 hücre dizisi üzerine oleuropein ve D vitamininin farklı konsantrasyonları uygulandı ve sitotoksik aktiviteleri 24, 48 ve 72. saatte WST-1 yöntemi kullanılarak belirlendi. Oleuropein ve D vitamininin 48. saatteki IC₅₀ değerleri bulunduktan sonra hem oleuropein için, hem D vitamini için hem de oleuropein-vitamin D kombinasyonu için apoptotik etkileri belirlemek amacıyla anneksin 5 ve kaspaz 3/7 kiti kullanıldı. Biyokimyasal parametrelerin tayini için tanımlı IC₅₀ dozları hücrelere uygulandıktan sonra hücre lizatları elde edildi. Bu numuneler

ile öncelikle hücrenin protein düzeyi hesaplandı. Sonrasında TOS, TAS, OSİ, SOD, GPx aktivite tayini, MDA ve NO tayini yapıldı.

Sonuç olarak bu çalışmada doz ve zamana bağlı olarak oleuropeinin ve D vitamininin MCF-7 hücre proliferasyonunu azalttığını gözlemledik. Aynı zamanda elde ettiğimiz apoptoz artışı da bu proliferasyon inhibisyonunu açıklamaktadır. Elde ettiğimiz diğer bir veri olan antioksidan parametrelerin artışı da proliferasyonun inhibisyonunu ve apoptozun artışı desteklemektedir. Ayrıca oleuropein ve D vitamininin kombine kullanımının güçlü bir sinerjetik etkisi olduğunu gözlemledik. Bu açıdan bakıldığında, MCF-7 hücrelerinde moleküler antikanserojenik mekanizmaları, tekli ya da kemoterapötik ajanlarla kombine çalışılarak, meme kanseri tedavisi için yeni kemoterapötik ve kemopreventif ajanların gelişimine önemli katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: MCF-7, Oleuropein, D Vitamini, Sitotoksite, Apoptoz, Antioksidan

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTIPROLIFERATIVE, APOPTOTIC AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF OLEUROPEIN AND VITAMIN D ON BREAST CANCER CELL LINES (MCF-7).

Ari M. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Department of Biochemistry, PhD Thesis, Aydın, 2018.

Breast cancer is the most common female and the second most common cause of cancer death in women. In order to find a solution to such a serious health problem, different studies are being done for treatment and the effects of different substances on these diseases are being intensively investigated. The aim of this study was to investigate the antiproliferative, apoptotic and antioxidant effects of oleuropein and vitamin D both individually and in combination.

While chemotherapeutic agents destroy neoplastic cells, some normal cells are also affected, leading to a variety of side effects. Oleuropein has a strong antioxidant effect, which is especially important in reducing side effects of drugs used in cancer treatments and reducing reactive oxygen species (ROS) levels. It has been known that vitamin D is important for calcium absorption and bone health. However, recent studies have revealed that vitamin D modulates breast cancer cell growth and epidemiologic studies suggest increasingly that vitamin D may be associated with reduced breast cancer risk. There are even studies that show that vitamin D has an antioxidant effect.

In this study, different concentrations of oleuropein and vitamin D were applied on the MCF-7 cell lines to determine the IC₅₀ values of oleuropein and vitamin D and cytotoxic activities were determined using the WST-1 method at 24, 48 and 72 h. After finding IC₅₀ values of oleuropein and vitamin D at 48 hours, annexin V and caspase 3/7 kits were used to determine apoptotic effects for both oleuropein, both vitamin D and oleuropein-vitamin D combination. After determined IC₅₀ dose was applied to cells lysate were obtained for determination of biochemical parameters. These samples first calculated the protein level of the cell. Subsequently, TOS, TAS, OSI, SOD, GPx, MDA and NO determinations were performed.

As a result, we have observed that oleuropein and vitamin D reduces cancer cell proliferation depending on dose and time. At the same time, apoptosis increases explain this inhibition of proliferation. The increase of antioxidant parameters, the other datum that we have obtained, has been supporting the proliferation inhibiton and induction of apoptosis. We also observed that the combined use of oleuropein and vitamin D is a strong synergetic effect. In conclusion, we consider that molecular anticarcinogenic mechanisms in MCF-7 cells, combined with single or chemotherapeutic agents, will significantly contribute to the development of new chemotherapeutic and chemopreventive agents for breast cancer treatment.

Key Words: MCF-7, Vitamin D, Oleuropein, Cytotoksite, Apoptosis, Antioxidant

1. GİRİŞ

İnsanları fiziksel, sosyal ve psikolojik olarak etkileyen, dolayısıyla yaşam kalitesini ciddi anlamda düşüren birçok hastalık bulunmaktadır. Bu hastalıklardan başında kanser gelmektedir. Kanser en genel tanımıyla hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmaları olarak tanımlanabilir. Gün geçtikçe daha yaygın görülmesi, morbidite ve mortalite riskinin yüksek olması sebebiyle önemi gittikçe artan bir hastalık olmaya başlamıştır.

Kanser gelişimine sebep olan etkenler, sigara dumanı ve katranında bulunan kimyasal ve karsinojenik ajanlar, ağır metaller, radyasyon, güneş ışığından gelen zararlı ultraviyole ışınlar olarak sıralanabilir. Ayrıca, antioksidan bakımından zengin gıdaların yeterince tüketilmemesi sonucu hücre savunma mekanizmalarının zayıflaması ve buna bağlı olarak hücre hasarının oluşumundan dolayı kanser gelişebilir. Kanser, dünyamızda ve ülkemizde %22'lik görülme sıklığı ile kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedeni haline gelmiştir. 2000'li yılların başında dünyada 6 milyon insanın kansere yakalandığı bildirilmektedir. Önümüzdeki yirmi yılda bu sayının 12 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Kanser Araştırma Ajansı'nın verilerine göre 2030 yılında 24 milyon insanın kansere yakalanacağı, 17 milyon insanın ise kanserden yaşamını kaybedeceği tahmin edilmektedir.

Ölüm nedenleri arasında bu kadar üst sıralarda olması ve yaşam kalitesini ciddi anlamda düşürmesi sebebiyle birçok moleküler araştırma laboratuvarlarında araştırmacıların öncelikli hedefi bu hastalığa çözüm bulmaktır. Birçok kanserli hastada kesin çözüm bulmak için yoğun araştırmalar devam etmektedir. Fakat hastalığın seyrini düzeltebilmek, hastanın yaşam süresini uzatmak ve hayat kalitesini biraz olsun arttırmak bile çok önemlidir. Bu nedenle araştırmacılar, tedaviye yönelik pek çok farklı çalışmalar yapmaktadırlar. Farklı maddelerin bu kanser üzerindeki etkilerini yoğun bir şekilde araştırmaktadırlar. Dolayısıyla bu konudaki çalışmalar çok popüler hale gelmiştir. Kanserle mücadelede kemoterapinin yanısıra cerrahi operasyon veya radyoterapi de tek başına ya da birlikte kullanılabilir. Klinikte, farklı antikanser ilaçlar tek başına veya kombine olarak hastalara verilebilir. Bu çalışmada oleuropein ve D vitamininin hem ayrı ayrı, hem de kombinasyon olarak meme kanseri hücre dizisinde (MCF-7) doza ve zamana bağlı olarak antiproliferatif, apoptotik ve antioksidan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Daha önce oleuropein ve D vitamininin hem ayrı ayrı hem de kombine kullanımının antiproliferatif, apoptotik ve antioksidan

etkileri aynı anda değerlendirilmemiştir. Bu açıdan çalışma zgn olup, ileride geliştirilecek olan ilaç tedavi stratejilerine temel oluşturması ve literatüre katkı sağlaması hedeflenmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

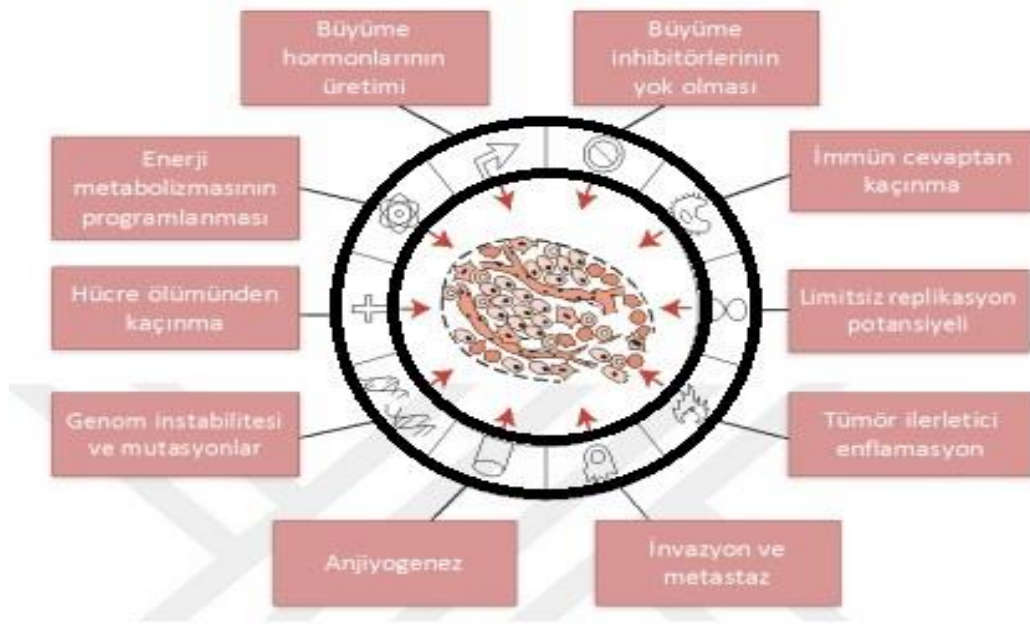
Kanser terimi, ilk olarak M.Ö. 460-377 yılları arasında Hipokrat tarafından organizma içinde şifa bulmayan yeni oluşumları anlatmak amacıyla kullanılmıştır. Hipokrat, vücut yüzeyinde gelişen, diğer hücrelere göre farklı karakteristik özellik gösteren, kırmızı renkli ve normale göre daha yavaş büyüyen şişliklere “Carcinos” ya da “Carcinoma” olarak adlandırmıştır. Galen ise M.S. 2 yüzyılda bu tip farklı karakteristik özellik gösteren oluşumlara yengece benzerlikleri dolayısıyla “kanser” olarak adlandırmıştır. Türk tıp tarihinde ise Tarsuslu Osman Hayri Efendi'nin “Kenz üssıhhat ül-ebdaniye” (1298) adlı eserinde kanser tanımı yapılmıştır. Küçük yumru büyüklüğünde, ağırlı seyreden, damarlı bir oluşumu anlatmak için “seratan” kelimesini kullanmıştır (Atıcı, 2007).

Kanser, en genel tanımıyla hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin düzensiz olarak bölünerek kontrolsüz büyüme eğilimi ve buna paralel olarak anormal yayılımını ifade eden bir terimdir (Gürel, 2007). Kanserlerin belirleyici özelliği hücrelerin her zamanki sınırları dışında büyümesi, yakınında bulunan hücreleri istila etmesi ve diğer organlara da yayılması şeklindedir. Bu tür süreçler metastaz olarak ifade edilmektedir. Kanser hücreleri, çeşitli etkenlerle değişime uğramış, kontrolsüz büyüme ve bölünme (hücre proliferasyonu) yeteneğine sahip, aynı zamanda bulunduğu yerden vücudun başka bir köşesine yayılım gösterme (metastaz) özelliğine sahip hücrelerdir (Topal ve ark, 2009; Öncel, 2012). Kontrolsüz olarak bölünen kanser hücreleri, buldukları yerde bir kitle oluşturarak çoğalıp, bulunduğu bölgenin dışına yerleşme eğilimi göstermiyorsa, vücudun diğer bölümlerine invaze olmuyorlarsa bu tip kanserlere benign (selim) tümör, fakat bulunduğu yerden diğer doku ve organlara yayılma eğilimi gösteriyorsa bu tip kanserlere de malign (habis) tümör adı verilir. Malign tümörler, kan, lenf ya da vücut boşlukları yoluyla primer lokalizasyonlarının dışına çıkıp vücudun başka bölgelerine sıçrayarak (metastaz) oralarda da büyümeye devam eder ve ölümcül hale gelir (Topçul, 2017). Kan, lenf ya da vücut boşlukları yoluyla metastaz yaparak vücudun diğer organlarına taşınan kanser hücreleri, hücrelerden gelen sinyallere kesinlikle yanıt vermez, birbirine yapışmaz, özelleşmez ve apoptoza uğramazlar. Metastaz, kanser sebebiyle ölümlerin en önemli sebebidir (Aslan, 2010). Kanser olduğu hücrelerin tipine bağlı olarak dört ana başlık altında incelenir. Bunlar; epitel hücrelerinden kaynaklanan karsinoma, bağ doku ve hücrelerinden

kaynaklanan sarkoma, hematopoietik hücrelerden kaynaklanan lösemi ve hematopoietik hücrelerden kaynaklanan ve lenf damarlarında oluşan lenfomadır. Kanserli bir dokunun oluşumu ve metastazın gelişiminde kademeli olarak gözlemlenen için altı adet belirteç tespit edilmiştir (Hannahan ve Weinberg, 2000).

- **Büyüme ve sinyal otonomisi:** Kanser hücreleri, büyüme faktör sinyalinden bağımsız bölünürler, çünkü büyüme faktör yolağında oluşan mutasyon, kontrolsüz büyümeye sebep olurlar.
- **Büyüme inhibitör sinyallerinden kaçınma:** Kanser hücreleri, oluşan mutasyonlar sebebiyle inhibitör sinyallerine yanıt vermez.
- **Apoptotik hücre ölümlerinden kaçınma:** Kanser hücreleri apoptotik sinyale cevap vermezler.
- **Büyüme ve sinyal otonomisi: (sınırsız replikasyon yeteneği)** Kanser hücrelerinde telomeraz uzunluğu korunur, bu yüzden sınırsız sınırsız replikasyon potansiyeli doğar.
- **Anjiyogenez (yeni kan damarlarının oluşumu)** Kanser hücreleri anjiyogenezi uyarır, çünkü yeni kan damarlarının oluşumu tümörün yaşaması ve büyümesi için gereklidir.
- **İnvazyon ve metastaz:** Kanser hücreleri, normal hücrelerin aksine vücudun diğer kısımlarına hareket etme eğilimindedir ve kanser ölümlerinin en büyük nedenidir.

Kanserin temel belirteçleri şekil.1 'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Kanser Belirteçleri (Kaçar, 2016'dan değiştirilerek alınmıştır).

2.1.1. Kanser Oluşumuna Etki Eden Faktörler

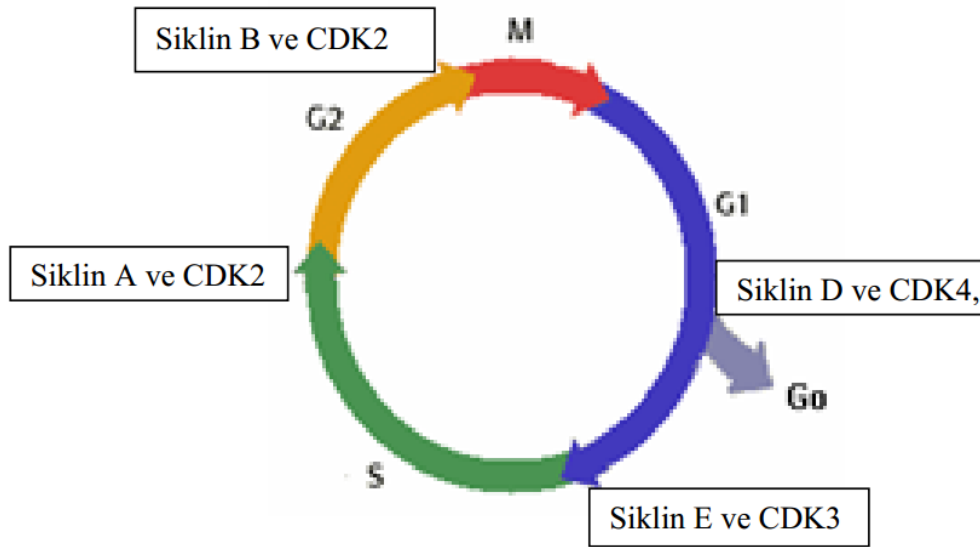
Normal bir hücre, kanser hücresine dönüşürken birçok mekanizma rol oynamakla beraber bu mekanizmaların hepsi, hala tam olarak keşfedilmemiştir. Bu mekanizmaların nasıl oluştuğunu anlamaya çalışmadan önce, normal bir hücrenin yaşam döngüsünün nasıl olduğunu bilmemiz gerekmektedir. Hücrenin yaşam döngüsü (hücre siklusu), hücre büyümesi ve proliferasyonu programıdır. Dinlenme ve bölünme dönemi olarak ikiye ayrılır. Dinlenme döneminde yaşamsal faaliyetler devam eder. Bölünme dönemine göre daha uzun bir dönemdir. Bu döneme G_0 fazı ismi de verilir. Bölünme dönemi ise 4 temel fazdan oluşur (şekil.2). Bu fazlar, bölünmeye hazırlığın yapıldığı G_1 , S, G_2 fazları ile mitoz bölünmenin gerçekleştiği M fazından oluşur. Dış uyarılar ile biyokimyasal olarak siklus başlatılır. Siklus başlayınca hücre içeriğini iki katına çıkaracak kendine eş iki hücre çoğaltır. Hücre siklusu boyunca bazı onkogenler ve hücre siklusuna özgü proteinler, eş zamanlı olarak aktifleşip, inaktifleşirler. (Lowitz ve Casciato, 2012). G_1 fazında öncelikle DNA replikasyonunda gerekli olan RNA ve proteinlerin üretimi yapılır, S fazında ise DNA replikasyonuna başlanacak bölgeler bulunur ve işaretlenir. DNA eşlenir, böylece diploid hale getirilir. G_2 fazında ise mitoz bölünmenin gerçekleşmesi için son hazırlıklar yapılır. M fazı, mitoz bölünme aşamasıdır. Yani bir hücrenin iki eş hücre haline geldiği fazdır. Hücre siklusunu düzenleyen ve kontrol eden kompleks yapıda pek çok parametre ve etkileşim vardır. Hücre

siklusu kontrol mekanizmasında oluşan hatalar sonucu hücre bölünmesi kontrolü kaybedilir, bu hatalar sonucunda kanser gelişimi olabilir (Cabadak, 2008).

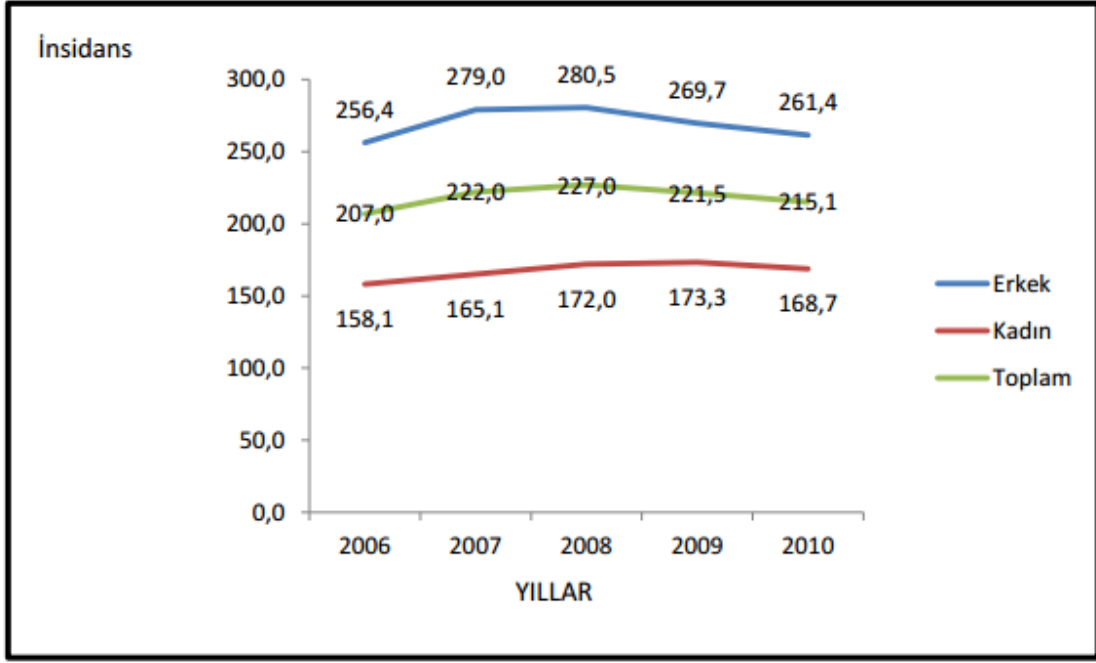
Bu dönemlerin art arda, zamanında, hatasız başlayabilmesi için birçok proteine ihtiyaç vardır. Bu proteinlerin sentezini regüle eden genler protoonkogenler ya da diğer adıyla tümör baskılayıcı genlerdir (TSG, tumor supressor gene – antionkogen). Pek çok sebeplerlerden dolayı normal hücre büyümesi ve farklılaşması için gerekli bazı proteinlere ait kodları içeren protoonkogenler ile tümör baskılayıcı genler arasındaki dengenin bozulması, DNA dizilerinde değişikliklere, kansere engel olan bazı proteinlerin sentezinde azalmalara sebep olmaktadır (Toptal, 2009; Aslan, 2010). DNA dizilerinde meydana gelen değişiklikler, hücre büyümesinin hatasız başlaması için gerekli protoonkogenlerin kansere sebep olan onkogenlere dönüşmesine, normalde tümör oluşumunu engelleyen proteinleri üreten tümör baskılayıcı genlerin ise inaktive olmasına neden olmaktadır (Aslan, 2010). Tümör baskılayıcı genler, p53, RB1, p16, p21 ve ING ailesi olarak sıralanabilir. Tümör baskılayıcı genler arasında en çok dikkat çeken, genomun bekçisi olarak ifade edilen, her geçen gün yeni bir işlevi olduğu anlaşılan bir gen olan p53 tümör baskılayıcı genidir, lokasyon olarak 17. kromozomun p koluna yerleşmiş (17p13.1), 53 Kd ağırlığında 393 aminoasitlik bir nükleer fosfoproteini kodlayan bir genidir. 11 exonu ve 10 intronu bulunan p53 geni, 5 v3 8 exonlarına karşı gelen protein bölgesi ile DNA'ya bağlanır. Apoptozdan hücre döngüsü regülasyonuna, başkalaşımdan DNA rekombinasyonuna hücre için pek çok önemli görevleri vardır. Birçok kanser türünde mutasyon ya da delesyon sonucu işlevini yitirmiştir. Normalde inaktif ve kısa ömürlü olan olan p53 proteini, DNA hasarı ile aktif hale gelmektedir. p53 aktifleştikten sonra kendisinin transkripsiyonunu da tetikler. (Karaman, 2003). Aktifleşen p53 geni, hücre siklusunu G₁ fazında durdurur. Böylece DNA tamiri için gereken zamanı sağlar. Eğer düzeltilemeyen bir hata varsa bu sefer hücreyi yaşlanmaya (senesense) ya da apoptoza yönlendirir. p53 geninin denetiminde olup apoptozda doğrudan görev alan BCL-2 ailesinden BID, BAX, NOXA ve PUMA genleri mevcuttur (Yılmaz ve Altunok, 2011). p53 geni işlevini kaybederse birçok bozukluğa neden olur. Tüm kanserlerin nerdeyse %50'sinde p53 mutasyonu görülür. Kanser oluşumuna onkogenlerin ekspresyon seviyelerindeki kantitatif değişikliklerin ya da yapılarında meydana gelen değişikliklerin yol açtığı düşünülmektedir. Bu değişiklikler, gen delesyonu, gen amplifikasyonu (gen çoğaltımı), nokta mutasyonu, insersiyonal mutagenез (yeni DNA katılımı) ve kromozomlarda yeni düzenlemeler olarak sıralanabilir. Büyüme ve gelişmeyi

düzenleyen protoonkogenlerin çalışmalarını kontrol eden ve aynı zamanda anormal büyümeyi ve malign değişimleri engelleyen tümör baskılayıcı genlerin her iki alleli kaybolduğunda (heterozigotluk kaybı) veya bu genler mutasyona uğradığında kontrol mekanizması bozulur ve buna paralel olarak tümör oluşumu gerçekleşir. Meme kanseri gibi çeşitli pek çok tümörlerde p53 geninin her iki allelinde kayıp veya nokta mutasyonlar olduğu bildirilmiştir (Yılmaz ve Altunok, 2011). Kanser oluşumuna hazırlayıcı radyasyon, ısı, güneş ışığı, endüstriyel maddeler, kronik irritasyon, beslenme şekli, sigara, alkol, virüs, stres, hareketsiz bir yaşam tarzı, 55 yaş üstünde olmak, yüksek tansiyon, immun yetmezlik gibi pek çok faktör vardır. Kanser oluşumunda çevresel faktörlerin yanı sıra genetik faktörlerin de etkisinin önemli olduğu bilinmektedir (Erman, 2007).

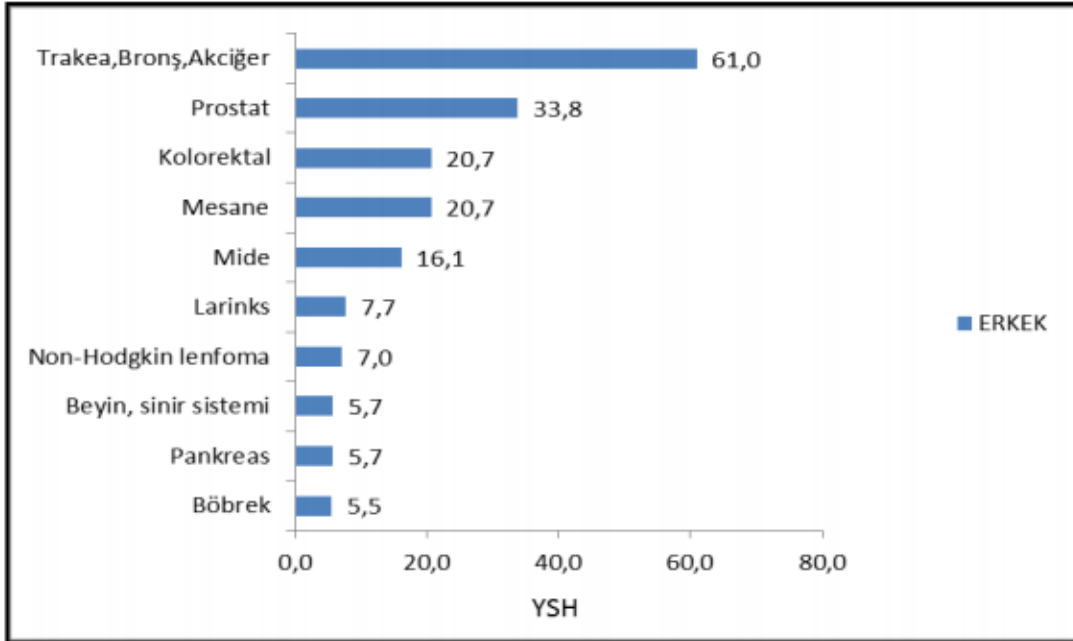
Kanser insidans hızları ve profilleri gelişmiş ve az gelişmiş ülkelere göre farklılık göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde erkeklerde daha çok akciğer ve prostat kanseri, kadınlarda ise meme kanseri ve kolorektal kanserler görülürken, az gelişmiş ülkelerde erkeklerde akciğer, mide ve karaciğer kanseri, kadınlarda ise meme ve serviks kanseri daha sık görülmektedir. Türkiye’de ise erkeklerde akciğer, mesane ve mide kanserleri sık görülürken, kadınlarda ise meme kanseri ve kolorektal kanserlerin daha sık görüldüğü bildirilmiştir (Jemal ve ark, 2006; Türkiye Kanser İstatistikleri, 2016).



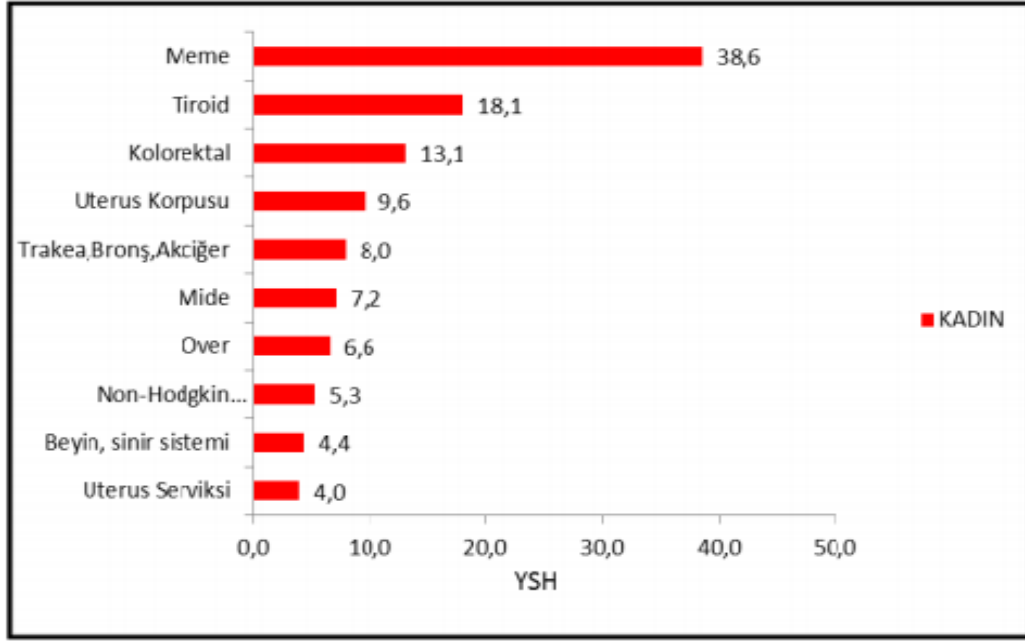
Şekil 2. Hücre siklusu (<http://www.belgeci.com/mitoz-bolunme.html>)



Şekil 3. Tüm kanserler yaşa standardize insidans hızlarının cinsiyete göre dağılımı (Türkiye Birleşik Veri Tabanı) (Dünya Standart Nüfusu,100.000 Kişide) (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2017)



Şekil 4. Erkeklerde en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2017)



Şekil 5. Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2017)

2.2. Meme Kanseri

Diğer kanser türlerinden farklı olarak, memenin tümörleri steroid hormonlarından büyük ölçüde etkilenmektedir. Tüm kanser vakalarının %18'ini oluşturan, kadınlara ait kanser sıralamasında dünyada en sık görülen kanser türüdür. Meme kanseri, kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (Somunoğlu, 2009; Saip ve ark, 2011). Yaşam boyunca yaklaşık olarak her 10 kadından birinin bu hastalığa yakalanma riskinin ve yakalananlarının üçte birinin de yaşamlarını kaybetme risklerinin olduğu bildirilmektedir (Gölbaşı ve ark, 2010).

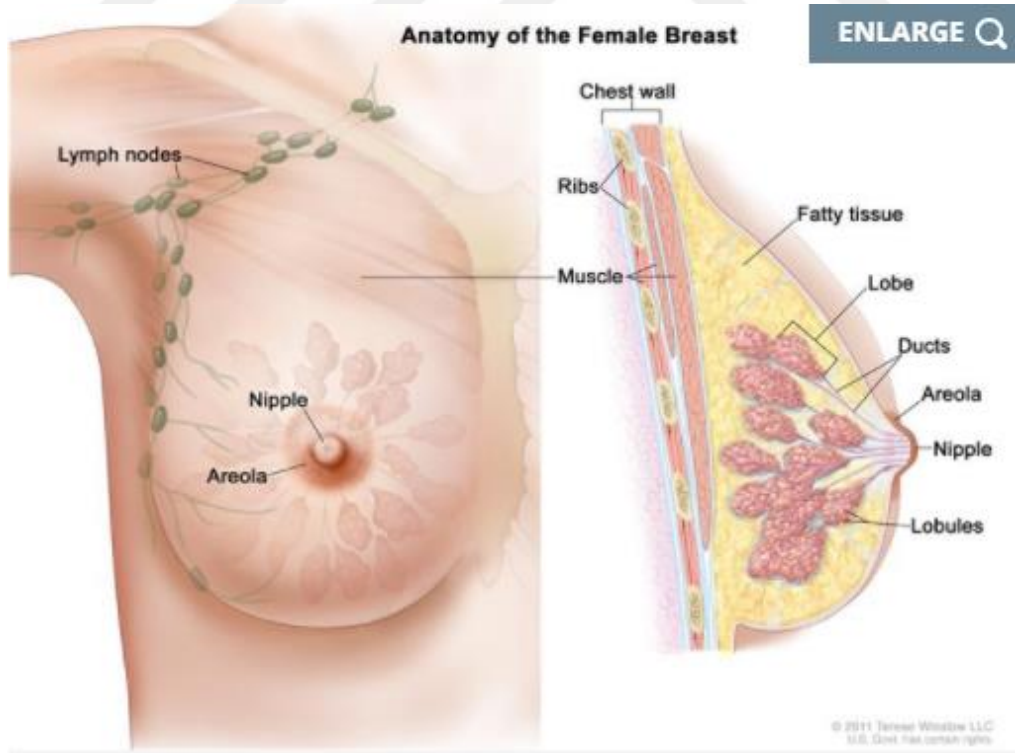
Meme kanseri, memenin kötü huylu tümörüdür. Hastalık genel olarak kadınlarda görülse de erkeklerin de yakalanma ihtimali vardır. Semptomlarını göstermeden metastaz yapabildiği için tehlike arz eden bir hastalıktır. Özellikle, nonstreoidal anti-östrojen tedavide kullanılan tamoksifenin meme kanseri hastalarının yalnızca 1/3'ünde etkili olduğu gözlemlenmiştir. Bu gözlemler, meme kanserinin tedavisinde ve önlenmesinde yeni alternatif ilaçların araştırılmasını önemli hale getirmiştir (Dikmen, 2008). Meme kanserinin tedavisinde farklı cevaplar sergileyen farklı tümörler söz konusu olduğu için tedavisi oldukça zordur. Son yıllarda meme kanserinde hastalığın belirlendiği safhaya göre önemli

tedavi olanakları ortaya çıkmıştır. Meme kanseri tedavisi, günümüzde cerrah, onkolog, radyasyon onkoloğu, radyolog, patolog, psikolog, plastik cerrah, fizyoterapist farklı alanlarda uzmanlaşmış hekimler tarafından yapılmaktadır. En önemli tedavi şekilleri, cerrahi operasyon, kemoterapi, hormon tedavisi, radyoterapi ve biyolojik tedavi olarak sıralanabilir.

Normal bir meme gelişiminde hücre çoğalması ve apoptoz sırasında kontrollü bir denge vardır (Sun ve Liu, 2005; Yu ve ark 2006).

2.2.1. Meme Anatomisi

Meme dokusu, lokasyon olarak toraksın önünde ve sternumun iki yanında yer almaktadır. Meme dokusunun sınırları her kadında aynı olmayabilir. Aynı kadında ise şişmanlama, zayıflama, gebelik, emzirme, ve yaşlılık sebeplerinden dolayı farklılık gösterebilir. Memeni yaklaşık olarak orta bölümüne rastlayan kısmında meme başı ve areola bulunur (Topuz ve ark, 2003). Meme kanserleri, metastazlarını genellikle lenf yolları ile yapmaktadır (Romrell ve Bland, 1997).



Şekil 6. Memenin ve toplayıcı lenf nodlarının anatomisi (National Cancer Institute. Stages of Breast Cancer, 2017)

2.2.2. Meme Kanseri Evreleri

Meme kanserleri pek çok değişkene göre belirli evrelere ayrılmıştır. Tümörün oluşumu, boyu ve metastaz durumuna göre çeşitli evrelere ayrılmıştır.

Evre 0; Aynı zamanda ‘in-situ’ olarak da adlandırılan bir evredir. Çevre dokulara yayılım göstermemiş, yerinde kalmış kanser türünü ifade eder. Evre 0 kanserler, oluştuklara yere göre iki çeşittir. Eğer kanser süt bezlerinde (lobes) oluşmuşsa lobular carcinoma in situ (LCIS), süt kanallarında (ducts) oluşmuş ise ductal carcinoma in situ (DCIS) olarak adlandırılmaktadır. LCIS’in her ne kadar mikroskopik özellikleri normal hücrelerden farklı ve kanser hücrelerine daha benzer görünse de genel olarak bakıldığında LCIS kanserin karakteristik özellikleri gibi davranmaz. Bu sebeple kanser gibi tedavi edilmesine gerek yoktur. LCIS sadece göğsün herhangi bir bölgesinde kanser oluşabilme riskinin arttığını gösteren bir parametre olarak düşünülebilir. DCIS durumunda ise kanser hücreleri, oluştukları süt kanalları içerisinde kalmıştır. Göğsün lenf bezleri ya da yağ dokusu gibi vücudun farklı bölgelerine yayılmamıştır (National Cancer Institute. Stages of Breast Cancer, 2017).

Evre I; Yayılım eğilimi gösteren meme kanserinin başlangıç safhasıdır. Evre 1, tümör büyüklüğünün 2 cm’den daha büyük olmadığı ve kanser hücrelerinin memeden başka bölgelere (lenf bezleri gibi) yayılmadığı bir durumdur (National Cancer Institute. Stages of Breast Cancer, 2017).

Evre II; IIA ve IIB olmak üzere iki alt bölüme ayrılmaktadır. Evre IIA’da, memede tümör yoktur, fakat koltuk altındaki lenf bezlerinde kanser vardır. Tümör büyüklüğü 2 cm büyüklüğünde veya daha küçüktür, koltuk altındaki lenf bezlerine yayılmıştır. Ya da 2 cm’den büyük, 5 cm’den küçüktür ve koltuk altı lenf bezlerine sıçramamıştır.

Diğer evre olan evre IIB’de ise tümör büyüklüğü 2-5 cm arasındadır, koltuk altı lenf bezlerine sıçramıştır, ya da 5 cm’den daha büyüktür ve koltuk altı lenf bezlerine sıçramamıştır (National Cancer Institute. Stages of Breast Cancer, 2017).

Evre III; Evre III, daha ilerlemiş kanser evresidir. Evre IIIA, IIIB ve IIIC olmak üzere üç alt bölüme ayrılmaktadır. Evre IIIA’da, koltuk altı lenf bezlerinde kanser vardır, ancak memede tümör yoktur. Ya da tümör büyüklüğü 5 cm civarında veya daha büyüktür ve çevre dokulara sıçramamıştır. Evre IIIB’de, tümör büyüklüğü herhangi bir boyutta olabilir

ve memeye komşu dokulara (deri veya göğüs duvarı, kaburgalar veya göğüs duvarındaki kaslar) ve lenf nodlarına yayılmıştır. Evre III C’de ise kanser köprücük kemiği altındaki ve meme içerisindeki lenf nodlarına ve memeye komşu dokulara yayılma eğiliminde olabilir (National Cancer Institute. Stages of Breast Cancer, 2017).

Evre IV; Bu evre son evre olup, uzak metastatik kanserdir. Kanser, göğüs dışına vücudun diğer bölümlerine de (kemikler, beyin, akciğer, karaciğer) sıçramıştır (National Cancer Institute. Stages of Breast Cancer, 2017).

Tablo 1. Meme kanserinin evrelemesi (National Cancer Institute. Stages of Breast Cancer, 2017).

Meme Kanserinin Evrelemesi	
Evre 0	LCIS: Kanser süt bezlerinde (lobes) oluşmuşsa lobular carcinoma in situ olarak tanımlanır.
	DCIS: Süt kanallarında (ducts) oluşmuş ise ductal carcinoma in situ olarak tanımlanır.
Evre I	Yayılabilen meme kanserinin başlangıç safhasıdır. Bu evre, tümörün 2 cm’den daha büyük olmadığı ve kanser hücrelerinin memeden başka bir yerlere (lenf bezleri gibi) yayılmadığı durumdur.
Evre II	IIA: Memede tümör yoktur, ancak koltuk altındaki lenf bezlerinde kanser vardır. Tümör 2 cm büyüklüğünde veya daha küçüktür, koltuk altındaki lenf bezlerine yayılmıştır. Ya da tümör 2 cm’den büyük, 5 cm’den küçüktür ve koltuk altı lenf bezlerine yayılmamıştır.
	IIB: Tümör 2-5 cm arasındadır, koltuk altı lenf bezlerine sıçramıştır, ya da 5 cm’den daha büyüktür ve koltuk altı lenf bezlerine sıçramamıştır.
Evre III	IIIA: Koltuk altı lenf bezlerinde kanser vardır, ancak memede tümör yoktur veya tümör 5 cm civarında veya daha büyüktür ve çevre dokulara yayılmamıştır.
	IIIB: Tümör herhangi bir boyutta olabilir ve memeye komşu dokulara (deri veya göğüs duvarı, kaburgalar veya göğüs duvarındaki kaslar) ve lenf nodlarına yayılmıştır.
	IIIC: Kanser köprücük kemiği altındaki ve meme içerisindeki lenf nodlarına ve memeye komşu dokulara yayılma eğiliminde olabilir.
Evre IV	Uzak metastatik kanserdir. Kanser göğüs dışına vücudun diğer bölümlerine de (kemikler, beyin, akciğer, karaciğer) sıçramıştır.

2.2.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri risk faktörleri; yetersiz beslenme, az miktarda fiziksel aktivite, meme gelişimi sırasında radyasyona maruz kalma, cinsel hormonlar ve genetik yatkınlık olarak sıralanabilir. Ayrıca erken teşhis meme kanserinden kurtulmanın en önemli anahtarı denilebilir. Erken teşhiste en çok kullanılan yöntem mamografidir (King ve Robins, 2006).

2.2.3.1. Obezite

Obezite 1980'lerin başından beri prevalansı giderek artan bir hastalıktır. Pek çok hastalığın başlangıcı için risk faktörüdür. Vücut Kitle İndeksi (BMI) yüksek olan kadınlarda postmenopozal meme kanseri göreceli riskinin arttığı gözlemlenmiştir (Suzuki ve ark, 2009; Renehan ve ark, 2008; Mc Pherson ve ark, 2000) Yapılan çalışmalarda aşırı kilolu ve obez bireylerin pek çok kanser için ve özellikle meme kanseri için önemli risk faktörü olduğu vurgulanmaktadır. Bu sebeple yaşam boyu sağlıklı, ideal bir kiloya sahip olmak ve kiloyu korumak, yüksek kalorili besinlerden kaçınmak fiziksel aktiviteli bir yaşam tarzına geçmek pek çok kanserden korunma açısından önem taşımaktadır (Suzuki ve ark, 2009).

2.2.3.2. Beslenme

Beslenme içeriği, kanserden korunma ve sağkalım üzerindeki etkisi açısından önemlidir. Yapılan pek çok çalışmada yüksek yağ içeren diyetle beslenen endojen estrogen düzeylerindeki artışa neden olarak meme kanseri riskini arttırdığı gözlemlenmiştir. Zeytinyağı, meyve sebze, kepekli doğal tahılları tüketmek, işlenmiş etler ve kırmızı et tüketimini sınırlamak meme kanseri ve diğer kanserlerden korunmak için önemlidir (Kushi ve ark, 2012).

2.2.3.3. Fiziksel aktivite

Düzenli yapılan fiziksel aktivite, kalori alımı ile enerji harcanmasını dengeleyerek ideal vücut ağırlığını korumaya yardımcı olur. Fiziksel aktif bir yaşam tarzı oluşturmak pek çok kanser türü için koruyucu olabilir. Oturmak, uzanmak, televizyon izlemek gibi hareketsiz aktiviteleri sınırlamak önemlidir. Düzenli fiziksel aktivite meme kanseri riskini %30-40 azaltmaktadır (Cummings ve ark, 2009).

2.2.3.4. Alkol

Alkol ağız, farinks, larinks, özofagus, karaciğer kolorektal ve meme kanserleri için risk faktörüdür (Zhao ve ark, 2013). Amerikan Kanser Derneği'nin 2012'de yayınladığı Kanserden Korunmada Beslenme ve Fiziksel Aktivite Rehberi'nde alkol tüketmeyenlerle kıyaslandığında, alkol tüketenlerde %10-12 yüksek meme kanseri riski olduğu bildirilmiştir (Kushi ve ark, 2012; Cummings ve ark, 2009). Alkole bağlı kanser gelişimi çeşitli faktörlere

bağlanmıştır. Bunlardan bir tanesi etanolün primer metaboliti ve oksidatif stresin sonucunda oluşan asetaldehittir (Varela-Rey, 2013).

2.2.3.5. Sigara

Sigara, en az %30'unun kesin kanserojen olduğu yaklaşık 300 bileşik taşımaktadır. Sigara dumanında bulunan en önemli karsinojenik maddeler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aril aminler, heterosiklik aromatik aminler ve N-nitrosaminlerdir (Bartsch, 2000). Pek çok kohort çalışmada genç yaşta başlayan, uzun süreli içicilerde meme kanseri riskinin arttığı gözlemlenmiştir (Xue, 2011).

2.2.3.6. Genetik kalıtsal özellikler

Tüm meme kanserlerinin %5-10'u BRCA1 ve BRCA2 gibi yüksek riskli genlerdeki mutasyonlara bağlı olduğu tahmin edilmektedir (Easton, 2002). Benzer şekilde p53 geni hücreleri malign transformasyondan koruyan çok önemli bir proteindir. Meme kanseri olgularının %20-30 civarında p53 inaktivasyonu gözlenir. p53 mutasyonlarının varlığı tümörün in situdan invazif karsinoma geçişi için bir belirteç olarak kullanılabilir (Hannahan ve Weinberg, 2000).

2.2.3.6.1. BRCA1 ve BRCA2 genleri

Meme kanseri genleri olarak bilinen bu genler 1994 ve 1995'te keşfedilmişlerdir. Normalde genetik yapının bir parçası olarak herkeste bu genler vardır, fakat meme kanseri açısından riskli kişilerde ise bu genler mutasyona uğramıştır. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar, heterozigot taşıyıcılar için meme ve ovaryum kanserleri açısından çok kuvvetli risk faktörlerinden birisidir. BRCA1 ve BRCA2 genleri, DNA hasarına karşı oluşan hücrel yanıtta rol oynayan proteinleri kodlamakla görevlidir. BRCA genleri DNA tamir mekanizmasında rol oynadığı için bu genlerdeki herhangi bir arızadan dolayı bu genin ürünü olan BRCA proteini hatalı oluşur ya da oluşmaz. Dolayısıyla tamir mekanizmasındaki görevini yerine getiremeyeceği için DNA onarılamaz. DNA onarılamadığı için çift zincir bağı orada kalır ve bu hasar meme kanserine sebep olur (Chodosh, 1998).

2.2.3.7. Östrojen

Meme kanseri gelişim nedenleri arasında hormonlar önemli yer tutar (Karakuş, 2010) Yapılan çalışmalarda hormonlar arasında en büyük risk faktörünün östrojen hormonu olduğu bildirilmiştir (Martin ve Weber, 2000; Martin ve ark, 1990). Kadın cinsiyet hormonu olan östrojen, büyük oranda ovaryumlardaki olgun granüloza hücrelerinden, az miktarda da böbreküstü bezlerinden ve plasentadan salgılanır (Altunkaynak ve ark, 2012; Russo ve ark, 2003). Hormonlar hücreler üzerindeki etkilerini, hücre yüzeyinde ya da içerisinde bulunan ilgili hormona karşı spesifik afinitesi olan reseptör proteinlerine bağlanarak gösterirler. Reseptör-hormon kompleksi, hücrede bir takım biyokimyasal değişikliklere yol açarak hücreler üzerinde etkilerini gösterirler. Meme ve uterus dokusu, sahip oldukları östrojen reseptörleri (ER) sebebiyle östrojenin etkilerine açıktır. Meme kanseri vakalarında ER pozitifliğinin % 40-80 civarında olduğu tespit edilmiştir (Kömürcü, 1995).

2.2.3.8. Serbest radikaller ve oksidatif stres

Kuantum kimyasına göre bağ oluşumu ancak iki elektronun bir araya gelmesiyle gerçekleşir. İnsan vücudunda bulunan elektronların tamamına yakını elektron çiftleri halinde bulunur. Bu elektron çiftleri oldukça kararlı bir yapıya sahiptirler. Aradaki bağın kopması durumunda elektronlar farklı yollara gidebilirler. Birlikte kalarak başka bir elektronun yapısına katılabilirler, ya da birbirlerinden ayrılarak farklı atomlara bağlanabilirler. Birlikte kaldıkları durumda iyonları oluştururlar, ayrılmaları durumunda ise serbest radikalleri oluştururlar (Aydemir ve Sarı, 2009). Serbest radikaller, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler ve kararsız bir yapıya sahiptirler.

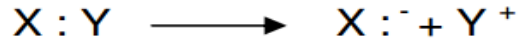
Serbest radikaller üç yolla meydana gelirler.

a) **Kovalent bağların homolitik kırılması ile:** Yüksek sıcaklık ve yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma esnasında bağın yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalırsa iki adet serbest radikal oluşmuş olur.



b) Normal bir molekülün elektron kaybetmesi veya heterolitik bölünmesi ile:

Radikal özelliği olmayan bir molekülden elektron kaybı esnasında, molekülün dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal form oluşur. Bu tipte olan bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır ve serbest radikal oluşmaz. İyonlar meydana gelir.



c) Normal bir moleküle elektron transferi ile: Radikal özellik taşımayan bir moleküle tek elektron transferi sonucunda molekülün dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme, radikal oluşumuna sebep olabilir.



Serbest radikaller biyolojik sistemlerde daha çok elektron transferi sonucu oluşur ve oluşan serbest radikallerin çoğu oksijenin indirgenmesi sonucu oluşur (Tamer L ve ark, 2000).

Serbest radikaller normal metabolik olaylar sırasında meydana gelebilir. Aynı zamanda dış etkilere bağlı olarak da oluşabilirler.

Ekzojen Kaynaklar: Ekzojen etmenler, pestisitler, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, stres, virüsler, enfeksiyon, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, bakır, demir, krom, nikel, civa kadmiyum gibi metal iyonları ve ayrıca asbest lifleri, mineral tozlar ve karbonmonoksit olarak sayılabilir (Atmaca ve Aksoy, 2009).

a) Radyasyon

b) Alkol ve uyuşturucular

c) Çevresel ajanlar (Pestisitler, solventler, ksenobiyotikler, hidrokarbonlar, anesteziik maddeler)

d) Stres: Streste katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu serbest radikal kaynağıdır (Akkuş, 1995).

Endojen Kaynaklar: Organizmada rutin bir şekilde meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarıyla oluşurlar (Ames ve ark, 1993).

a) Mitokondriyal elektron taşıma zinciri: Elektron transportu sırasında mitokondride serbest oksijen radikalleri oluşabilmektedir. Ubikinon sitokrom b bölgesi, serbest radikal oluşumunda en etkili olan bölgedir (Seven ve Candan, 1995).

b) Oksidatif hasar oluşturan türler: Metabolizma ürünleri ve sinyal molekülleri olarak ortaya çıkabilirler (McCormick ve ark, 2000).

c) Geçiş metal iyonları: Mn^{+2} , Mo^{+3} , Cu^{+2} , Fe^{+3} , gibi bazı geçiş metalleri de serbest radikal oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

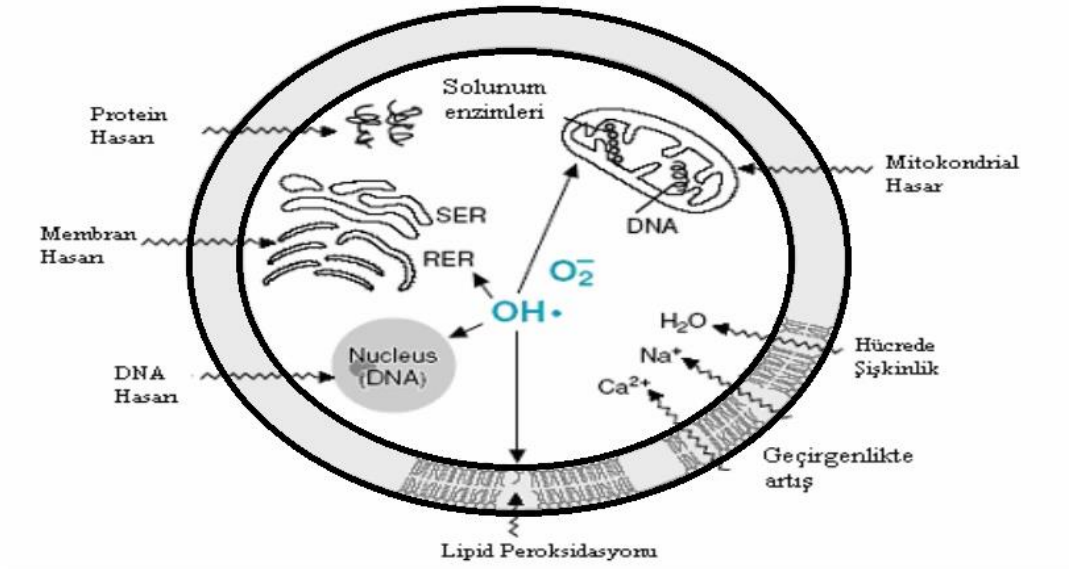
d) Enzimler ve proteinler: Ksantin oksidaz, flavoprotein dehidrogenaz, dihidroorotat dehidrogenaz, aminoasid oksidaz ve triptofan dioksigenaz gibi enzimler de serbest radikal oluşumuna neden olabilmektedir (Ames ve ark, 1993).

e) Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Tiyoller, hidrokinonlar, flavinleri flavoproteinler, katekolaminler, tetrahidropidinler ve antibiyotikler gibi küçük moleküller oksido-redüksiyon reaksiyonlarına girerek serbest radikal oluşturabilirler (Ames ve ark, 1993).

f) Plazma membranı: Plazma membranında bulunan siklooksigenaz ve lipooksigenaz enzim sistemlerinin katalize ettiği araşidonik asit oksidasyonu sonucunda serbest radikaller meydana gelir (Kadiiska ve ark, 2005).

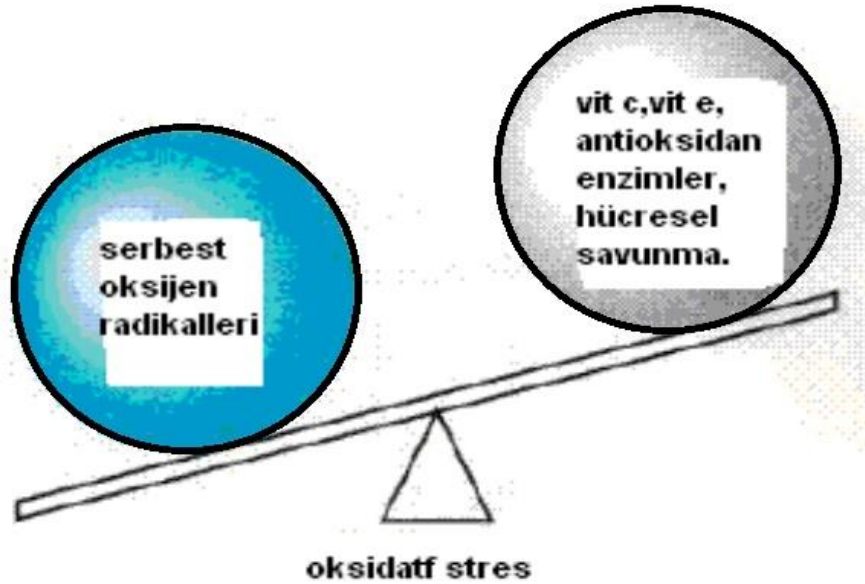
g) Aktive olmuş fagositler: Aktifleşmiş fagositler bakterileri öldürmek için hidrojen peroksit veya hipoklorik asit oluşturdukları için fagositoz sırasında da hücrede önemli ölçüde serbest radikal oluşabilmektedir (Glutteridge, 1995).

h) Oksijen molekülü: Aerobik organizmalar için O_2 esansiyel bir moleküldür. Aynı zamanda O_2 esansiyel bir ajandır. Aerobik organizmalarda radikaller daha çok oksijen radikalleri şeklinde bulunmaktadır (Başaga, 1990).



Şekil 7. Serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarları (Antmen, 2005'den değiştirilerek alınmıştır).

Doku hasarına yol açan bu maddeler, “serbest radikaller”, “oksidan moleküller” ya da “reaktif oksijen türleri (ROS: reactive oxygen species)” olarak adlandırılmaktadır. ROS’un aşırı üretimi de “oksidatif stres” olarak adlandırılmaktadır (Baskol ve ark, 2007).



Şekil 8. Oksidan-antioksidan dengesi (Blokhina ve ark, 2003den değiştirilerek alınmıştır).

Oluşan serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, karbonhidrat, DNA, enzim gibi tüm hayati önem taşıyan bileşiklerine etki ederler. Mitokondride gerçekleşen aerobik

solunumu ve kapiller permeabiliteyi bozar. Ayrıca hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu arttırmaları. Proteaz, ksantin oksidaz, fosfolipaz, elastaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, triptofan dioksijenaz ve galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktifleştirirken, alfa-1-antitripsin gibi bazı savunma sitemlerini inaktive ederler (Aydemir, 2009; Altan ve ark, 2006). ROS'un membran lipidlerine etkisi lipid peroksidasyonudur. Membranda bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilir. Reaksiyona girdiklerinde organizma için zararlı olan peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak tanımlanmaktadır. Proteinlerin serbest radikallerin zararından etkilenme dereceleri aminoasit kompozisyonuna göre değişkenlik gösterir. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi oldukça yüksektir. Bu yüzden triptofan, fenilalanin, sistein, tirozin, histidin, metionin gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenirler. İyonize edici radyasyonla oluşan ROS'lar DNA'yı büyük oranda etkiler. DNA etkilenince hücrede mutasyon ve ölüm gerçekleşebilir. Sitotoksiste, genel olarak nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer farklı bozukluklara bağlıdır. Hidroksil radikali, deoksriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek hücrede değişikliklere yol açar. Eğer mitoz bölünme hasarlı olan DNA'nın kopyalanması ile devam ederse, tümör hücrelerinin oluşumuna sebep olur. Serbest radikallerin lipid ve DNA kadar hayati önemi olmasa da, karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri mevcuttur. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu oluşan hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler oluşur. Bunlar diyabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik olgularda önemli rol oynarlar (Akkuş, 1995). Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerden en önemlileri oksijenden oluşan ROS'lardır. Bunların en önemlileri süperoksit anyonu ($2O_2^-$), hidroksil radikali ($\cdot OH$), nitrik oksit($NO\cdot$), peroksil radikali ($ROO\cdot$) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) olarak sayılabilir (Altan, 2006). Vücutta ROS'un oluşumunu ve meydana getirebileceği hasarı önlemek, ayrıca bunların uzaklaştırılmasını sağlamak için normal fizyolojik şartlarda "antioksidan savunma sistemleri" gelişmiştir. Antioksidan terimi, hedef bir moleküldeki oksidatif hasarı geciktiren veya inhibe eden herhangi bir madde olarak tanımlanmaktadır (Tamer ve ark, 2000; Yokuş ve Çakır, 2012). Aslında serbest radikallerin belli bir miktarda olmaları, organizmanın enfeksiyon ajanlarına ve yabancı moleküllere karşı bağışıklık kazanması açısından önemlidir (Tamer ve ark, 2000). Normalde serbest radikaller ve antioksidanlar arasında olan dengenin serbest radikaller yönünde bozulması durumunda oluşan oksidatif stres telafi

edilemezse diyabet, ateroskleroz, alzheimer, koroner kalp hastalıkları ve kanser gibi pek çok hastalığın oluşmasına zemin hazırlamaktadır (Aydemir ve Sarı, 2009; Yokuş ve Çakır, 2012).

Hücre içinde normal koşullarda var olan düşük seviyelerdeki ROS, hücrenin çoğalması ve hücrel homeostazis için gerekli olan sinyal yollarının aktivasyonunu sağlamaktadır. Fakat hücrelerde artan ROS seviyesinin karsinogenezisin gelişimini oldukça hızlandırdığı da saptanmıştır (Chan ve ark, 2011). Oksidatif stres, hücre ölümüne neden olabilir. Ayrıca hücrel içeriğin ekstrasellüler ortama yayılmasına da sebep olabilmektedir (Henrotin ark, 2003).

Tablo 2. Oksidatif stres ile ilişkilendirilen durumlar (Bokov ve ark, 2004)

Oksidatif Stres ile İlgili Durumlar
Yaşlanma
Ateroskleroz
Kardiyovasküler Hastalık
Kanser
Nörodejeneratif Hastalık
Katarakt
Artrit ve İnflamatuvar Hastalıklar
Diyabet
Şok, Travma ve İskemi
Pankreatit
İnflamatuvar Barsak Hastalıkları ve Kolit
Allerji
İnfeksiyonlar

2.3. Antioksidanlar

Antioksidanlar, canlılarda hücre içi savunma sisteminin bir parçasıdır. ROS oluşumunun meydana getirdiği hasarı önleyen veya ROS oluşumunun etkilerini nötralize ederek ROS oluşumunun etkilerini azaltan birçok savunma mekanizmaları oluşmuştur. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak tanımlanırlar. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler (Reiter, 2000). Antioksidanlar, endojen (doğal) ve ekzojen kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

2.3.1. Endojen antioksidanlar

Kendi arasında enzimatik olanlar ve olmayanlar diye ikiye ayrılır.

2.3.1.1. Enzimatik olanlar

Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), glutatyon-s-transferaz (GST), hidroksiperoksidaz, mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemidir.

2.3.1.2. Enzimatik olmayanlar

α -tokoferol (E vitamini), β -karoten, askorbik asit, melatonin, ürik asit, bilirübin, glutatyon, albümin, transferrin, ferritin, seruloplazmindir.

2.3.2. Ekzojen Antioksidanlar

Allopürinol, oksipürinol, folik asit, C vitamini, trolox-C (E vitamini analogu), asetilsistein, mannitol, ve adenozin sayılabilir (Soyalp, 2011; Gök ve ark, 2006).

Antioksidanlar genel olarak 4 farklı mekanizma ile oksidanları etksiz hale getirirler. Bu mekanizmalar:

Toplayıcı etki (Scavenging): Antioksidanların serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir. Bu etki, antioksidan enzimler tarafından yapılır.

Bastırıcı etki (Quencher): Antioksidanların serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştürerek etki ederler. Bu etki, vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.

Onarıcı etki (Repair): Hedef moleküllerin hasarlanması sonrası antioksidanlar tarafından tamir edilmesi veya temizlenmesi ile bu etki gerçekleşir.

Zincir kırıcı etki (Chain breaking): Antioksidanlar, serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını inaktive ederler. Hemoglobinin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler (Young ve Woodside, 2001; Memişoğulları, 2005).

Tablo 3. Antioksidan sistemler (Bokov ve ark, 2004)

Antioksidan Sistemler	
Endojen Antioksidanlar	Bilirubin, tioller (glutatyon, lipoik asit, N-asetil sistein), NADPH ve NADH, koenzim Q10, ürik asit, enzimler [Cu/Zn ve Mn bağımlı süperoksit dismutaz (SOD), Fe bağımlı katalaz (CAT), selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GSH-Px)]
Diyetle Alınan Antioksidanlar	Vitamin C, vitamin E, β -karoten ve diğer karotenoidler (likopen, lutein), polifenoller (flavonoidler)
Metal Bağlayıcı Proteinler	Albumin (Cu), seruloplazmin (Cu), metallothionein (Cu), ferritin (Fe), transferin (Fe), myoglobin (Fe)

2.4. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı

Bir meme kanseri hücre soyu olan MCF-7 hücreleri ilk defa 1970 yılında 69 yaşında invaziv duktal karsinomali beyaz ırktan bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir (Soule ve ark, 1973). Bu hücre hattı Soule ve arkadaşları tarafından 1973'de Detroit'te kurulmuştur. Michigian Kanser Vakfı -7'nin kısaltması olarak MCF-7 ismi kullanılmıştır. Morfolojisi epitelyaldır. İnsülin benzeri çoğalma faktörü bağlanma proteinlerini sentezler. Meme kanseri ve diğer birçok kanserin oluşumunda, hücre döngüsü kontrol noktalarından olan siklin D1'de oluşan mutasyonlar, aynı şekilde MCF-7 hücrelerinde de vardır. MCF-7 hücre hattında kaspaz 6, 7 ve 9 ve BCL-2 ekspresyonu oldukça etkilidir. Ayrıca p53 ve p21 genlerinin ekspresyonu ve düzenlenmesi normaldir (Chodosh, 1998). MCF-7 hücre hattının çoğalmasında; aşırı artmış östrojen ekspresyonu ve östrojene bağlı proliferasyon, EGF'den bağımsız çoğalma, artmış Her-2/Neu/c-Erb-2 ekspresyonu artmış, N-ras ve Rb proteininin hızlı fosforilasyonu rol oynamaktadır (Martin ve Weber, 2000; Martin ve ark, 1990).

2.5. Hücre Ölüm Mekanizmaları

2.5.1. Apoptoz (Programlı Hücre Ölümü)

Apoptoz kelimesi Yunan asıllıdır. "Apoptoz" terimi ilk defa 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adındaki patologlar tarafından kullanılmıştır. Yunancada 'apo'=ayrılma, 'ptoz'=düşme anlamına gelmektedir (Lowe ve Lin, 2000; Öztürk, 2002, Zimmerman ve Gren, 2001).

Organizmada görevini tamamlamış ya da hasara uğramış hücrelerin diğer hücelere zarar vermemesi için ortadan kaldırıldığı, genetik olarak kontrol edilen, organizmada var olan homeostazı koruyan, aynı zamanda programlanmış hücre ölümü olarak da tanımlanan

biyokimyasal bir olaydır. Apoptozun gerçekleşmesi için enerjiye gereksinim duyulur. Özellikle organizmanın gelişimi ve yetişkin hayatlarında rol oynayan hayati bir işlemdir (Ersöz, 2007; Coşkun ve Özgür, 2011). Hücre ölümleri fizyolojik şartlarda gerçekleştiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü olarak da ifade edilir (Schwartzman ve Cidloski, 1993). Canlının organ gelişimini başarılı bir şekilde sağlayabilmesi için embriyonik gelişme sırasında hücre ölümlerinin gerçekleşmesi gereklidir (Majno ve Joris, 1995; Pınarbaşı, 2007). Gelişim, yaşlanma ve dokulardaki hücrenin devamlılığını sağlamak için homeostatik bir mekanizma olarak ifade edilen apoptoz, aynı zamanda çeşitli hastalık ya da zararlı ajanlar nedeniyle hücreler zarar gördüğünde immün reaksiyonlar gibi bir savunma mekanizması oluşturmaktadır. Hücre içi stres artışı, reaktif oksijen türlerinin artışı, hücre içi kalsiyum dengelerinin bozulması gibi sebepler dengesi bozulan hücreyi apoptoza götürür. Bu olaylar kontrol edilemezse hücre içi dengesizlik, olası genetik bozukluklar ve hatta kanser oluşumu ile sonuçlanabileceği için apoptozun bu tür hücreleri yok ederek canlının genel sağlığının korunmasını sağlar (Eröz ve ark, 2012).

Apoptoz mekanizması; ilk önce apoptozun başlatılması, sonra hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu, hücrede çeşitli morfolojik, biyokimyasal değişikliklerin oluşması ve son olarak fagositoz olmak üzere dört aşamada gerçekleşir. Hücrenin apoptoza gidebilmesi için ilgili genetik mekanizmanın hücre tarafından harekete geçirilmesi gerekmektedir. Apoptotik süreçte, apoptoz için hücrenin içinden ya da dışından gelen sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişimler gözlenir. Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu, hücre içi ve dışı gelen sinyaller yardımıyla gerçekleşir. Gelen uyarıyla birlikte hücre, yapıştığı zeminden ve komşu hücrelerden ayrılır ve küçülür. Yani hücreler küçülerek kondanse olmaya başlar, hücre iskeleti dağılır, çekirdek zarı yer yer erir ve çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır. DNA fragmantasyonu, kromatin kondensasyonu oluşmaya başlar.

Sonrasında membranla çevrili olan veziküller görülmeye başlanır Süreç devam ettikçe bu veziküller, komşu hücreler ya da fagositler tarafından fagosite edilir. Her saniye bir milyona yakın hücremiz apoptoz sayesinde vücuttan uzaklaştırılmakta ve bu hücrelerin yerine yenileri yapılmaktadır. Yapım (mitoz) ile yıkım (apoptoz) arasında kontrollü bir denge vardır. Çok hücreli canlılarda homeostazi, hücre bölünmesi ve hücre ölümü arasında kurulan denge ile sağlanır. Bu dengenin apoptozun lehine ya da aleyhine kayması birçok hastalığa sebep olabilmektedir. Mekanizmanın herhangi bir noktasında meydana gelen bir

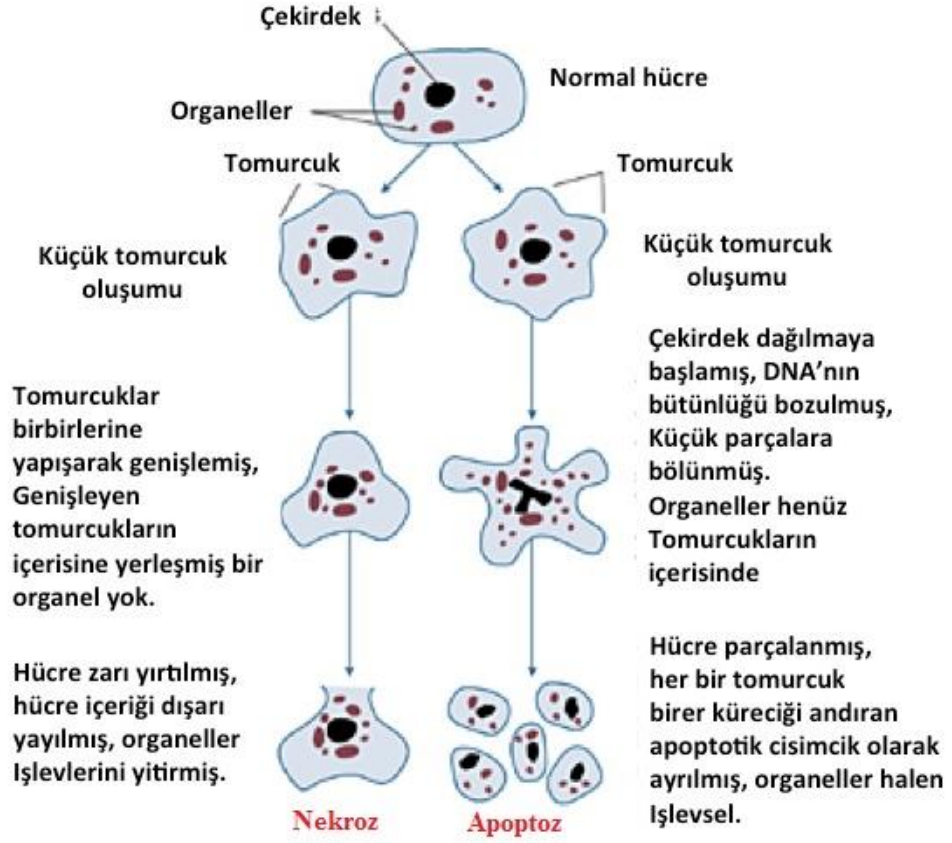
aksaklık apoptozun gerçekleşmemesiyle sonuçlanıp neoplastik hücre popülasyonunun kontrolsüz artışına ve tümör hücrelerinin bağışıklık sisteminin denetiminden kaçışına neden olabilmektedir. Ayrıca apoptozun gereksiz olduğu veya hızlandığı durumlarda ise AIDS, insülin bağımlı diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, hepatit C enfeksiyonu, miyokard enfarktüsü, ateroskleroz gibi hastalıklara sebebiyet verebilir. Bu açıdan bu denge vücudumuz için çok önem teşkil etmektedir (Öztürk, 2002). Ayrıca kemoterapi ve radyoterapinin apoptozu tetikleyerek etki ettiği göz önünde bulundurulduğunda, apoptoza yönelmeyen kanser hücreleri terapiye de cevap vermeyebilir. Dolayısıyla apoptoza karşı kanser hücrelerinde kazanılan direnç önemli bir problem olmaktadır. Bu sebeple hücrelerin hangi yollarla hücre ölümüne direnç kazandığı ve apoptoz yolağındaki bozuklukların kansere nasıl yol açtığını anlamak, mevcut tedavi yöntemlerinin gelişmesine ve yeni terapilerin geliştirilmesine katkı sağlayabilir (Baran, 2018).

2.5.2. Nekroz

Diğer hücre ölüm türü de nekrozdur. Nekrozda hücre zarı veya hücredeki metabolik süreçler hasar görür ve zar geçirgenliği bozular. Bunun sonucunda hücre şişer. Sonunda hücre membranı patlayarak hücre içindeki maddeler dışarı dağılır. Böylece inflamasyon uyarılır (Solakoğlu, 2009). Apoptozda hücre, hücre ölüm yolundaki biyokimyasal reaksiyonlara aktif olarak katılmaktadır, dolayısıyla hücre intiharı olarak da adlandırılmaktadır. Nekrozda ise hücre ölümü, hücre için uygun olmayan ortamlardaki değişiklikler sonucu gerçekleşmektedir. Bu nedenle nekrozda hücre, biyolojik bir kaza sonucu ölümle sonuçlanan masum bir kurban olarak görülebilir (Rosser ve Gores, 1995).

Tablo 4. Apoptoz ve nekrozda morfolojik ve biyokimyasal özellikler (Hekim, 2017).

Apoptoz	Nekroz
Hücrenin organellerinin büzülmesi ve kromatinin kondenzasyonu	Hücrenin şişmesi ve plazma membranının parçalanması
Hücrel içerik sızıntısı olmaz	Hücrel içerik sızıntısı olur
Apoptotik cisimler fagositler tarafından yutulur	Hücre ve çekirdeksel lizis
Spesifik sistein proteaz, kaspaz aktivasyonu, internükleozomal DNA fragmentasyonu	Nekrotik hücre yoktur
Sinyal mekanizmalarıyla düzenlenir.	Yetersiz bir şekilde düzenlenir.
İnflamatuar yanıtı neden olmaz	İnflamatuar yanıtı neden olur

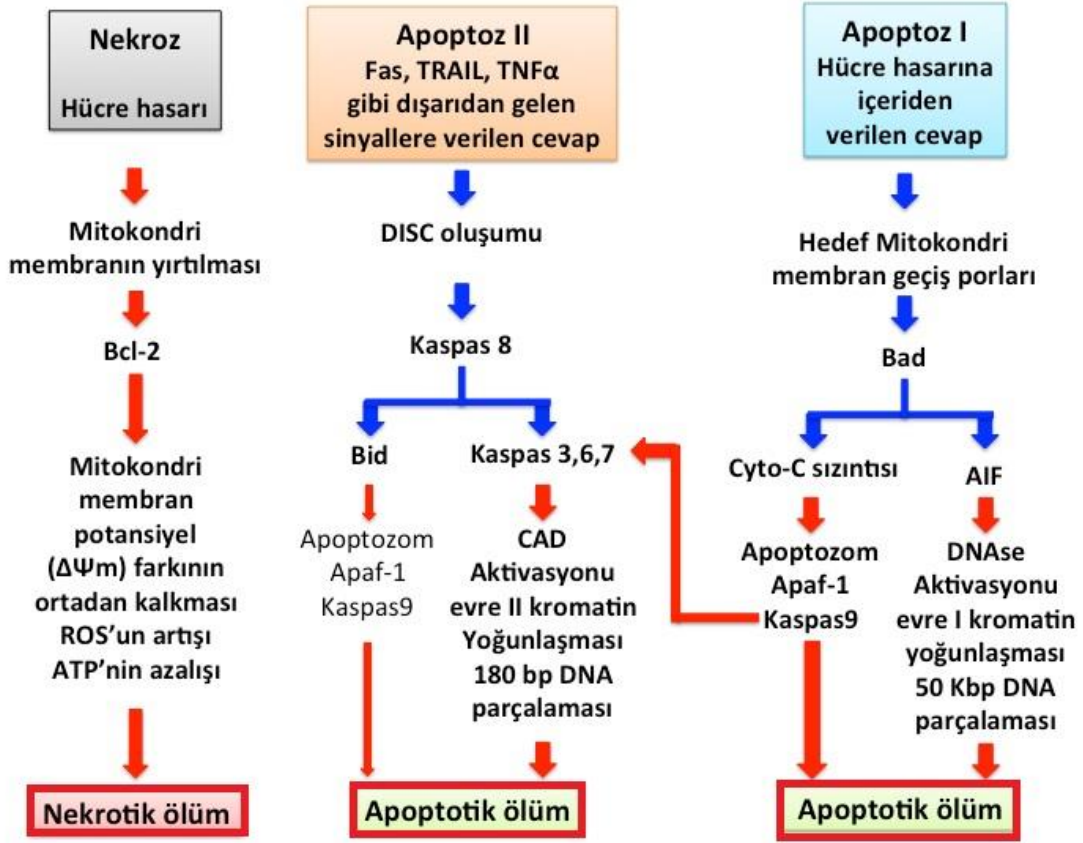


Şekil 9. Apoptoz ve nekrozun birbirinden farklı yönleri (Hekim, 2017'den değiştirilerek alınmıştır).

Bir hücrenin apoptoza ya da nekroza gideceği uyarıcının tipi veya seviyesine göre belirlenir. Radyasyon, sıcaklık, hipoksi ve sitotoksik antikanser ilaçlar gibi zararlı uyarılar düşük dozlarda apoptoza, yüksek dozlarda ise nekroza neden olabilmektedir. Özellikle kanser ile bağlantılı olan apoptoz, kaspazlar olarak adlandırılan bir grup sistein proteazların aktivasyonu ile gerçekleşen, gerçekleşmesi için enerjiye gereksinim duyan bir süreçtir (Elmore, 2007; Yerlikaya, 2009; Altunkaynak ve Özbek, 2008). Eğer bir hücrede proapoptotik proteinler, antiapoptotik proteinlere göre daha fazla ise hücre apoptoza eğilimlidir. Ancak tam tersi durumda antiapoptotik proteinler daha fazla ise apoptoza daha az eğilimlidir. Proapoptotik üyeler; BAD, BAX, BAK, p53, BİD, BİM, HRK, PUMA, NOXA, BOK/MTD olarak sıralanabilir. Antiapoptotik üyeler ise BCL-2, BCL-X_L ve MCL-1, BCL-W, AI/BF-1, BCL-B/BCL-2L10 olarak sıralanabilir (Coşkun ve Özgür, 2011). Hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceği, hücre içi BCL-2/BAX oranına göre belirlenebilir.

BAX'ın fazla olduğu durumlarda hücre apoptoza gidecektir. Eğer BCL-2 fazla ise apoptoz inhibe edilecektir (Ersöz, 2007). Yüksek miktarda BCL-2 ifadesinin neuroblastoma, glioblastoma ve meme kanseri hücrelerinde TRAIL tarafından indüklenen apoptozu inhibe ettiği, tümörün malignite derecesini arttırdığı ve birçok kanser türünde kemoterapi ilaçlarına radyoterapi oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Findley ve ark, 1997).

DNA gardiyanı olarak da bilinen p53 proteini proapoptotik bir proteindir. Tümör baskılayıcı bir görevi vardır. (Solakoğlu, 2009; Yerlikaya ve Dokudur, 2009). Kaspaz 3, 7, 8 ve 9 enzimlerini aktive ederek apoptozu uyarır. Böylece malignant oluşumunu engeller (Yerlikaya ve Dokudur, 2009). p53, DNA ya da hücre hasar görürse, DNA'nın belli genlerinin aktivasyonuna, yani yapımlarının artmasına (BAX, Apaf-1, Fas), belli genlerin ise baskılanmasına (BCL-2, BCL-X_L) yol açarak apoptozu tetikler (Solakoğlu, 2009). Kanserde en sık görülen (%50-55) mutant gen p53'dür. Normal bir hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde, buna paralel olarak p53 seviyesi artar. Artan p53 seviyesi, hücre siklusunu bölünme kontrol noktalarından G1'de durdurup DNA onarımı için hücreye zaman kazandırır. Hasar tamir edilemezse bile hücre apoptoza gider (Cabadak, 2008). Ancak p53 proteini mutant olan hasarlı hücreler, G1 fazında durmazlar, onarım için yeterli zaman da olmadığı için G1 fazından sonra gelen S fazında hata iki katına çıkar (Pazarbaşı ve Kasap, 2003). Apoptozun belirlenmesinde pek çok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler; hematoksilen-eozin boyama, giemsa boyama, floresan mikroskopi, elektron mikroskopi, faz kontrast mikroskopi, anneksin V yöntemi, TUNEL yöntemi, M30 yöntemi, kaspaz-3 yöntemi, agaroz jel elektroforezi, western blotting, flow sitometri, ELIZA (enzyme linked immunosorbent assay) olarak sayılabilir (Özay ve Ülker, 2008; Özçelik ark, 1996; Değerli, 1998).

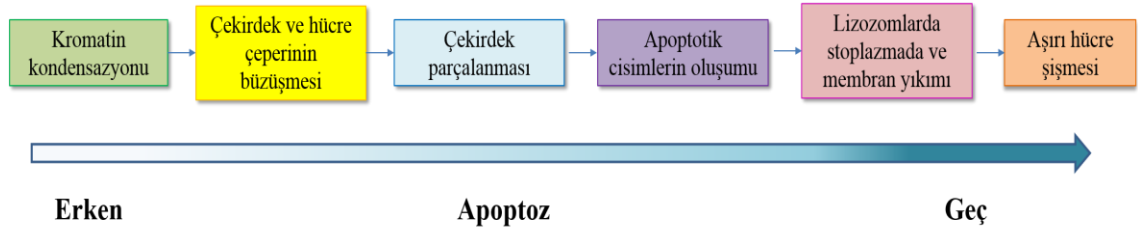


Şekil 10. Nekroz ve apoptozun yolları (Hekim, 2017'den değiştirilerek alınmıştır).

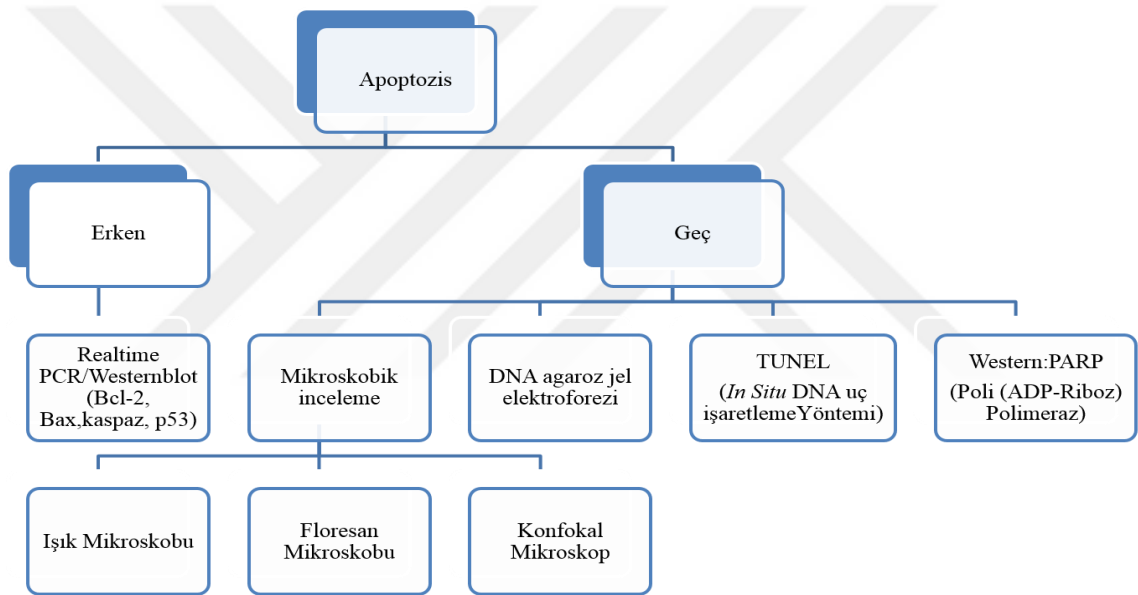
2.5.3. Apoptozda Görülen Morfolojik Değişiklikler

Apoptozu tetikleyen sinyal yolları aktif oldukça hücre içi kalsiyum hücre dışına verilir ve hücre içindeki ATP tamamıyla kullanılır. Hücre zarı bozulmadan hücre küçülmeye başlar. Kromatinler çekirdek zarına doğru yoğunlaşmaya başlar. Sonra sırasıyla, yüzey organellerinin kaybı, sitoplazmik baloncuklar ve apoptotik cisimlerin oluşması olarak sıralanabilir. Apoptozu uğrayan hücreler önce komşu hücrelerle olan temasını kaybeder, ardından yuvarlaklaşır (Wyllie, 1980). Hücreden hücreye bu farklılıklar değişkenlik gösterebilir. Fakat genellikle çekirdek büzülür, düzensizleşir. Kromatin yoğunlaşır ve parçalar halinde bir araya toplanır (Geoffey ve Robert, 2004). Na, K, Cl pompalarında ve iyon kanallarındaki aktivasyon sisteminin durması sonucu hücre dışı ve içi arasındaki sıvı hareketinin gerçekleşmemesinden dolayı hücreler birleşme bölgesinden apoptozun erken evresinde ayrılır ve belirgin bir şekilde büzülür. Aynı anda hücrede değişik yüzey çıkıntıları ve kıvrıntılarının oluştuğu, bunların membranla çevrili olarak hücreden ayrılmasıyla apoptotik cisimlerin meydana geldiği bildirilmektedir. Aktif kaspazlar diğer apoptotik

proteinlerin indüklenmesine sebep olur (Elmore, 2007). Apoptozda görülen morfolojik değişiklikler Şekil 11’de belirtilmiştir (Huerta, 2007).



Şekil 11. Apoptozda oluşan morfolojik değişiklikler (Huerta 2007’den değiştirilerek alınmıştır).



Şekil 12. Erken ve geç apoptozu belirlemek için kullanılan yöntemler (Huerta, 2007’den değiştirilerek alınmıştır).

2.5.4. Kaspaz Aktivasyon Mekanizması

Kaspazlar, apoptoz ve inflamasyonda görev alan korunmuş bir proteaz ailesini oluşturur. Programlanmış hücre ölümünün gerçekleşmesi için gerekli olan bir grup sistin proteazlardır. Sistin proteaz aktivitesi kökenine veya ölüm uyarısına bakılmaksızın apoptoza uğrayan tüm hücrelerde saptanabilir. İsimlerini aspartik asit rezidülerin hemen sonrasında kesmek için sistein rezidülerini kullanmalarından dolayı almışlardır (cysteine

aspartate spesifik proteases). İnsanlarda 14 ayrı kaspaz bulunmaktadır ve fonksiyonlarına bağlı olarak üç alt sınıfa ayrılmaktadır (Alenzi ve ark, 2010).

Alt Sınıf I: Apoptoz etkinleştirici/başlatıcı kaspaz 2, 8, 9 ve 10

Alt Sınıf II: Apoptoz infazcı/efektör kaspaz 3, 6 ve 7

Alt Sınıf III: Apoptoz inflamatuvar mediatör kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14

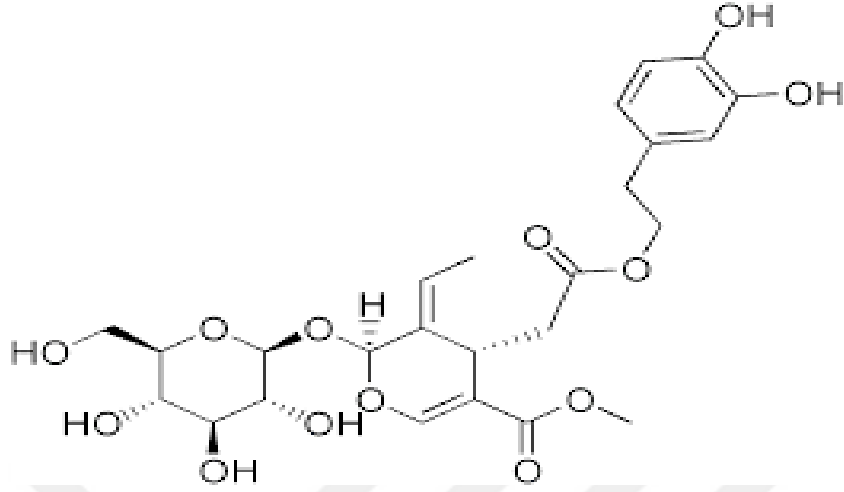
Çeşitli çalışmalardan elde edilen bulgulara göre apoptoz bozulması kaynaklı tümör oluşmasının tümör ilerlemesine ve tedaviye olan direnci harekete geçirdiğini göstermiştir (Edinger ve Thompson, 2004). Kanser tedavilerinde seçici olarak apoptozun tetiklenmesi önemli bir hedefdir (Call ve ark, 2008). Bu sebeple antikanser tedavilerinin klinik çalışmalarında erken apoptoz biyomarkerlerinin izlenmesi önem teşkil eder.

2.6. Oleuropein

Zeytin ağacı fenolik maddelerce zengin ve önemli biyolojik özelliklere sahip pek çok bileşen ihtiva eder. Bu bileşenlerin başlıcası oleuropeindir (Bouaziz ve ark, 2008). Oleuropein, ilk defa 1908 yılında Bourquelot ve Vintilesco tarafından keşfedilmesine rağmen bu bileşiğin yapısı ancak 1960 yılında tanımlanabilmiştir (Panizzi ve ark, 1960). Oleuropein, 10-hidroksi-oleuropein, ligstroside ve 10-hidroksiligstroside gibi benzer bileşiklerle birlikte, zeytin ağacında bolca bulunan fenolik, doğal bir antimikrobiyaldir.

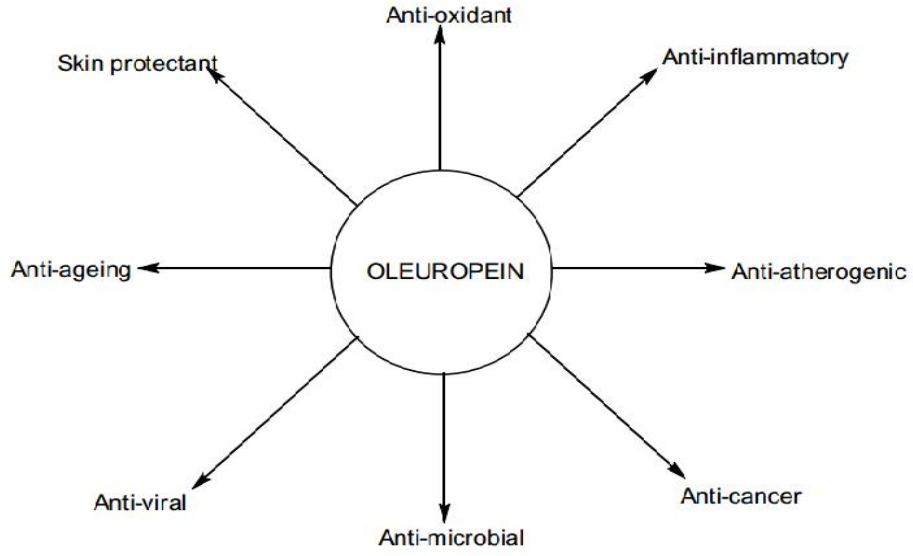
Zeytin ağaçları, kendilerine hastalık ve zararlılara karşı direnç kazandıran "oleuropein" adlı bir madde ürettikleri için çok dayanıklı ve aynı zamanda uzun süreli yaşamları vardır. Oleuropeinin içeriğinde "elenolik asit" ve oleuropein türevi olan "kalsiyum elenolat" mevcuttur. Bu sayede çok çeşitli mikroorganizma gruplarını uzak tutma özelliği vardır. Ayrıca oleuropein, zeytin meyvelerinin acı tadından da sorumludur. Bu yüzden zeytinin yenilebilir olması için mutlaka ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Zeytinin hasattan hemen sonra tüketilebilir nitelikte olamamasından sorumlu olan bu glikozit suda çözünbilme özelliğine sahiptir. Klasik salamura yöntemi, alkali uygulaması, enzimatik yöntem ya da mikroorganizmalarla hidrolize edilerek zeytinden uzaklaştırılabilmektedir (Marsillo ve Lanza, 1998; Brenes ve DeCastro, 1998). Oleuropein,

kimyasal yapı formülüne bakıldığında elenolik asit ve hidroksitriosolün heterozidik esteridir.



Şekil 13. Oleuropeinin kimyasal yapı formülü (Winkelhausen ve ark, 2005).

Zeytinyağı, değişken miktarda triaçilgliserol ve az miktarda serbest asit, gliserol, sterol, tokoferol ve fenol içeren Akdeniz diyetinin önemli bir bileşenidir. Zeytinyağının içinde bulunan oleuropeinin şekil.14'te de görüldüğü gibi antioksidan (ROS atma etkisi, LDL'nin oksidasyonunu engelleme), anti-enflamatuar (lipoksigenaz inhibisyonu), anti-aterojenik, antikanser (antimigrasyon etkisi, apoptoz indüksiyon, anjiyogenez inhibisyonu), antimikrobiyal (bakteri hücre membranı zararı), antiviral (viral kılıf etkileşimi), nöroprotektif (oksidatif stres azaltma), hepatoprotektif (karaciğer yağlanmasını azaltma) olmak üzere pek çok etkileri vardır. Tüm bu etkilerden dolayı Akdeniz ülkelerinde ticari olarak gıda takviyesi olarak mevcuttur (Visioli ve ark, 1998; Carluccio ve ark, 2003; Owen ve ark, 2000; Tripoli ve ark, 2005; Fredrickson 2000; Andreadou ve ark 2007; Andreadou ve ark 2006).



Şekil 14. Oleuropeinin farmakolojik etkileri (Omar, 2010).

2.6.1. Oleuropeinin Antikanserojenik ve Apoptotik ve Etkisi

Doğal antimikrobiyal maddeler arasında gösterilen oleuropeinin, mikroorganizmaların gelişme hızını yavaşlattığı ve aynı zamanda inhibe ettiği bildirilmektedir. Yani daha çok antimikrobiyal etkilerinden bahsedilebilir (Yıldız ve Uylaşer, 2011).

Oleuropein ve parçalanma ürünü olan hidroksitirosol çok etkili antioksidanlar olarak bilinmektedir. Ayrıca oleuropein preparatlarının bağışıklık sistemini güçlendirici, kan basıncı ve kan şekerini düzenleyici gibi pek çok farmakolojik etkileri de tespit edilmiştir. Ayrıca zeytin ürünlerinde bulunan biyofenoller, serbest radikallere karşı aktivite göstermektedir. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalar zeytinyağının kolon, deri, meme ve karaciğer kanserlerine karşı koruma sağladığını göstermiştir. Zeytinyağının kanserden koruyucu özellikleri arasında tekli doymamış yağ asitleri, polifenoller adlı antioksidanlar ve zeytinyağına özgü squalen adlı madde önem teşkil etmektedir (Mutaf, 2017). Oleuropeinin farklı kanser hücre hatlarında antitümör etkisi vardır.

Tablo 5. Oleuropeinin farklı kanser hücre hatlarında antitümör etkisi (Barbaro ve ark, 2014).

Hücre Hattı	Kanser Tipi
MCF-7	Meme adenokarsinoma
MDA	Meme adenokarsinoma
T-47D	Meme duktal karsinoma
HT 29	Kolorektal adenokarsinoma
Caco-2	Kolorektal adenokarsinoma
LoVo	Kolorektal adenokarsinoma
TF 1	Erythroleukemia
LN 18	Glioblastoma
A549	Akciğer karsinoma
RPMI 7951	Melanoma
LNCaP ve DU145	Prostat kanseri
786-O	Böbrek hücresi adenokarsinoma
T-24	İdrar torbası karsinoma

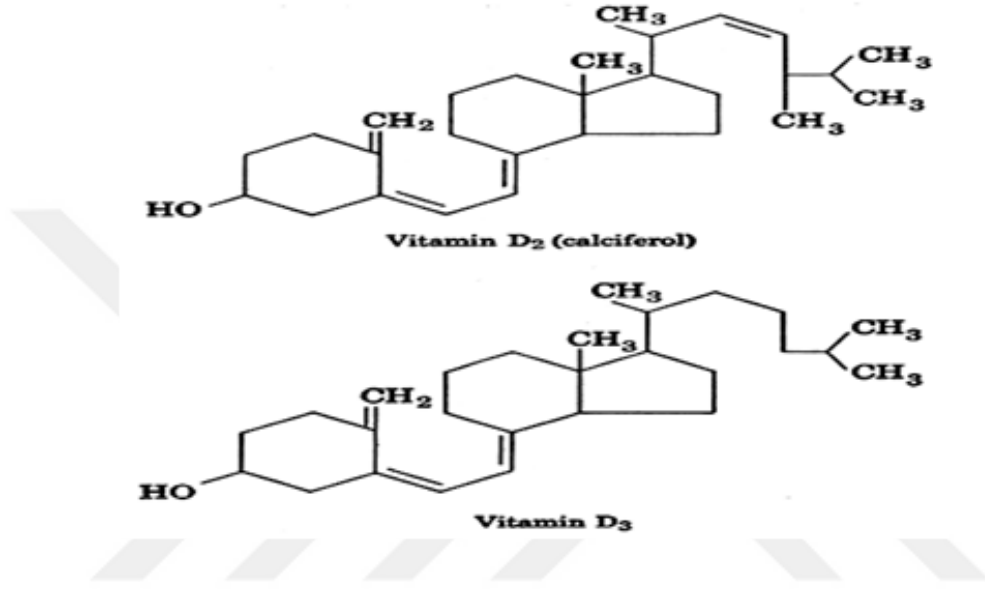
2.7. Vitamin D

D vitamini hormon benzeri fonksiyonları olan, yağda ve organik çözücülerde eriyen, fakat suda erimeyen bir grup sterol olarak tanımlanmaktaydı. (Hochberg, 2004; Wranicz ve Szostak-Wegierek, 2014). Dolayısıyla günümüze kadar hormon mu, yoksa bir vitamin mi olduğuna dair tartışmalar hala sürmekteydi. Ancak, günümüzde her organ ve dokuya reseptörleri sayesinde ulaştığı için hormon olarak tanımlanmaktadır (Rusinska ve ark, 2018). D vitamini, kalsiyum ve fosfor metabolizmasının devamlılığının sağlanmasında en önemli rolü oynayan moleküldür (Hochberg, 2004; Özsoylu, 1988). D vitamini sadece omurgalılar için esansiyeldir. Kalsiyum homeostazında önemli rol oynar. Serum ve vücut sıvılarında kalsiyum ve fosfor miktarının artmasını sağlar. Kemik büyümesi ve kemikleşmeye yardımcı olur. Hedef organları böbrekler, ince bağırsaklar ve kemiktir. Bu organlardaki etkilerini aktif formu olan kalsitriol tarafından gerçekleştirilir. Eksikliğinde çocuklarda raşitizm, rikets hastalığı, yetişkinlerde osteoporoz gelişir (Hochberg, 2004).

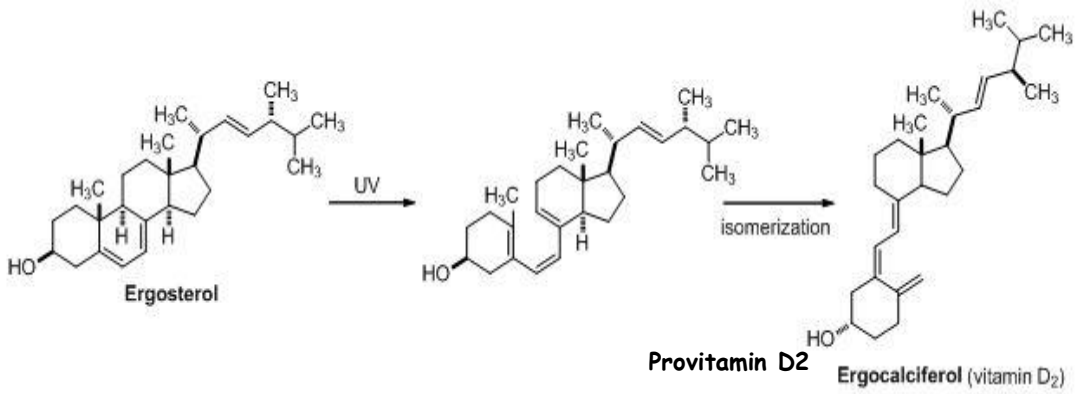
Vitamin D, vücudumuz tarafından sentezlenebilir. Güneş ışığının etkisiyle deride dehidrokolesterol molekülünden sentezlenir. Balık yağında ve özel katkılı yiyecekler haricinde çok yaygın bulunmaz. Sadece kutup bölgelerine yakın bölgelerde olduğu gibi güneş ışınlarının yeterli olmadığı yerlerde besin yoluyla alınması elzemdir (Hollick, 2006). Temel D vitamini formları, D₂ ve D₃ molekülleri olarak sayılabilir. Bazı bitkilerde ışına maruz bırakılmış mayalarda bulunan D₂ vitamini (ergokalsiferol) bulunur. D₂ vitamininin provitamini ergosteroldür ve ergosterinden sentezlenmektedir. Hayvanlarda ve balık

yağında doğal olarak bulunan D₃ vitamini (kolekalsiferol) bulunmaktadır. D₃ vitamininin provitamini 7-dehidrokolseteroldür ve kolesterinden sentezlenmektedir D₂ vitamininin D₃ vitamininden farkı, 22. ve 23. karbonlar arasında çift bağı ve 24. karbona bağlı metil grubudur (De Luca ve Zierold, 1998).

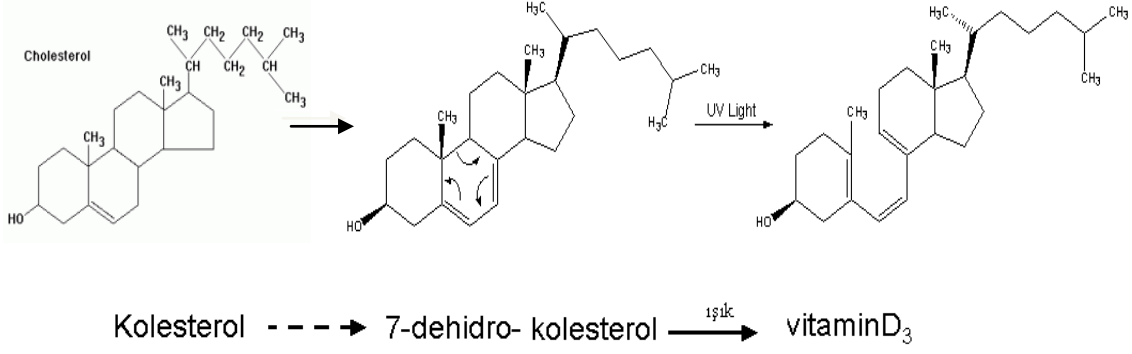
Temel D vitamini formları olan D₂ ve D₃ moleküllerinin kimyasal yapısı şekilde gösterilmiştir.



Şekil 15. Vitamin D₂ ve D₃ moleküllerinin kimyasal yapısı



Şekil 16. Ergosterolden D₂ vitamini oluşumu



Şekil 17. Kolesterolden D₃ vitamini oluşumu

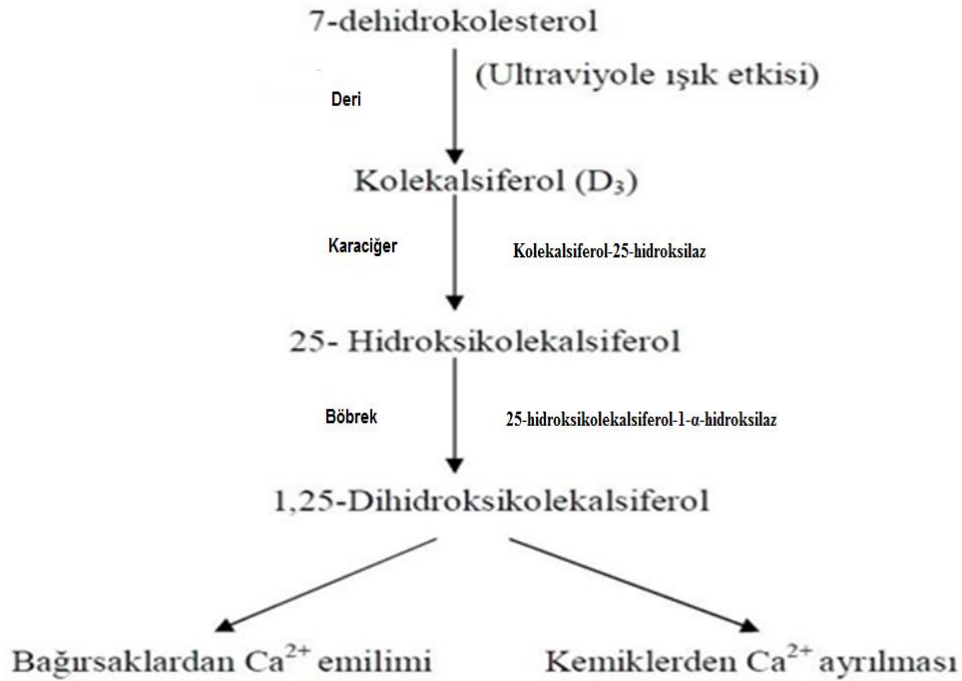
İnsan vücudunda vitamin D formlarından sadece D₃ vitamini sentezlenir. Bitkisel kökenli D₂ vitamini (ergokalsiferol) ise mor ötesi ışınlar aracılığı ile yapraklarda sentezlenir. Her ikisi de hem diyetle alınır, hem de sentetik olarak üretilebilir. Güneşle temas sürecinde yüksek enerjili mor ötesi UNB ışınları (290-315 nm) epidermisi geçer ve plazma membranlarında bulunan 7-dehidrokolsterol (7DHC) tarafından absorbe edilir ve böylece previtamin D₃ oluşur. Bu oluşum sırasında vitamin D₃ plazma membrandan ekstraselüler boşluğa atılır ve dermal kapiler yatakta D vitamini bağlayıcı proteine (DBP; Vitamin D Binding Protein) bağlanarak sirkülasyona geçer. DBP, yüksek affiniteli taşıyıcı protein olarak bilinir (Holick, 2004). Hayvansal besinlerden alınan D₃ vitamini veya bitkisel besinlerden alınan D₂ vitamini duodenum ve jejunumdan emilir. Emilen D vitaminleri yağda erdiği için emilimi safra ile gerçekleşir. Emilen D vitaminleri DBP'ye bağlanarak lümendeki lipidlerle birlikte lenfatik kanallar yoluyla dolaşıma geçerek karaciğere ulaşır. Gerek deride sentezlenen, gerekse sindirim sisteminden gelerek emilen D vitamini karaciğere geldikten sonra metabolizmaları aynıdır (De Luca ve Zierold, 1998).

D₂ ve D₃ vitamini normalde inaktiftirler. Bunlar karaciğer ve böbrekte gerçekleşen iki hidroksilasyonla aktive edilirler. Karaciğere gelen D vitamini hepatosit mikrozomlarda bulunan kolekalsiferol-25-hidroksilaz enzimi aracılığıyla 25 nolu karbon (C-25) molekülü hidroksilasyona uğrar ve 25-hidroksikolekalsiferole (25-OH-D₃) dönüşür. Bu madde kalsidiol olarak da bilinir. (25-OH-D₃) biyolojik olarak inaktiftir. D vitamininin önemli bir kısmı (25-OH-D₃)'e dönüşerek kana geçse de az bir kısmı hepatositlerde glukoronie olup, safraya atılarak barsağa taşınır ve ileumdan tekrar emilir (enterohepatik dolaşım). Enterohepatik dolaşım ile karaciğere gelen D vitamini metabolitleri de karaciğerde katabolize olur. Vitamin D metabolizmasında esas aktivasyon basamağı böbreklerde yer alır. 25-

hidroksikolekalsiferol-1- α -hidroksilaz enzimi tarafından katalizlenir. Bu hidroksilasyonun sonucunda oluşan 1,25-dihidroksikolekalsiferole (1,25(OH)₂D) dönüşür. Bir bölümü de 24,25 dihidroksikolekalsiferole (24,25(OH)₂D) dönüşür. 1,25(OH)₂D, D₃ vitamininin en aktif formudur ve D vitamininin bütün etkilerinden sorumludur. 25-OH-D₃'ün yarı ömrü yaklaşık 10 gündür. Bu yüzden biyolojik olarak daha aktif olan, ancak yarı ömrü 15 saat olan 1,25 dihidroksi vitamin D'nin depo formu gibi düşünülebilir (Dittmer ve Thompson, 2011).

Tablo 6. D Vitamini ve plazmadaki metabolitleri (Burtis ve ark, 2012).

	Konsantrasyon	Serbest (%)	Yarı ömür
Vitamin D	<0,2-20 ng/ml <0,5-52 nmol/L	-	1-2 gün
25-Hidroksivitamin D	<10-65 ng/ml <25-162 nmol/L	0,03	2-3 hafta
1,25 Dihidroksivitamin D	<15-60 ng/ml <36-144 nmol/L	0,4	4-6 saat

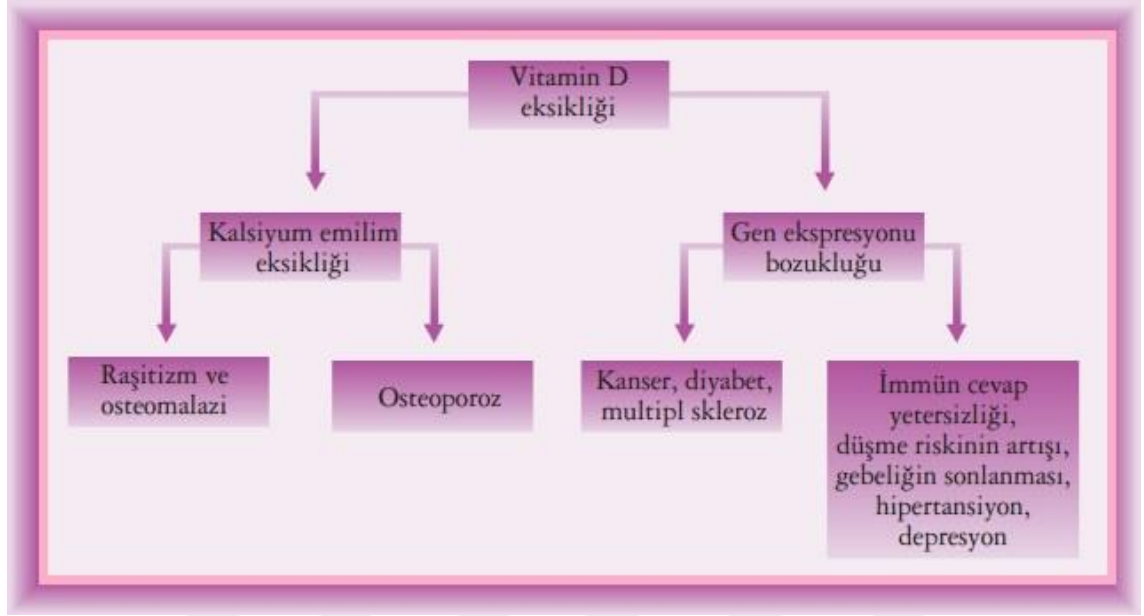


Şekil 18. Vitamin D metabolizması (Akbel, 2005'den değiştirilerek alınmıştır).

D vitamini yetersizliğinin önemli bir sebebi güneş ışınlarından yetersiz faydalanmadır. Osteomalazide tedavi kalsiyum suplementasyonunu da içermelidir. İleri derecede D vitamini eksikliği, mineralizasyon defektine neden olarak çocuklarda ricketse, erişkinlerde ise osteomalaziye yol açar. İntestinal kalsiyum emiliminin azalması ve

vücuttaki kalsiyum dengesinin bozulmasına yol açar. Yetersiz kalsiyum alımı ise sekonder hiperparatiroidizmle ve osteopeniyle sonuçlanır (Dawson-Hughes ve ark, 1991).

D vitamini eksikliğinde etkili mekanizmalar ve ilişkili rahatsızlıklar Şekil 19’da görülmektedir.



Şekil 19. Vitamin D eksikliğinde etkili mekanizmalar ve ilişkili rahatsızlıklar (Tezcan, 2012’den değiştirilerek alınmıştır).

D vitamini fazla alındığında toksik etki de gösterebilir. D vitamini intoksikasyonunun temel bulguları arasında sindirim kanalından fazla kalsiyum emilmesi sonucu ortaya çıkan hiperkalsemi gösterilebilir. Kalsiyum, sinir, kalp, kas, sindirim sistemi ve böbrekleri etkiler. Hiperkalsemide yorgunluk, kaslarda ileri derecede güçsüzlük, hipotoni, karın ağrısı, bulantı, kusma, kabızlık, peptik ülser, poliüri, dehidratasyon, bilinç bulanıklığı, koma, hipertansiyon, böbrek yetmezliği gibi bulgular gelişebilir (Balkan ve Ünal, 2013).

D vitamini, birçok hastalığın gelişmesini engellemekte veya hastalığın bulgularını hafifletmektedir. Bu hastalıklar; otoimmün hastalıklar, koroner hastalıklar, akciğer hastalıkları, alerji, osteoporoz/osteopenia, depresyon, şizofren, migren, epilepsi, diyabet, obezite, inflamatuvar bağırsak hastalığı, romatoid artrit, multipl skleroz, enfeksiyöz

hastalıklar, paraziter hastalıklar ve pek çok kanser çeşidi (prostat, meme, kolon, beyin) olarak sıralanabilir (Hollick, 2004).

2.7.1. Vitamin D'nin Antikanserojenik ve Apoptotik Etkisi

D vitamininin vücudumuzun optimal sağlığı için gerekli olduğu bilinmektedir. Birçok hastalığın gelişmesini engellediğini ve vücudun sağlığının devamlılığını sağlamada etkili olduğu bilinmektedir. Son dönemde 1- α -hidroksilaz enziminin immun sistem üzerinde saptanması, biyolojik etkilerinin daha kapsamlı olduğunu göstermektedir. Bazı lösemi hücrelerinin 1,25OH₂D₃ ile inkübasyonu ile normal monositler hücrelere diferansiye olduğu saptanmıştır. Bu yönüyle D vitamini, immun sistem modülasyonu, kanserden korunma ve tedavi açısından da güncellik kazanmıştır (Chesney, 2010). Kanser ve D vitamini ilişkisi ilk olarak 1941 yılında ortaya konulmuştur (Apperly, 1941). Daha sonra 2005 yılında yapılan çalışmada 25OH₂D₃ düzeyinin yüksekliği özellikle kolorektal, ayrıca meme ve prostat kanseri riskini azalttığı ortaya konulmuştur (Giovanucci, 2005). Yapılan son çalışmalar D vitamininin iyi huylu (benin) ve kötü huylu (malin) hücrelerde proliferasyonu azalttığı, apoptozu indüklediğini göstermektedir. DNA hasarı yaratan ajanlar, oksidatif stres, belirli onkogenlerin aktivasyonu, tümör supresör gen inaktivasyonu, mitogenik stimülasyon gibi çeşitli stres koşulları da hücrelerde onkogenik değişikliklere yol açabilmektedir (Kıdır, 2013).

Tablo 7. Kalsitriolün antikanser etkisinin mekanizması (Feldman ve ark, 2014).

Proliferasyon	P21 ve p27 ekspresyonu artışı CDKs, siklinler, MYC ve RB ekspresyonunun azalışı
Apoptoz	BAX artışı BCL-2 azalışı Radyasyon ve kemoterapi duyarlılığının artışı
Diferansiyasyon	Miyeloid lösemi hücrelerinin monositlere ayrılması Kazein, lipitler, PSA, E-cadherin gibi diferansiyasyon faktörlerinin ekspresyonunun artışı
İnflamasyon	COX2, PG reseptörleri, stres kinaz ve NF- κ B sinyal yollarının ekspresyonunun inhibisyonu TIMP 1 ve E-cadherin cevabının artışı
İnvazyon ve metastaz	MMP9, α 6 integrin, 4 integrin, plasminojen aktivatör ekspresyonunun inhibisyonu
Anjiyogenez	HIF1 α , VEGF, IL-8, tenasin C, PGE2 seviyelerinin azalışı

2.7.2. Vitamin D ve Meme Kanseriyle ilgili Pre-Klinik Çalışmalar

Meme de dahil olmak üzere vücuttaki çeşitli böbrek dışı dokular dolaşımdaki 25(OH)D₃'den aktif D vitamini metaboliti olan 1,25(OH)₂D'nin oluşumu için gerekli enzim olan 1- α -hidroksilazı içermektedir. Lokal olarak sentez edilen 1,25(OH)₂D, meme epitelinde bulunan VDR reseptörüne bağlanarak birçok genin ekspresyonunu düzenler. Dolayısıyla pek çok çalışmada ve in vitro hayvan modellerinde D vitamininin meme karsinogenezi üzerine etkileri incelendiğinde D vitamininin koruyucu bir rolü olduğu görülmektedir (Zehnder ve ark, 2001).

2.7.3. Vitamin D ve Hücre Büyümesinin Durması ile İlişkisi

1,25(OH)₂D'nin MCF-7 hücre hattında sikline bağımlı kinaz inhibitörleri olan p21 ve p27 ekspresyonunu arttırarak hücre döngüsünün durmasını indüklediği ifade edilmiştir (Jensen ve ark, 2001; Simboli-Campbell ve ark, 1997). Ayrıca aktif D vitamini metaboliti, c-myc ve c-fos gibi onkogenlerin ekspresyonu ve çeşitli büyüme faktörlerini içeren epidermal büyüme faktörü, dönüştürücü büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörünün (IGF-1) etkilerini düzenler (Colston ve Hansen, 2002).

2.7.4. Vitamin D ve İnvazyon ve Metastazın İnhibisyonuna Etkisi

Vitamin D kemik sağlığı açısından çok önem teşkil eder. Vücudumuzda D vitamini eksikliği sonucunda parathormon (PTH) seviyesi yükselir ve buna bağlı olarak osteoblastik PTH reseptörü uyarılmış olur. Böylece kemik rezorpsiyonu için güçlü bir aktivatör olan κ B (NF- κ B) ligandının ekspresyonu artar. Bazı meme kanseri hücre hatlarında 1,25(OH)₂D, invazyon ve metastazı önleyen E-kaderin ekspresyonunu arttırmaktadır (Wang ve Dubois, 2004).

2.7.5. Vitamin D ve Anti-İnflamasyon Etkisi

Meme kanseri hücreleri ya da onları çevreleyen dokulardan salınan prostoglandinler, hücre çoğalmasını ve apoptoz direncini teşvik ederek tümör hücrelerinin invazyon ve anjiyogenezini uyararak tümör ilerlemesini teşvik eder. 1,25(OH)₂D'nin insan meme kanseri

hücre hatlarında prostoglandin sentezinde önemli bir rol oynayan siklooksijenaz 2 (COX-2) ekspresyonunu azaltarak düzene soktuğu bildirilmiştir (Krishnan ve ark, 2010).

2.7.6. Vitamin D ve Östrojen Yolağı İnhibisyonu

1,25(OH)D, androjeni östrojene çeviren aromataz enzimini kodlayan gen ekspresyonunu azaltarak östrojen yolunu baskılar. Aynı zamanda 1,25(OH)D östrojenin aktivitelere aracılık eden nükleer östrojen reseptörünü azaltır (Krishnan ve ark, 2010).

2.7.7. Vitamin D ve Epidemiyolojik Çalışmalar

Meme kanseri ve vitamin D arasındaki ilişkiye dair yapılan ilk epidemiyolojik çalışmalar güneş ışığına maruz kalma ile meme kanseri insidansı ve mortalite arasında güçlü, anlamlı, ters ilişkiler olduğu gösterilmiştir (Shao ve ark, 2012). Farklı ülkelerde, yaz veya sonbaharda teşhis alan ve tedaviye başlanılan meme kanseri hastalarında prognozun daha iyi olduğu gösteren çalışmalar mevcuttur. Özellikle Garland ve arkadaşları tarafından ABD eyaletlerinde yapılan bir çalışmada düşük güneş ışığına maruz kalma oranı ve yaşa göre düzeltilmiş meme kanseri oranları arasında, Güney Batı bölgesi ile kıyaslayacak olursak Kuzey Doğu bölgesinde daha yüksek oranlarda bulunmasından dolayı güçlü korelasyonlar olduğunu göstermektedir (Garland ve ark, 1990).

İlk Ulusal Sağlık ve Beslenme ve İnceleme Taraması (NHANES) dahilinde 5009 beyaz kadın, vitamin D'ye maruz kalmalarını ölçmek için 17 yıl boyunca yüz yüze görüşmeler ve dermatolojik muayeneler ile retrospektif kohort çalışmasına katıldılar. Güneş ışığına daha fazla maruz kaldığını belirten kadınlar, hiç veya az güneş ışığına maruz kalmış kadınlar ile kıyaslandığında %33 daha az meme kanseri riski taşıdıkları gözlemlenmiştir. Bu sonuca göre güneş ışığına maruz kalmanın meme kanseri üzerindeki etkisi kabul edilebilir düzeyde olduğu anlaşılmıştır. (Rohsahm ve ark, 2004).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Malzemeler

Çalışmada kullanılan MCF-7 hücre hatları ADÜ BİLTEM'den temin edilmiştir. Ticari olarak üretilmiş hücre hatları olduğu için herhangi bir etik kurul onayı gerekmemektedir.

Tablo 8. Çalışmada kullanılan hücre tipi ve hücrenin özellikleri

ATTC®kodu	HTB-22™
Adı	MCF7
Büyüme özelliği	Adherent (yapışan)
Organizma	<i>Homo sapiens</i> (insan)
Morfolojisi	Epitelyal
Kaynak	Organ: Meme Hücre tipi: Meme adenokarsinoma

Tablo 9. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarflar

Ürün	Ürün Kodu	Firma
Fetal Bovine Serum, 100 ml	10270098	THERMO
DMSO for cell culture reagent, 100 ml	sc-358801	SANTACRUZ
L-glutamine, 200mM, 100ml	GLN-B	CAPRICORN
Tripsin-EDTA(%0,25), 1X, 100 ml	THERMO	25200056
Tyran Blue Solution 100 ml for cell culture	1475	NEOFROXX
DMEM High Glucose, 500 ml	DMEM-HA	CAPRICORN
Dulbecco's Phosphate Bufer Saline (DPBS) 500 ml	D-8537	SIGMA-ALDRICH
Penisilin Streptomycin, 100ml	PS-1	CAPRICORN
MCF-7 Hücre Dizisi	-	ADÜ-BİLTEM
96-well plate for cell culture U taban, 50 adet AMB	SCP-11-096	SORFA
24-well plate for cell culture, 50 adet AMB	SCP-11-096	SORFA
Serologic pipet 5ml, tek kullanımlık 200 adet/AMB	P8050	SORFA
Serologic pipet 10 ml, tek kullanımlık 200 adet/AMB	P8100	SORFA
T75 Cell Culture Flask (75cm ²) 25 adet AMB	833911002	SARSTEDT
15 ml Centrifuge Tube kapaklı	Orange Scientific	4440300N
50 ml Centrifuge Tube kapaklı	Orange Scientific	4440100N
1,5 ml Eppendorf tüp kapaklı	SSIBIO	1210
Petri dish, PP, 100 mm çap	Orange Scientific	4450300N
Petri dish, PP, 60 mm çap	4450200N	Orange Scientific
Pipet Ucu 1-200 µL	4230N	SSIBIO
Pipet Ucu 100-1000 µL	4330N	SSIBIO
WST-1 Cell Proliferation Kiti	15092	INTRONBIO
Total Antioksidan Status Kiti	AT15053A	REL ASSAY DIAGNOSTİC
Total Oksidan Status Kiti	SR15061O	REL ASSAY DIAGNOSTİC
Muse®Annexin V and Dead Cell Assay Kit	MCH100105	MILLIPORE

Tablo 9. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarflar (devamı)

Ürün	Ürün Kodu	Firma
Muse® Caspase-3/7 Assay Kit 100 test	MCH100108	MILLIPORE
BCA Protein Assay Kit	21071	INTRONBIO
1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ 10µg	D1530-10UG	SIGMA-ALDRICH
Oleuropein 10mg	92167-10UG	SIGMA-ALDRICH
Superoksit Dismutase from Bovine Liver	S-1860-15KU	SIGMA-ALDRICH
Xanthine Oxidase from Bovine Milk	X1875-5U	SIGMA-ALDRICH
NBT (Nitroblue tetrazolium chloride)	N6639-50MG	SIGMA-ALDRICH
BSA (Bovine Serum Albumin)	ALB001	BIOSHOP
Glutathione Reductase from Baker's Yeast	G3664-500U	SIGMA-ALDRICH
Glutathione Free Acid (L-Glutathione reduced)	G4251-5G	SIGMA-ALDRICH
RIPA Lysis Buffer System	sc-24948	SANTACRUZ
Proteaz İnhibitörü	P2714-1TB	SIGMA-ALDRICH
Serolojik Pipet Tabancası	PA-100	CAPP
Croyogenic Vial	4420	AXYGEN
Dört yönlü Çalışma Rack (1,5 ml-5 ml-15 ml-50 ml) tüp sporu	HS29022A	VWR
Cell Scraper	3010	COSTAR
Xanthine SIX7375-10G	X7375	SIGMA

3.2. Kullanılan Cihazlar

İnkübatör, Nuaire (NU 5500, Plymouth, ABD)

Biyogüvenlik Kabini (2.seviye), Heraeus (HS12, Hanau, Almanya)

İnvert Mikroskop (Olympus CK40, Tokyo, Japonya)

UV-Visible Multiskan Spektrofotometre (Diagnostik Automation Inc, Los Angeles, ABD)

UV-Visible Multiskan Spektrofotometre, Thermo Multiskan (FC-SN: 35700535, Finlandiya)

Soğutmalı Santrifüj (15 ml falkon için) (Hettich D78532, Tuttlingen, Almanya)

Soğutmalı Santrifüj (eppendorf için) (Eppendorf 5415R, Hamburg, Almanya)

Mikroplate Shaker (ısıtmalı), (Eksper HT, İzmir, Türkiye)

Mikroplate Yıkayıcı (Eksper, İzmir, Türkiye)

EVE™ Otomatik Hücre Sayım Cihazı (NanoEnTek, Seul, Güney Kore)

-80 °C Dondurucu (Nüve NF, 190, Ankara, Türkiye)

-20 °C Dondurucu (Uğur, Türkiye)

pH Metre (Hanna Instrument HI 221, Woonsocket, USA)

Hassas Terazi, KERN (ABJ220-4NM, Almanya)

Muse™ Cell analyzer and analyses software (Merc Millipore, Almanya).

3.3. Kullanılan Çözeltiler

Bir litre için DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline) tamponu hazırlanması:

Stok: 10 L (9,55 g)

500 ml için 0,4775 g tartılıp üzerine distile su ile tamamlandı.

Hazırlanan DPBS' nin pH'ı, pH metre cihazı (WTW 340, Almanya) ile kontrol edilerek pH 7,0 olduğu tespit edildi. Daha sonra bu DPBS otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildi.

3.4. Deney Düzeneginin Oluşturulması

3.4.1. Hücrelerin Çözdürülmesi

Çalışmanın tüm aşamaları laminar-hava akışlı kabin içerisinde gerçekleştirildi. Önceden dondurulmuş olan MCF-7 adherent hücreleri çalışılmak üzere sıvı azottan çıkarıldı ve kültür ortamına uygun prosedürleri takip edildi. Bunun için öncelikle su banyosu 37° C'ye ısıtılıp, komplet hücre kültür ortamının ısısının su banyosunda 37° C'ye gelmesi sağlandı. Hücreler sıvı azot tankından, -196° C'den çıkarılır çıkarılmaz 37° C'lik su banyosunda hızla çözüldü. Bu işlem yapılırken hücrelerin bulunduğu tüpün tamamen suya batırılmamasına dikkat edilir. Hücreler çözüldükten sonra tüp kapağı %70'lik alkol ile silindi. 15 ml'lik santrifuj tüpüne aktarılıp üzerine 5 ml 37° C'de ısıtılmış taze besiyeri yavaşça eklendi ve ağzı sıkıca kapatıldı. 400 rpm'de 10 dakika santrifuj edildi (Russo ve ark, 1977). Süpernatant pipetle aspire edildi ve atıldı. Çöken hücre pelleti üzerine 5 ml yeni ortam besiyeri eklendi ve pipetaj ile hücreler iyice süspanse edildi. 25 cm²'lik flasklara

aktarıldı. Hücrelerin homojen dağılıp dağılmadığı invert mikroskop altında incelendi. Sonra %5'lik CO₂ inkübatörüne kaldırıldı. Ertesi gün invert mikroskop altında hücre canlılığı incelendi. Hücreler adherent yapıda oldukları için canlı hücreler flask tabanına tutunmuş haldedirler. Ölü hücre ve artıkların ortamdaki uzaklaştırılması için eski ortam mediumu aspire edildi ve uzaklaştırıldı. Sonrasında 6 ml yeni ortam besiyeri eklendi. Flask doluluk oranı %80-90 aralığına ulaştığı zaman 75 cm²'lik flaslara aktarılmak üzere pasajlama işlemi gerçekleştirildi.



Resim 1. İnkübasyon işlemi

3.4.2. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler düzenli olarak belirli aralıklarla invert mikroskopta (Olympus, Tokyo, Japonya) incelendi. Hücrelerin morfolojisine bakıldı ve ve sayısı tespit edildi. Hücrelerin durumu göz önünde bulundurularak ortalama 2 günlük aralıklarla pasaj yapıldı. %5 CO₂'li inkübatörden çıkarılan hücre kültür flaslara biyolojik güvenlik kabine alındı. Eski medium aspire edilerek atıldı. Hücrelerin flask dibinden kaldırılması için % 0,25' lik tripsin-EDTA solüsyonundan 1 ml eklendi ve 1 dk kadar 37°C'de inkübatörde bekletildi. Mikroskopta yuvarlak hale gelen hücrelerin tutunmayı bırakıp kaymaya başladığı gözlemlendiği anda taze besiyerinden 5 kat yani 1 ml tripsin için en az 5 ml medium eklenerek tripsinin etkisi inhibe edildi. Hücre kültür flaslardaki tripsinli ve kalkan hücreli medium pastör

pipeti ile pipetaj yapılarak konik tabanlı santrifüj tüplerine aktarıldı. 1100 rpm (200g)'de 5 dakika santrifüj edildi (Russo ve ark, 1977). Süpernatant atılıp pellet hücre yıkama çözeltisi (DPBS, Ca^{+2} ve Mg^{+2} negatif) ile yıkandı. Tekrar santrifüj edildi. Pellet oda sıcaklığına getirilen, 4 ml hücre mediumu ile süspansiyon edildi. Bu süspansiyondan 1'er ml; 1 l'er ml taze besiyeri içeren 75 cm²'lik hücre kültür flasklarına eklendi. İvert mikroskop ile hücreler kontrol edildi. Hücre kültür flaskları üzerine pasaj sayısı ve tarih yazılarak, 37°C'de %5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı.



Resim 2. MCF-7 hücre hattının çoğaltılması

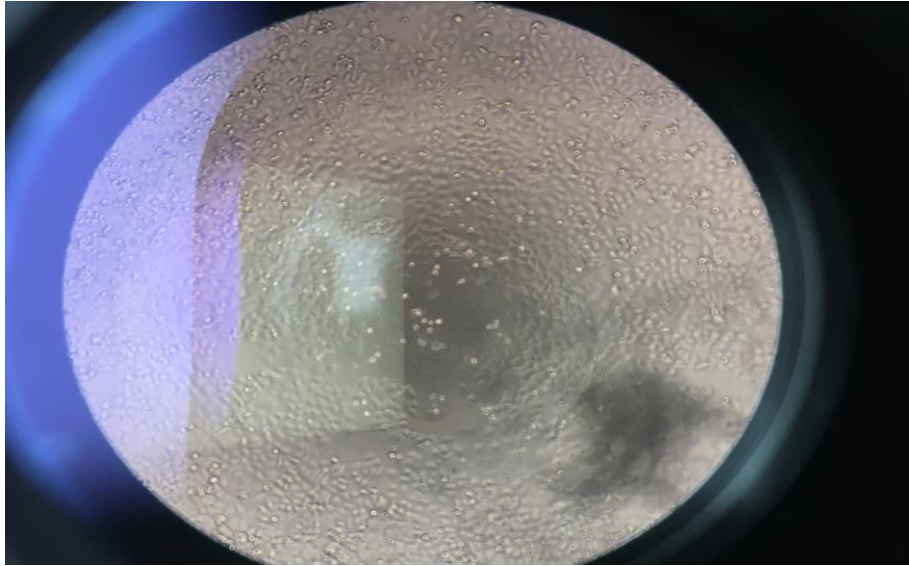
3.4.3. Hücrelerin Sayılması ve Canlılık Kontrolü

Her pasaj işleminde hücrelerin canlılığı tripan mavisi boyası (Neofroxx, Seul, G.Kore) ile kontrol edildi. Lam üzerine 10µl hücre süspansiyonu ve 10µl tripan mavisi koyularak karıştırıldı (Fogaça ve ark, 2017). Arthur™ Automated Cell Counter, NanoEnTek hücre sayım cihazı kullanılarak hücreler otomatik olarak sayıldı ve canlı hücrelerin (boya almayan hücrelerin) yüzde oranı hesaplandı. Hücre sayım cihazı 1 ml'de ne kadar hücre olduğunu ve hücre canlılık yüzdesini otomatik olarak hesapladığı için cihazdaki veriler 3 tekrarlı olarak ölçülerek ortalaması alındı (Automated ve Counter n.d). Thoma lamında sayılırken de şu yol izlendi. Thoma lamında 16 büyük kare ve bu büyük karelerin içerisinde 16 küçük kare bulunmaktadır. Tüm bu karelerdeki hücreler sayıldığında 0,1 mm³ deki hücre sayısı bulunmuş olur. Çünkü Thoma lamının esası, 0,1 mm³ hacimde sayım yapılmasına

dayanır. 1 ml'deki hücre sayısını bulmak ve standart sonuç için $0,1 \text{ mm}^3$ hacimdeki sayım sonucunun 10.000 ile çarpılması gerekmektedir. 1 ml'deki hücre sayısı= $16 \text{ büyük karedeki hücre sayısı} \times 2 \times 10000$ ' formülü ile hesaplandı. İki ile çarpılmasının sebebi % 2'lik formol- DPBS çözeltisi ile hücre kültürünün eşit miktarda karıştırılmasından dolayıdır.



Resim 3. Hücrelerin canlılık kontrolü



Resim 4. Hücrelerin invert mikroskopta görünümü (40X)



Resim 5. Hücrelerin sayılması (Arthur™ Automated Cell Counter, NanoEnTek)

3.4.4. Hücrelerin Dondurulması

Hücre Dondurma Besiyerinin Hazırlanması

%10'luk FBS içeren besiyerindeki hücreler için 10 ml stok hazırlamak için;

1 ml FBS

8 ml DMEM besiyeri

1 ml DMSO (dimetilsülfoksoksit) reaktifleri karıştırılarak hazırlandı.

Hücreler pasajlanırken, 2. ve 5. pasaj sayısı aralığında bazı hücrelerin pasajı devam ettirilirken, bir kısım hücre ileri çalışmalarda tekrar kullanılması amacıyla dondurup saklandı.

Hücre kültür flasklarındaki medium pastör pipeti ile pipetaj yapılarak konik tabanlı santrifüj tüplerine aktarıldı. 1100 rpm'de 5 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pellet hücre yıkama çözeltisi ile yıkandı. Tekrar santrifüj edildi. Pellet, dondurma çözeltisinde süspanse edilerek son hacim yaklaşık 5×10^6 - 2×10^7 hücre/ml olacak şekilde ayarlandı. Eş zamanlı olarak tripan mavisi ile canlılık kontrolü yapıldı. Bu karışımdan 1'er ml, -80°C 'ye dayanıklı krio tüplerine aktarıldı. Krio tüpleri üzerine tarih, pasaj sayısı ve canlılık oranı not edildi. Dakikada 1°C soğutan izopropil alkollü özel kontainer içinde -80°C soğutucuya konuldu. 1-2 gün içinde -196°C 'lik sıvı azot tanklarına ileride kullanılmak üzere kaldırıldı.

3.4.5. MCF-7 Hücreleri İçin Complete Medium Hazırlanması

İlk önce ticari olarak satın alınan 500 ml DMEM besiyerinin üzerine, %10 oranında inaktive edilmiş steril fetal bovine serumdan (FBS) (Biological Industries) 50 ml eklendi.

Sonra 50 ml'lik falkonlara bölündü.

50 ml'lik falkonlara 500 µl penisilin-streptomisin ve 50 µl siprofloksasin eklendi.

Kullanılincaya kadar +4°C'de saklandı.

3.4.6. MCF-7 Hücrelerinin Kullanımı

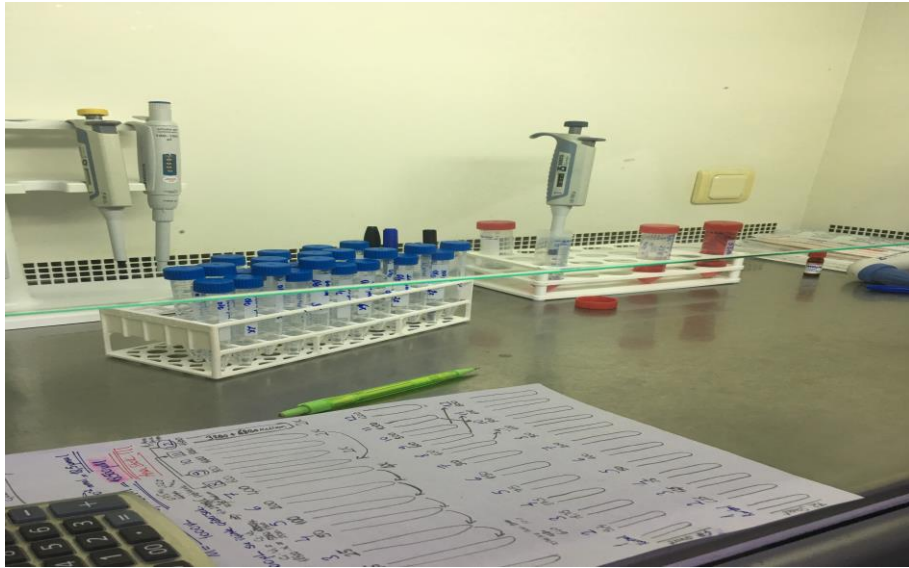
MCF-7 hücreleri, in vitro meme kanser çalışmalarında oldukça fazla tercih edilen bir hücre hattıdır. MCF-7 hücreleri, hücre sitoplazmasında östrojeni östradiyol olarak işlemektedir. Bu özelliği, MCF-7 hücrelerini östrojen pozitif reseptör yapmaktadır. Buna ilaveten, MCF-7 hücrelerinin in vitro üretiminde hücreler, epitel hücrelere benzeyen tek tabaka halinde ürerler (Resim 4).

3.4.7. Oleuropein Dozunun Belirlenmesi

Ticari olarak gelen oleuropein (Sigma-92167-10UG), steril serum fizyolojik (SF) içinde çözülerek 18.500 µM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Literatür bilgisine dayanarak oleuropein için uygulanacak uygun doz belirlenmeye çalışıldı. Ayrıca oleuropein uygulaması için uygun dozun belirlenmesi amacıyla 96 kuyucuklu plağa eşit sayıda hücreler konuldu. Ardından hücre 24 saatlik ölçüm için kontrol, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1600 µM konsantrasyonlarda oleuropein, hücre medyumlarına katıldı ve hücreler inkübe edildi. 48 saatlik ölçüm için kontrol, 9,4, 18,75, 37,5, 75, 150, 300, 400, 600, 800, 1000, 1200 µM konsantrasyonlarda oleuropein , hücre medyumlarına katıldı. 72 saatlik ölçüm için 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 µM konsantrasyonlarda oleuropein, hücre medyumlarına katıldı. 24 saatlik inkübasyon sürelerinin ardından tetrazolium tuzu (WST-1) analiz yöntemi ile hücre viabilitesi (sitotoksisite durumu) değerlendirildi. Oleuropeinden hazırlanan ana stok, +4 °C'de saklanmıştır. Deneyde kullanılan oleuropein konsantrasyonları da her deney tekrarında taze hazırlanarak kullanılmıştır.

3.4.8. Vitamin D Dozunun Belirlenmesi

Ticari olarak gelen vitamin D (Sigma-D1530-10UG), öncelikle dimetilsülfoksit (DMSO; Sigma) içinde çözülerek 1000 μM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Literatür bilgisine dayanarak vitamin D için uygulanacak uygun doz belirlenmeye çalışıldı. Ayrıca vitamin D uygulaması için uygun dozun belirlenmesi amacıyla 96 kuyucuklu plâğa eşit sayıda hücreler konuldu. Daha sonra bu stok, kültür medyumunu ile çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak 24 saatlik ölçüm için 1,95, 3,906, 7,8125, 15,62, 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 nM, 48 ve 72 saatlik ölçüm için ise 0,975, 1,95, 3,906, 7,8125, 15,62, 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 nM vitamin D konsantrasyonları hazırlandı. Hücre medyumlarına katıldı ve hücreler inkübe edildi. Bu uygulanan dozlarda anlamlı bir sonuç çıkmayınca 24, 48 ve 72 saatlik ölçüm için 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 μM vitamin D konsantrasyonları hazırlandı. Hücre medyumlarına katıldı ve hücreler inkübe edildi. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin ardından tetrazolium tuzu (WST-1) analiz yöntemi ile hücre viabilitesi (sitotoksosite durumu) değerlendirildi. En yüksek vitamin D konsantrasyonunda, DMSO oranı % 0.1 olduğu için, kontrol grubuna da besiyeri içinde % 0.1 oranında DMSO uygulanmıştır. D vitamininden hazırlanan ana stok, -20°C 'de saklanmıştır. Deneyde kullanılan vitamin D konsantrasyonları da her deney tekrarında taze hazırlanarak kullanılmıştır.



Resim 6. Oleuropein ve vitamin D için doz hesaplamaları

3.4.9. Hücre Proliferasyon Analizi

Hücrelerde proliferasyonu belirlemek için kullanılan sitotoksosite testleri, kimyasalların hücre ve dokulardaki mekanizmaları anlayabilmek açısından çok önem teşkil eder. 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum (WST-1), 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid (XTT), 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT), 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS) gibi sitotoksosite testleri vardır (Borenfreund ve Puerner, 1985; Feoktistov ve ark, 2016). Sitotoksosite, kanser oluşumu ve iltihaplanma gibi patolojik süreçlerde çok önemli rol oynar (Bombrick ve ark, 1998). Ayrıca sitotoksitenin in vitro testler ile ölçülmesi, hayvan kullanımını da en aza indirmektedir. Bu açıdan baktığımızda da avantaj sağlar (Bridges ve ark, 1983).

3.4.9.1. WST-1 Testi (Water Soluble Tetrazolium Test)

WST-1 testi, sitotoksik etki ve metabolik aktivitenin belirlenmesi için yapılan, canlı hücrelerden tetrazolium tuzlarının ayrıştırılmasına dayanan non-radyoaktif, spektrofotometrik, kolorimetrik bir testtir. WST-1 bir tetrazolyum tuzu olup, canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlanır ve suda çözünmeyen formazan tuzları oluşturur. WST-1 yönteminde spektrofotometrik olarak ölçülen absorbans değeri, kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini gösterir. Bu değeri, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilidir. Proliferasyon arttıkça, formazan tuzu oluşumuna bağlı olarak absorbans değeri de artış gösterir (Carmichael ve ark, 1987; Lian ve ark, 2003). Yapılacak olan bu test ile oleuropeinin, vitamin D'nin sitotoksik etkisinin olup olmadığı belirlenmeye çalışıldı. Kontrol grubu ile kıyaslandığında %50 oranında sitotoksik etki gösteren konsantrasyon, sitotoksik doz olarak kabul edildi. Oleuropein ve vitamin D'nin MCF-7 hücre hattı üzerindeki olası sitotoksik etkisi WST-1 kiti ile üretici firmanın (İntron, 15092) kullanım talimatına göre uygulandı.

Kit İçeriği;

WST-1 ayracı (5 ml)

Electro Connecting Solution (ECS) 500 µl

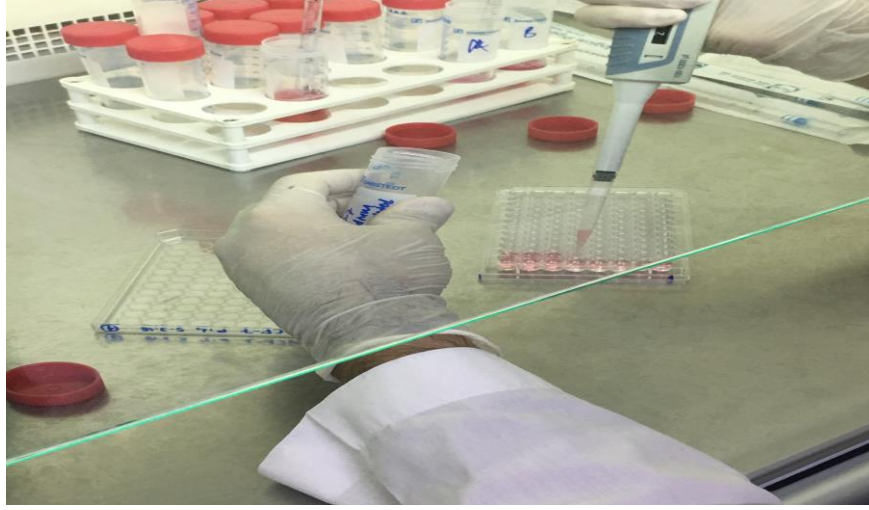
WST-1 ayracı dondurularak karanlıkta saklandı.

Çalışılacak test sayısına göre 10:1 oranında WST-1 ayracı ve electro connecting solution (ECS) hazırlandı.

Yapılış Yöntemi;

WST-1 yönteminin uygulanmasından 48 saat önce, MCF-7 hücreleri yeterince çoğalınca hücre sayımı yapılarak, hücreler 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde besiyeri ortamında (5000 hücre ile 200 µl medyum hazırlandı) ve kuyulara ekimi yapıldı. Mikroplak 48 saat 37 °C'de %5 CO₂ ayarlı inkübatörde bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlandı. Bu yolla tripsin enziminin hücre membran proteinleri ve büyüme faktör reseptörleri üzerinde oluşturduğu zarar ortadan kaldırılmış oldu. Bu proteinlerin ve büyüme faktörlerinin yeniden sentezlenebilmesi için en az 24 saatlik bir süre gerekmektedir (Huang ve ark, 2010). Ayrıca bu yolla medyum içerisindeki terapötik ajanların hücreyle muamelesinden önce hücrelerin metabolik aktivite kazanmaları da sağlanır.

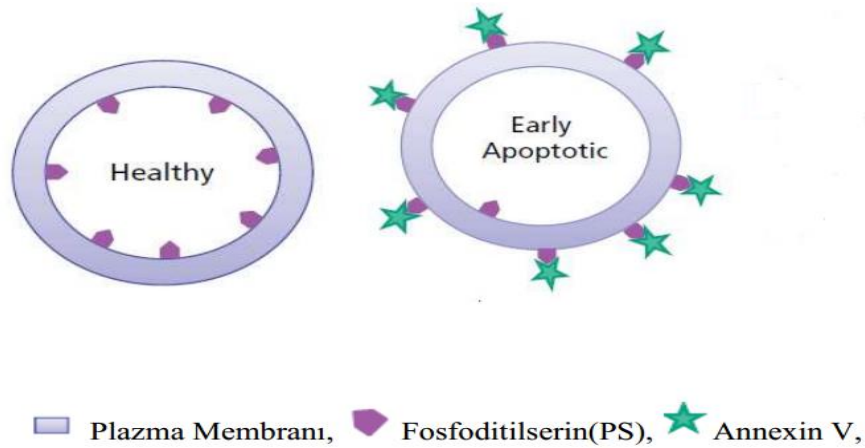
48 saatlik inkübasyondan sonra serum fizyolojik (SF) ile çözülerek hazırlanmış olan oleuropein ve DMSO ile çözülerek hazırlanmış olan vitamin D stok solüsyonundan hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak uygun oleuropein konsantrasyonları ve vitamin D konsantrasyonları hazırlanmıştır. Daha sonra plakların içindeki eski besiyeri atıldı ve kuyucuklara 100'er µl taze olarak kültür besiyerinde hazırlanan oleuropein ve vitamin D dozları uygulandı. Ardından plaklar 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlara bırakıldı. İnkübasyon süreleri sonunda her bir 96'lık kuyucuktaki hücreler üzerine, WST-1 kit (intron) talimatlarına göre 10 µL WST-1 reaktifi ilave edildi. WST-1 reaktifi, 1 ml WST-1 ayracına 100 µl Electro Connecting Solution (ECTS) eklenerek hazırlandı. Daha sonra hücreler 2 saat inkübatörde inkübe edilip, 450 nm dalga boyunda, referans dalga boyu 620 nm alınarak ELİZA (Enzyme-linked immunosorbent assay) cihazında okutuldu. Deneyle bir birinden bağımsız 3 tekrar olarak çalışıldı. Renk oluşumu esasına göre alınan absorbans değerleri, hücre canlılığı ile direkt olarak ilişkilendirilmiştir.



Resim 7. Hücrelerin 96'lı plaklara ekimi

3.4.10. Apoptotik Analizler

Çok hücreli organizmalarda hücre bölünmesi sonucu artan hücre sayısı, hücre ölümleriyle dengelenmektedir. Eğer bir organizmada bir hücreye artık gereksinim duyulmuyorsa, hemen hücre içi haberci sistemleri aktive edilerek o hücrenin intihar süreci başlatılır. Apoptoz için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim gözlenir. Apoptozun hücrelerde görünür hale gelmesi için çeşitli morfolojik ve biyokimyasal yöntemler geliştirilmiştir (Güleş ve Eren, 2008). MCF-7 hücre apoptozu Anneksin V- FITC (fluorescein isothiocyanate) ve kaspaz-3/7 kiti kullanılarak muse cihazında analiz edildi.



Şekil 20. Apoptoz değerlendirilmesi, sağlıklı ve işaretli apoptotik hücreler (Güleş ve Eren, 2008).

3.4.10.1. Anneksin V testi

Apoptozun erken dönemlerinde hücre yüzeyinde bazı değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Plazma membranının iç kısmından dış kısmına doğru fosfolipidlerin translokasyonu gerçekleşir. Bu yer değiştirme, hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin V, Ca^{+2} bağımlı fosfolipid bağlayıcı protein olup, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfolipidlerine yüksek afinite ile bağlanan bir protein olduğu için, floresan bir madde (örnek: FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir (Güleş ve Eren, 2008).

Anneksin V testinin uygulanmasından 48 saat önce, MCF-7 hücreleri yeterince çoğalınca hücre sayımı yapılarak, hücreler 6 kuyucuklu plaklara her bir kuyucukta 50000 hücre olacak şekilde besiyeri ortamında (50000 hücre ile 2 ml medyum hazırlandı) kuyulara ekimi yapıldı. Mikroplak 48 saat $37^{\circ}C$ 'de %5 CO_2 ayarlı inkübatörde bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlandı. 48 saatin sonunda plakların içindeki eski besiyeri atıldı ve serum fizyolojik (SF) ile çözülerek hazırlanmış olan oleuropein ve DMSO ile çözülerek hazırlanmış olan vitamin D stok solüsyonundan hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak WST-1 testi ile oleuropein için 48. saatte bulunan bulunan IC_{50} değeri ($247,5 \mu M$), vitamin D için bulunan IC_{50} değeri ($2,053 \mu M$) ve oleuropein ve vitamin D kombinasyonlarının IC_{50} ($495 \mu M + 4,106 \mu M$) değerleri 6'lı plaklara 2'er ml ekildi. Ardından plaklar 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süreleri sonunda her bir 6'lı kuyucuktaki hücre+besiyeri falkonlara aktarıldı. Boşalan 6'lı plakların üzerine hücreler kalksın diye 1'er ml tripsin eklendi ve 3-4 dakika etüvde bekletildi. Sonra plakların üzerine 2'er ml taze besiyeri eklendi. Taze besiyerinin içindeki FBS tripsini inaktive eder. Sonra plakların üzerindeki 2'er ml taze besiyeri+hücreyi de aynı falkonlara eklendi. Falkonlar 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üzerindeki süpernatant atıldı. 1'er ml DPBS ile yıkandı. Aynı işlem hücre yoğunluğunun biraz daha azalması için 3 kez tekrarlandı. Üçüncü işlemde hücreler %1 FBS içeren DPBS ile yıkandı. En son hücre+besiyeri kontrol, oleuropein, vitamin D ve oleuropein-vitamin D kombinasyonu olmak üzere 4 adet eppendorfa eklendi. Anneksin V (MCH100105) kiti prosedürüyle muse cihazında okutuldu. Sonuçlar yüzde oran (%) olarak değerlendirildi.

Kit İçeriği;

Muse™ Anneksin V Ölü Hücre Reaktifi (Part No. 4700-1485, 100 tests/bottle)

Yapılış Yöntemi;

Okunacak olan her eppendorfa öncelikle 100 µl Anneksin V ölü hücre reaktifinden eklendi.

Ardından her üzerine sırasıyla kontrol, oleuropein, vitamin D ve oleuropein-vitamin D kombinasyonundan 100'er µl hücre eklendi.

20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Muse® cell analyzer cihazında okutuldu.

3.4.10.2. Kaspaz-3/7 testi

Hücrenin apoptotik uyarıyı almasıyla çeşitli biyokimyasal süreçlerle aktive olan başlatıcı kaspazlar, efektör kaspazları aktifleştirirler. Aktive olmuş efektör kaspazlar ise kendisi ile ilişkili proteinleri parçalarlar. Bunun sonucunda da karakteristik apoptotik hücre morfolojisi şekillenmeye başlar.

Kaspaz 3/7 testinin uygulanmasından 48 saat önce, MCF-7 hücreleri yeterince çoğalınca hücre sayımı yapılarak, hücreler 6 kuyucuklu plaklara her bir kuyucukta 50000 hücre olacak şekilde besiyeri ortamında (50000 hücre ile 2 ml medyum hazırlandı) kuyulara ekimi yapıldı. Mikroplak 48 saat 37°C'de %5 CO₂ ayarlı inkübatörde bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlandı. 48 saatin sonunda plakların içindeki eski besiyeri atıldı ve serum fizyolojik (SF) ile çözülerek hazırlanmış olan oleuropein ve DMSO ile çözülerek hazırlanmış olan vitamin D stok solüsyonundan hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak WST-1 testi ile oleuropein 48. saatte bulunan bulunan IC50 değeri (247,5 µM), vitamin D için bulunan IC50 değeri (2,053 µM) ve oleuropein ve vitamin D kombinasyonlarının IC50 (495 µM+4,106 µM) değerleri 6'lı plaklara 2'er ml ekildi. Ardından plaklar 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süreleri sonunda her bir 6'lı kuyucuktaki hücre+besiyeri falkonlara aktarıldı. Boşalan 6'lı plakların üzerine hücreler kalksın diye 1'er ml tripsin eklendi ve 3-4 dakika etüvde bekletildi. Sonra plakların üzerine 2'er ml taze besiyeri eklendi. Taze besiyerinin içindeki FBS tripsini inaktive eder. Sonra plakların üzerindeki 2'er ml taze besiyeri+hücreyi de aynı falkonlara eklendi. Falkonlar 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üzerindeki süpernatant atıldı. 1'er ml DPBS ile yıkandı. Aynı işlem hücre yoğunluğunun biraz daha azalması için 3 kez

tekrarlandı. Üçüncü işlemde hücreler %1 FBS içeren DPBS ile yıkandı. En son hücre+besiyeri kontrol, oleuropein, vitamin D ve oleuropein-vitamin D kombinasyonu olmak üzere 4 adet eppendorfa eklendi. Kaspaz 3/7 (MCH100108) kiti prosedürüyle muse cihazında okutuldu. Sonuçlar yüzde oran (%) olarak değerlendirildi.

Kit İçeriği;

Muse® Caspase 3/7 Reaktifi (Part No. 4700-1505, 100 tests/vial)

Muse® Caspase 7-AAD (Part No. 4700-1510, 100 tests/vial)

1X Assay Buffer BA (Part No. 4700-1360, 100 tests/vial)

1X PBS (Part No. 4700-1515, 100 tests/vial)

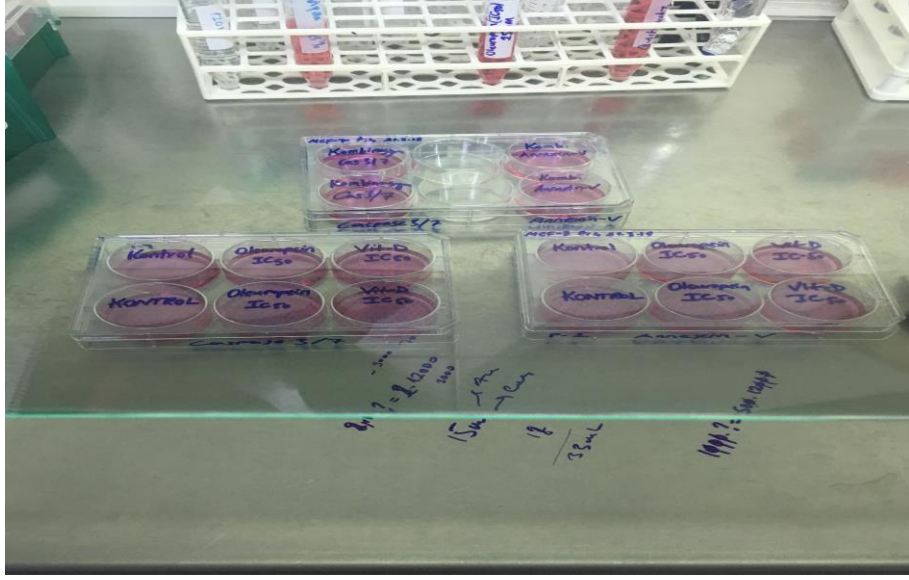
Yapılış Yöntemi;

Muse® caspase 3/7 working solution elde etmek için caspase 3/7 reaktifi 1X PBS ile 1:8 oranında dilüe edildi.

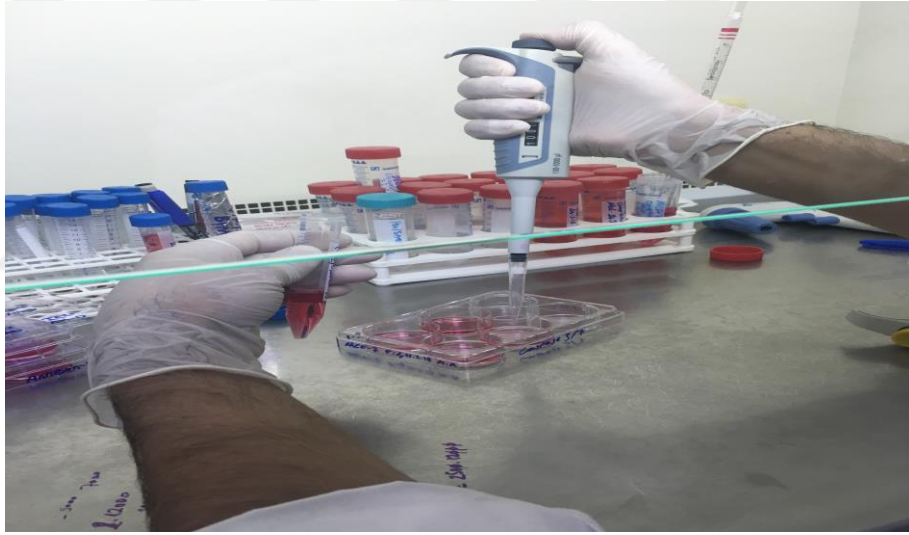
Sonra Muse® Caspase 7-AAD working solution elde etmek için 2 µl 7-AAD reaktifine 148 µl 1X Assay Buffer BA eklendi.

Okunacak olan her eppendorfa öncelikle 5 µl Muse® caspase 3/7 working solution ve sırasıyla kontrol, oleuropein, vitamin D ve oleuropein-vitamin D kombinasyonundan 50'er µl hücre eklendi.

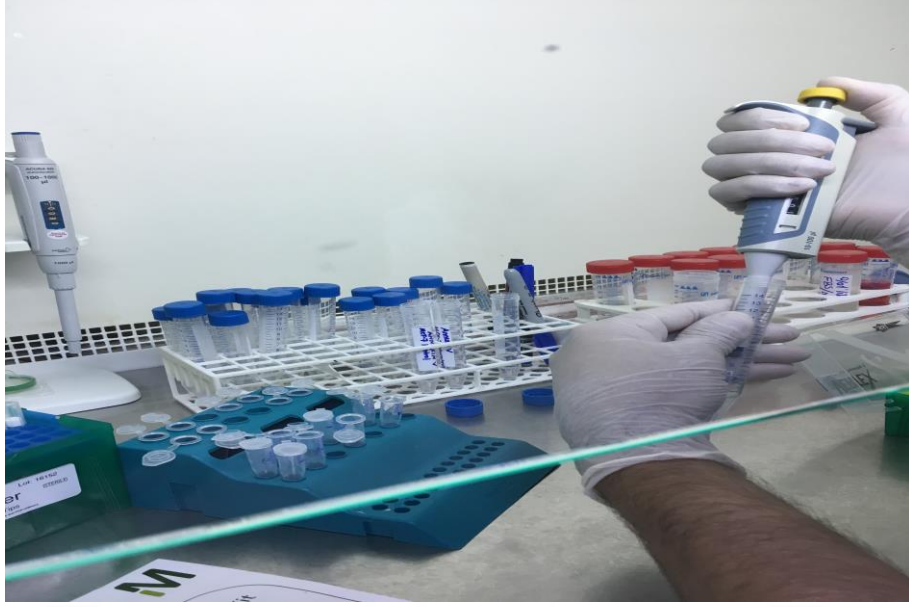
37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 150 µl 7-AAD working solution eklendi. Muse® cell analyzer cihazında okutuldu.



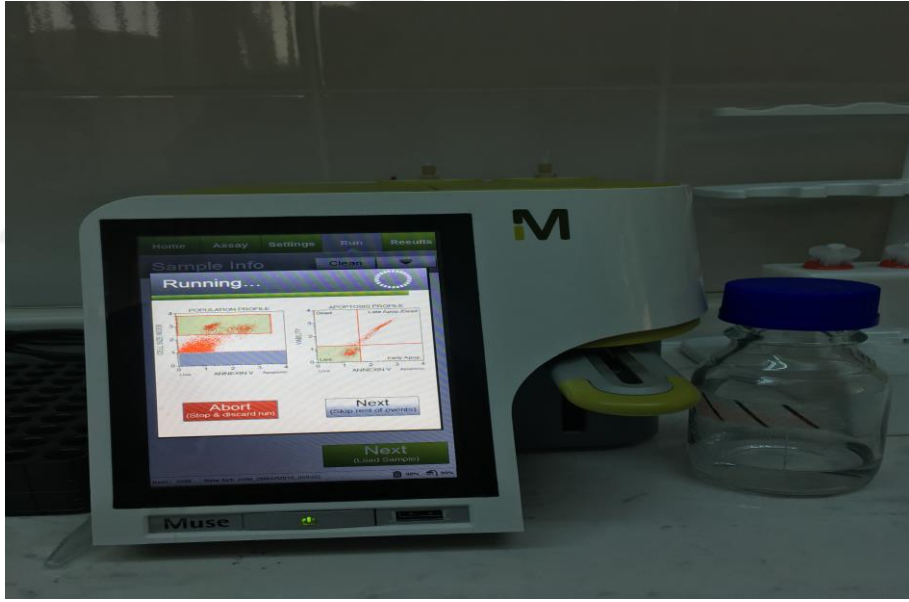
Resim 8. Hücrelerin 6'lı plaklara ekimi



Resim 9. Hücelere IC50 dozlarının verilmesi



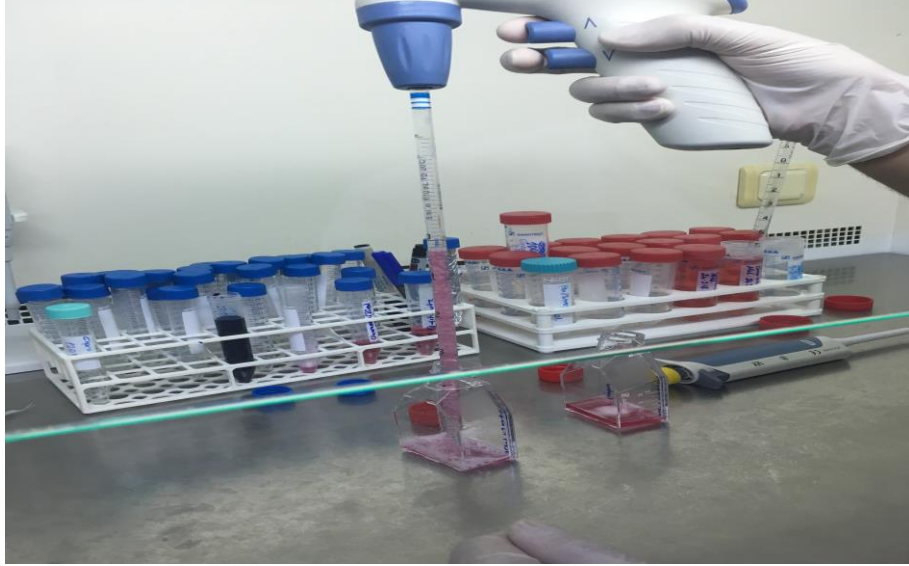
Resim 10. Hücrelerin eppendorflara aktarılması



Resim 11. Hücrelerin Muse[®] cell analyzer cihazında okutulması

3.4.11. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal parametrelerin uygulanmasından 48 saat önce, MCF-7 hücreleri yeterince çoğalınca hücre sayımı yapılarak, hücreler 25'lik flasklara her bir flaskta 3000000 hücre olacak şekilde besiyeri ortamında (3000000 hücre ile 5 ml medyum hazırlandı) 25'lik flasklara hücre ekimi yapıldı.



Resim 12. 25'lik flaslara hücre ekimi

Daha sonra 25'lik flaslklar 48 saat 37⁰C'de %5 CO₂ ayarlı inkübatörde bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlandı. 48 saatin sonunda plakların içindeki eski besiyeri atıldı ve serum fizyolojik (SF) ile çözülerek hazırlanmış olan oleuropein ve DMSO ile çözülerek hazırlanmış olan vitamin D stok solüsyonundan hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak WST-1 testi ile oleuropein 48. saatte bulunan bulunan IC50 değeri (247,5 µM), vitamin D için bulunan IC50 değeri (2,053 µM) ve oleuropein ve vitamin D kombinasyonlarının IC50 (495 µM+4,106 µM) değerleri olmak üzere 4 adet 25'lik flaslklara 5'er ml ekildi.

3.4.12. BCA Protein, SOD, GPx, MDA ve NO Analizleri için Hücrelerden Lizat Eldesi

Her 25'lik flask içindeki kullanılmış ortam (medium ve ilaçlı medium) aspire edildi ve atık kabına atıldı. Önceden hazırlanmış olan -20 ⁰C'de hafif buzlu DPBS'den her bir flaska 5 ml hacimde ilave edildi. Daha sonra cell scraper (steril hücre kazıyıcısı) ile flask içinde başlangıç noktası belirlenerek sağa sola sadece el bileği hareket ettirilerek tabandaki yapışmış olan hücreler kazınarak kaldırıldı. Kazınarak kaldırılmış hücreler 15 ml'lik falkon tüplere aktarıldı. Falkonlara aktarma işlemi bitinceye kadar falkon tüpler soğuk zemin buz üzerinde tutuldu. Aktarma işlemi bitince hiç beklemeden soğutmalı santrifüjde (+4 ⁰C) 1600 rpm 6 dakika boyunca santrifüj edilerek çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında 1 ml DPBS ile hücreler iyice homojen olsun diye iyice pipetaj yapılarak yıkandı ve tekrar 1600

rpm 6 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Son yıkamadan sonra 400 µl RIPA lysis buffer eklendi. Sonrasında köpürmeyi engelleyecek şekilde hafifçe pipetaj yapıldı. Bu işlem sonrasında 1600 rpm 6 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında oluşan süpernatantlar 2 ml'lik eppendorflara alındı ve lizatlar çalışılncaya kadar -20 °C'de saklandı.



Resim 13. Hücrelerin cell scraper ile kaldırılması

RIPA Lysis Buffer hazırlama;

İçerik;

VIAL 1: 1 x Lysis Buffer: % 1 Nonidet P-40, % 0,5 sodium deoxycholate,

% 0,1 SDS, % 0,004 sodium azide

VIAL 2: PMSF DMSO içinde çözüldü.

VIAL 3: Protease inhibitor cocktail DMSO içinde çözüldü.

VIAL 4: Sodium orthovanadate distile su içinde çözüldü.

Kullanımı;

RIPA lysis buffer karışımının her 1 ml'si için 10 µl PMSF solution, 10 µl sodium orthovanadate ve 10-20 µl protease inhibitor cocktail solution olacak şekilde hazırlandı.

3.4.12.1. Total protein tayini

Lizatlardaki SOD, GPx, MDA ve NO sonuçları protein değerine göre hesaplanacağından, lizatlardaki protein düzeyi ölçülmüştür.

Total proteinin kolorimetrik tespiti ve nicelendirilmesi için bicinchoninic asit (BCA) yöntemi kullanılmıştır (Smith ve ark, 1985). Bu yöntem Smart BCA protein assay kiti (Intron, Giyeonggi, G.Kore) ile yapılmıştır. Bu tahlilin mor renkli reaksiyon ürünü, bir bakır iyonu ile iki BCA molekülünün şelatlanmasıyla oluşturulmuştur. Bu suda çözünür kompleks 562 nm'de geniş bir çalışma aralığında artan protein konsantrasyonları ile doğrusal olan güçlü bir absorbans sergilemektedir. (20-2,000 ug / ml)

Protein makromoleküler yapısı, peptit bağlarının sayısı ve belirli dört aminoasidin varlığı (sistein, sistin, triptofan ve tirozin) BCA ile renk oluşumundan sorumlu olduğu rapor edilmiştir. Buna göre, protein konsantrasyonları genellikle sığır serum albümini (BSA) gibi ortak bir proteinin standartlarına referansla belirlenir ve raporlanır. Bilinen konsantrasyondaki bir dizi dilüsyon proteinden hazırlanır ve bilinmeyen örnek konsantrasyonlarının standart eğriye göre belirlenmesi prensibinden yararlanır. Buna göre sığır serum albumini (BSA) gibi ortak bir proteinin standartları kullanılarak protein konsantrasyonu belirlenmektedir. BSA proteininden bilinen konsantrasyondaki bir dizi dilüsyon yapılır ve bilinmeyen örnek konsantrasyonları, standart grafiğine göre hesaplanır.

Kit İçeriği;

Solution A

Solution B

BSA Solution (2 mg/mL)

Yapılış Yöntemi;

BSA stok solüsyonundan yola çıkılarak, distile su kullanılarak seri dilüsyonlar ile 25- 2000 µg/ml arasında çeşitli standartlar hazırlandı ve eppendorflara eklendi.

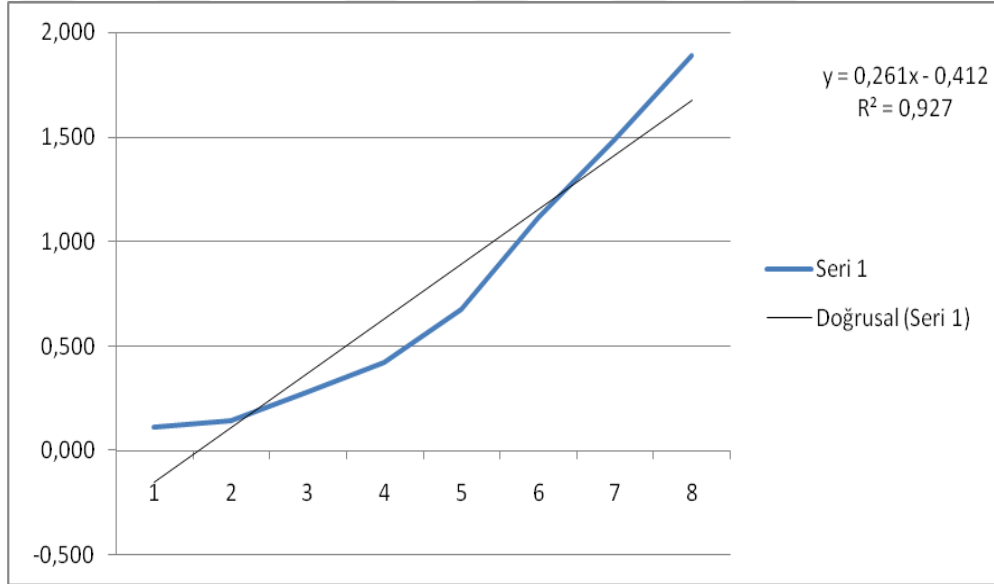
Steril 96 well-plate'in kör kuyucuğuna (A1) 25 µl distile su, A2-A8 arası standartların kuyucuklarına ise seyreltikten derişige sırasıyla standartlardan 25 µl, diğer

kalan kuyucuklara (B1-C8) ise sırasıyla -20 °C'den çıkarılan lizatlardan (Bölüm 3.4.12.'deki ön işlem uygulanarak lizis edilmiş örnekler) 25 µl konuldu.

Üzerine A solüsyonu ve B solüsyonunun (50:1) oranda karışımından hazırlanan çalışma solüsyonundan 200 µl eklendi ve 30 dk oda sıcaklığında bekletildi.

Standartlar ve örneklerde mor renk oluşumu gözlenmeye başladıktan sonra 562 nm'de okuma yapıldı.

Lizatlardaki protein miktarı, SMART BCA protein assay kit kullanılarak çizilen BSA standart grafiğinden (Şekil 21) elde edilen denkleme göre hesaplandı. Sonuçlar µg/ml olarak verildi. Bu denklem kullanılarak örneklerin bilinmeyen konsantrasyonları, yani total protein değerleri hesaplandı.



Şekil 21. BCA kalibrasyon grafiği

3.4.12.2. Biyokimyasal TOS ve TAS analizleri

TOS yöntemi;

AT15053A REL ASSAY DİAGNOSTİK (Gaziantep, Türkiye) ticari kitinin kullanım talimatına göre uygulandı.

Standart solüsyonundan 19'ar µl steril 96 well-platelere (A1-A2) eklendi.

Örneklerden 19'er µl (Bölüm 3.4.12.'deki ön işlem uygulanarak lizis edilmiş örnekler) steril 96 well-platelere (B1-B4) eklendi.

En son Reagent 1 solüsyonundan 125'er µl standart ve örneklerin üzerine eklendi ve iyice karıştırıldı.

30 saniye sonra 530 nm'de A1 ilk okuma yapıldı.

Okuma işlemi bittikten sonra standart ve örneklerin üzerine 6'ar µl Reagent 2 eklendi.

37 °C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı.

530 nm'de A2 ikinci okuma yapıldı.

Hesaplama: $A2 - A1 = \Delta Abs$ Standart ya da örnek

Sonuç: ΔAbs örnek / ΔAbs Standart x Standart Konsantrasyonu

Units= µmol/L

Standart Konsantrasyonu= 10 µmol/L

TAS yöntemi;

SR1150610 ASSAY DİAGNOSTİK (Gaziantep, Türkiye) ticari kitinin kullanım talimatına göre uygulandı.

Standart solüsyonundan 15'er µl steril 96 well-platelere (A1-A2) eklendi.

Örneklerden 15'er µl (Bölüm 3.4.12.'deki ön işlem uygulanarak lizis edilmiş örnekler) steril 96 well-platelere (B1-B4) eklendi.

En son Reagent 1 solüsyonundan 250'er µl standart ve örneklerin üzerine eklendi ve iyice karıştırıldı.

30 saniye sonra 660 nm'de A1 ilk okuma yapıldı.

37,5 ml Reagent 2 solüsyonundan eklendi.

37 °C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı.

660 nm'de A2 ikinci okuma yapıldı.

Hesaplama: $A_2 - A_1 = \Delta \text{Abs}$ Standart ya da örnek

Sonuç: $\Delta \text{Abs H}_2\text{O} - \Delta \text{Abs Örnek} / \Delta \text{Abs H}_2\text{O} - \Delta \text{Abs Standart}$

Units= mmol/L

3.4.12.3. SOD aktivite tayini

Proten oksidasyon ürünlerinden olan hücredeki SOD (süperoksit dismutaz) aktivitesi, Sun ve ark (1988) tanımladığı ksantin oksidaz ile $\text{O}_2^{\cdot -}$ oluşturması ve bunun da nitroblue tetrazolium chloride (NBT) ile renkli bir bileşik oluşturarak bu renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanarak yapılmıştır. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar fazla ise oksijen radikalini ($\text{O}_2^{\cdot -}$) ortadan kaldıracacağı için oluşan rengin şiddeti o kadar az olacaktır.

Kullanılan Reaktifler;

Standart SOD Solüsyonu: 1 mg süperoksit dismutase from bovine liver tartılıp 1 ml izotonik ile çözüldü. 2519 u/ml ana stok oluşturuldu. Ana stoktan yola çıkılarak kalibrasyon grafiği oluşturmak için dilüsyonlar yapıldı.

	Dilüsyon Oranları	Ana Stok	İzotonik
2,5 U	1/1000	10 µl	9990 µl
5,038 U	1/500	10 µl	4990 µl
10,076 U	1/250	10 µl	2490 µl
25,19 U	1/100	10 µl	990 µl
50,38 U	1/50	10 µl	490 µl
100,76 U	1/25	10 µl	240 µl
251,9 U	1/10	10 µl	90 µl

SOD Deney Reaktifleri:

0,3 mmol/L ksantin: 9,13 mg ksantin ($m_A=152,1$ g/mol), distile su ile çözümlü 200 ml distile suya tamamlandı.

0,6 mmol/L EDTA: 22,33 mg EDTA ($m_A=372,2$ g/mol), distile su ile çözülüp 100 ml distile suya tamamlandı.

150 μ mol/L NBT: 12,25 mg NBT ($m_A=817,6$ g/mol), distile su ile çözülüp 100 ml distile suya tamamlandı.

400 mmol/L Na_2CO_3 : 2,54 g Na_2CO_3 ($m_A=105,93$ g/mol), distile su ile çözülüp 60 ml distile suya tamamlandı.

1g/L bovin serum albumin: 300 mg BSA, distile su ile çözülüp 30 ml distile suya tamamlandı.

2 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Amonyum Sülfat): 1,32 g amonyum sülfat ($m_A=132,1$ g/mol), distile su ile çözülüp 5 ml distile suya tamamlandı.

Ksantin Oksidaz Solüsyonu:

0,857 u/mL ksantin oksidaz: 171,4 μ l ksantin oksidaz (0,4 u/mg protein) 828,6 μ l amonyum sülfata tamamlandı.

CuCl_2 Solüsyonu:

0,8 mmol/L CuCl_2 : 13,64 mg CuCl_2 ($m_A=170,48$ g/mol), 100 ml distile suya tamamlandı.

Yapılış Yöntemi;

Çalışmaya başlamadan önce 0,3 ml kloroform, 0,5 ml etanol ve 0,1 ml lizat (Bölüm 3.4.12.deki ön işlem uygulanarak lizis edilmiş örnekler) karıştırılıp 1 dakika boyunca vortekslendi. 18000 g'de 60 dakika boyunca santrifüj edildi.

Her deney tüpüne SOD deney reaktiflerinden 2,45 ml ve lizatlardan 0,5 ml eklendi.

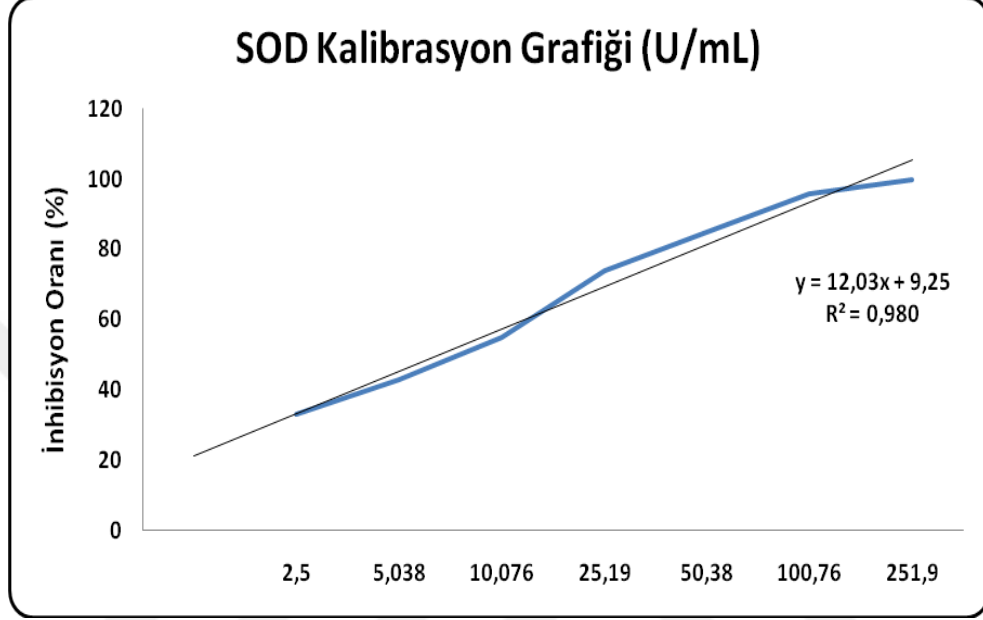
Ardından her deney tüpüne 50'er μ l ksantin oksidaz solüsyonu eklenip alt üst edildi ve sıcak su banyosunda 25 $^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı.

Sonra reaksiyonu durdurmak için 0,8 mmol/L CuCl_2 solüsyonundan 1'er ml eklendi.

Distile suya karşı 560 nm'de okutuldu.

$$\text{İnhibisyon oranı \%} = \frac{\text{Ablank} - \text{Asample}}{\text{Ablank}} \times 100 \%$$

% İnhibisyon-SOD kalibrasyon grafiği denkleminde yararlanılarak SOD değerleri hesaplandı. Bulunan SOD değerleri protein miktarına bölünerek SOD aktivitesi hesaplandı.



Şekil.22. SOD kalibrasyon grafiği

3.4.12.4. G-Px aktivite tayini

Yine protein oksidasyon ürünlerinden olan G-Px (glutasyon peroksidaz) aktivite tayin yönteminde Paglia ve Valentin (1967) yöntemine göre yapılmıştır. H_2O_2 varlığında indirgenmiş glutasyon (GSH), GPx tarafından okside glutatyona (GSSG) oksitlenir ve oksitlenen GSSG'nin glutasyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a dönüştürülmesi esnasında ortamda bulunan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kullanılır. Kullanılan bu NADPH miktarı absorbandaki azalış şeklinde 340 nm dalga boyunda izlenir. GPx aktivitesi kanda U/g Hb olarak ifade edilirken doku için ise U/g protein olarak tanımlanmaktadır. Hücre düzeyinde çalışırken genellikle IU/ μ g protein olarak ifade edilmektedir.

Kullanılan Reaktifler;

1 M Tris-HCl: 1,6 g Tris-HCl ($m_A=157,6$ g/mol), distile suda çözülüp 10 ml distile suya tamamlandı.

5 mmol/L EDTA (pH=8): 0,093 g EDTA disodyum tuzu ($m_A=372,2$ g/mol), distile suda çözülüp 50 ml distile suya tamamlandı.

0,1 M redükte glutatyon (GSH): 0,03 g GSH ($m_A=307,3$ g/mol) 1 ml distile suya tamamlandı.

2 mM NADPH: 0,02 g NADPH ($m_A=833,3$ g/mol), 1 ml distile suya tamamlandı.

1 u/ml glutatyon redüktaz: 2 μ l enzimden çekip 998 μ l distile suya tamamlandı.

7 mM t-butil hidroksiperoksit: 10 μ l t-butil hidroperoksit çekip 2 ml suya tamamlandı.

Tüm reaktifler günlük hazırlandı.

Yapılış Yöntemi;

Tris-HCl-EDTA-100 μ l

Redükte glutatyon-20 μ l

Glutatyon redüktaz-100 μ l

NADPH-100 μ l

Örnekler-10 μ l (Bölüm 3.4.12.'deki ön işlem uygulanarak lizis edilmiş örnekler)

Distile su-660 μ l

37 $^{\circ}$ C'de 10 dakika inkübe edildi. 340 nm'de ilk okutma yapıldı. Ardından 10 μ l t-butil hidroperoksit eklenip 2,5 ve 5 dakika aralıklarla 340 nm'de tekrar okutma yapıldı. NADPH'ın kayboluşu izlendi. OD'deki (optik dansite) azalış kaydedildi.

GPx Abs0 (0 dakika)

Abs1 (2,5 dakika)

Abs2 (5 dakika)

$$GPx = \{ [(Abs0 - Abs2) * 10^6 * 2,99] / (6,22 * 10002 * 0,02) \} = X (IU/L)$$

$$= X * DF (Dilüsyon Faktörü) / Protein (g/100 ml) / 10$$

$$= IU/g Protein$$

Bulunan GPx değerleri, toplam protein miktarına bölünerek GPx aktivitesi hesaplandı.

3.4.12.5. MDA tayini

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA (malondialdehit) tayini, tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'nin reaksiyon vererek 532 nm dalga boyunda ölçülebilen renkli bir bileşik verme esasına dayanmaktadır. Hücredeki MDA düzeyleri Ohkawa ve ark (1979) tarif ettiği yöntemle göre tayin edilmiştir.

Kullanılan Reaktifler;

%20 TCA Solüsyonu:

20 g trikarboksilik asit (TCA) tartıldı, distile su ile çözüldü.

Balonjoje içinde 100 ml distile suya tamamlandı ve alt üst edilerek karıştırıldı.

%20'lik TCA çözeltisi hazırlanmış oldu.

% 0,67 TBA Solüsyonu:

0,67 g TBA tartıldı, distile su içinde çözüldü.

Balonjoje içinde 100 ml distile suya tamamlandı ve alt üst edilerek karıştırıldı.

% 0,67'lik TBA çözeltisi hazırlanmış oldu.

Yapılış Yöntemi;

50µl TBA+125 µl TCA+25µl (Bölüm 3.4.12.deki ön işlem uygulanarak lizis edilmiş örnekler) örnek eppendorfların içinde karıştırıldı.

95⁰C’de 30 dakika boyunca su banyosunda bekletildi.

Sonra buzlu suda soğutuldu.

200 µl n-butanol eklendi.

3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.

Üst faz olan süpernatant alındı

532 nm’de havaya karşı okundu.

Bulunan MDA değerleri, toplam protein miktarına bölünerek MDA aktivitesi belirlendi.

3.4.12.6. NO tayini

Nitrik oksit tayininde, Navarro Gonzalvez’in (1998) yöntemine göre cadmium granülleri kullanılarak belirlenmiştir. NO’in parçalanma ürünlerinden olan nitrat ve nitrit düzeylerinin toplamı saptanarak, bu şekilde NO düzeyi hakkında indirekt yolla fikir sahibi olunmuştur. Nitrik oksidin son stabil ürünü olan nitrit düzeylerinin saptanması amacıyla sıvı içerisindeki nitratlar nitrat redüktaz ile nitrite redüklenir ve toplam nitrit düzeyi griess reaksiyonuyla belirlenmektedir.

Kullanılan Reaktifler;

Kadmiyum (Cd) granülleri: küçük granüller haline getirildi.

Cd granülleri 0,1 M H₂SO₄ içinde saklandı. 1,12 ml H₂SO₄ 200 ml distile suya tamamlandı.

Glisin-NaOH tamponu Cd granüllerini aktifleştirmede kullanıldı: 1,5 g glisin distile suda çözülüp pH=9,7’ye ayarlandı. Toplam hacim distile su ile 100 ml’ye tamamlandı.

Sülfonilamid: 1 g sülfonilamid 100 ml sıcak 3 M HCl içinde çözüldü. Daha sonra soğutuldu.

3 M HCl: 24,90 ml HCl 100 ml distile suya tamamlandı.

75 mM ZnSO₄: 12,1103 g ZnSO₄ distile suda çözülüp 1 L distile suya tamamlandı.

5 mM CuSO₄: 0,798 g CuSO₄ distile suda çözülüp 1 L distile suya tamamlandı.

N-Naphtylethylene diamine (NNDA): 0,05 g NNDA 0,25 ml distile suda çözüldü.

Yapılış Yöntemi;

Tüplerin içine 125 µl örnek (Bölüm 3.4.12.deki ön işlem uygulanarak lizis edilmiş örnekler), 500 µl ZnSO₄ eklendi. Böylece deproteinizasyon işlemi yapılmış oldu.

Bunun üzerine 55 mM 625 µl NaOH eklendi (8 g NaOH tartıp 100 ml distile suya tamamlanarak 2 M NaOH çözeltisi hazırlandı. Sonra bu hazırlanan çözeltiden 275 µl çekip 9,725 µl distile suya tamamlanarak 55 mM 625 µl NaOH çözeltisi hazırlandı.)

10 dakika beklendi. Sonra 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Beyaz renkte küçük bir çökeltme gözlemlendi. Süpernatant numune olarak kullanıldı.

Kadmiyum granülleri aktifleştirildi. Her bir örnek için 2,5-3 g olacak şekilde miktarı ayarlanarak kadmiyumlar topluca bir erlenmayer içinde işleme tabi tutuldu. Sonra granüller deiyonize su ile yıkandı. 1-2 dakika 5 mM CuSO₄ solüsyonu içinde bekletildi ve solüsyon döküldü. Granüller önceden hazırlanmış olan Glisin-NaOH tamponu ile yıkanarak granüllerin aktifleştirme işlemi gerçekleştirildi.

En son Glisin-NaOH tamponu ile yıkanmış aktif kadmiyum granülleri tüplerin içine eklendi.

Sonra hazırlanan başka cam tüplere sırasıyla;

1 ml Glisin-NaOH tamponu

1 ml deproteinize örnek (Bölüm 3.4.12.deki ön işlem uygulanarak lizis edilmiş örnekler)

2 ml deiyonize su eklendi.

90 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir tüpten 2 ml alınıp üzerine sırasıyla;

2,5 ml deiyonize su

1 ml sülfonilamid

1 ml NNDA ilave edildi.

60 dakika oda sıcaklığında tekrar inkübe edildi. Ardından 545 nm'de köre karşı okuma yapıldı. Kör olarak deproteinizasyon işleminden itibaren numune yerine su kullanılarak tüm işlemler devam ettirildi.

NaNO₂ Standartlarının Hazırlanması

1. Stok; 0,1 mol/L NaNO₂ (0,69 g NaNO₂ (mA=69 g/mol) tartıldı, 100 ml distile suya tamamlandı.)

2. Stok; 0,5mmol/L=500µmol/L (1. stoktan 500 µl alındı, 100 ml distile suya tamamlandı.)

Standartlar; 100 µmol/L için 2. stoktan 1 ml alındı, 4 ml distile suya tamamlandı.

75 µmol/L için 2. stoktan 0,75 ml alındı, 4,25 ml distile suya tamamlandı.

50 µmol/L için 2. stoktan 500 µl alındı, 4,5 ml distile suya tamamlandı.

25 µmol/L için 2. stoktan 250 µl alındı, 4,75 ml distile suya tamamlandı.

10 µmol/L için 2. stoktan 100 µl alındı, 4,90 ml distile suya tamamlandı.

5 µmol/L için 2. stoktan 50 µl alındı, 4,95 ml distile suya tamamlandı.

2 µmol/L için 2. stoktan 20 µl alındı, 4,98 ml distile suya tamamlandı.

0,5 µmol/L için 2. stoktan 5 µl alındı, 4,995 ml distile suya tamamlandı.

Cam tüplere sırasıyla;

1 ml glisin tamponu,

1 ml hazırlanan standartlardan

1 ml deiyonize su ilave edildi.

90 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonunda 2 ml alınıp üzerine;

1 ml deiyonize su

1 ml sülfonilamid

1 ml NNDA ilave edildi.

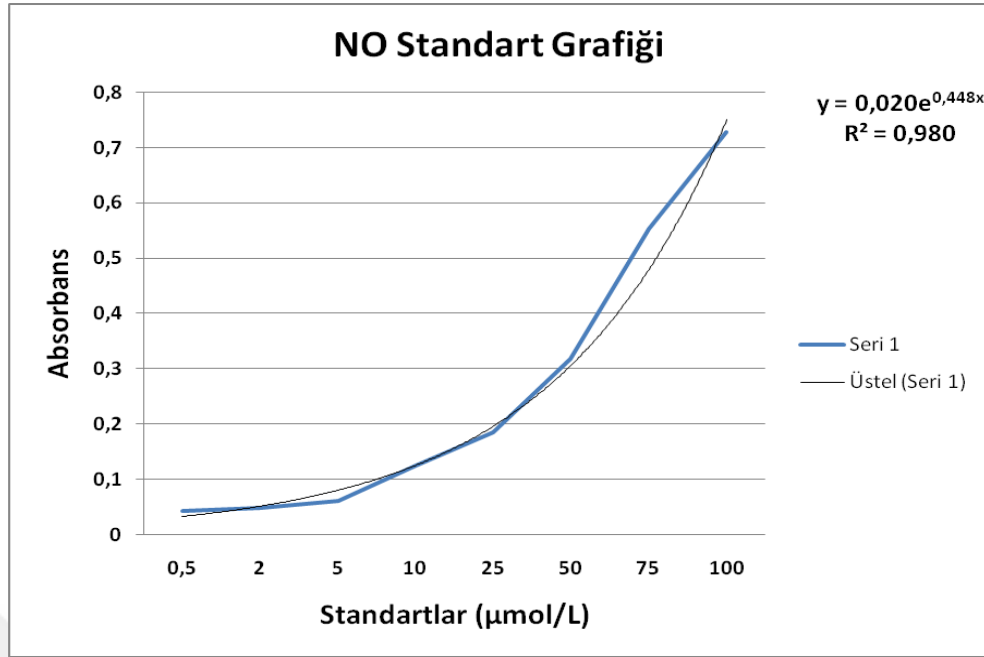
60 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

Ardından 545 nm 'de okuma yapıldı.

Standart garfiği oluşturuldu.

Standart grafiğine göre değerlendirme yapıldı.

Bulunan NO değerleri, toplam protein miktarına bölünerek NO aktivitesi belirlendi.



Şekil.23. NO kalibrasyon grafiği

3.5. İstatistiksel Yöntemler

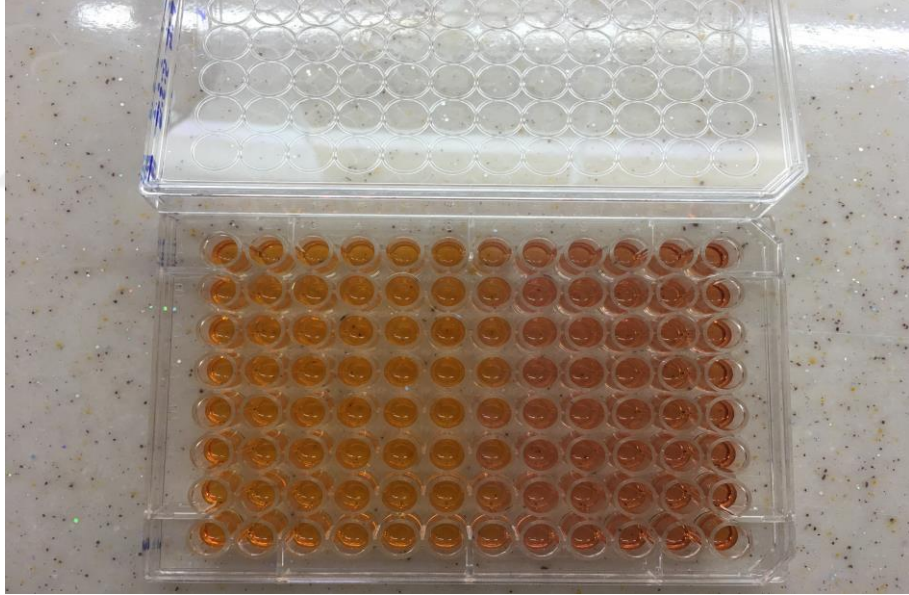
Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS (for Windows Release 17.0 Standart Version Copyright © SPSS Inc. 1989-2001) hazır paket programı kullanılarak yapıldı. Elde edilen doz-absorbans canlılık verileri, GraphPad Prism 6 (San Diego, CA,USA) hazır paket programı kullanılarak IC_{50} değerleri nonlinear regresyon analizine göre belirlenmiştir. Varyans analizi uygulanmadan önce, çalışmadaki parametrelerin normal dağılıp dağılmadıkları Kolmogorov-Smirnov testi ile incelenmiştir. Gruplara tek yön varyans analizi One-Way ANOVA uygulanarak sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel açıdan anlamlı F değerleri veren parametreler için ileri (post hoc) testler uygulanmıştır ve eşit örneklem büyüklüğüne dayalı Tukey testi kullanılmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

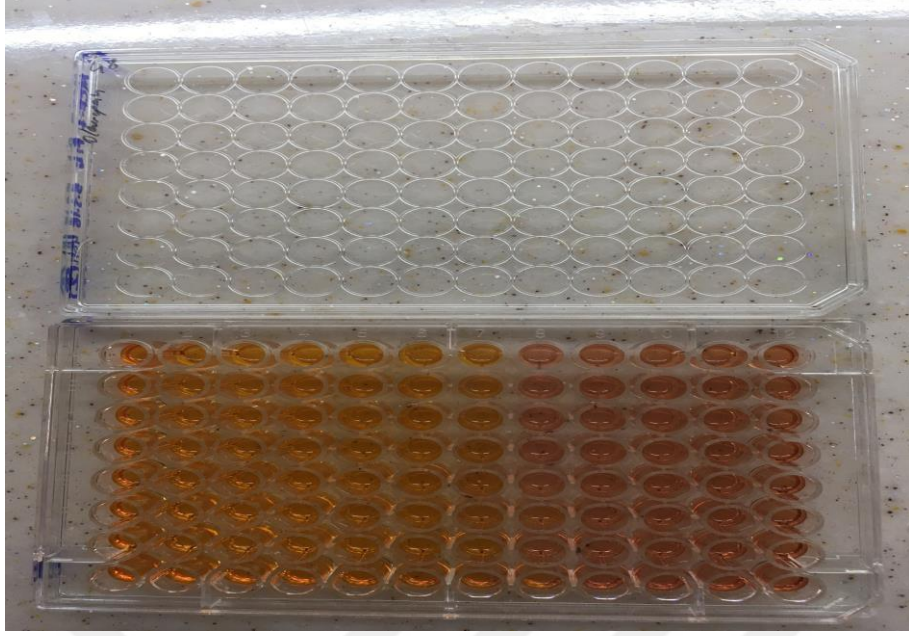
4.1. Hücre Canlılığı Değerlendirme Bulguları

4.1.1. Etkin Oleuropein Dozunun Belirlenmesi

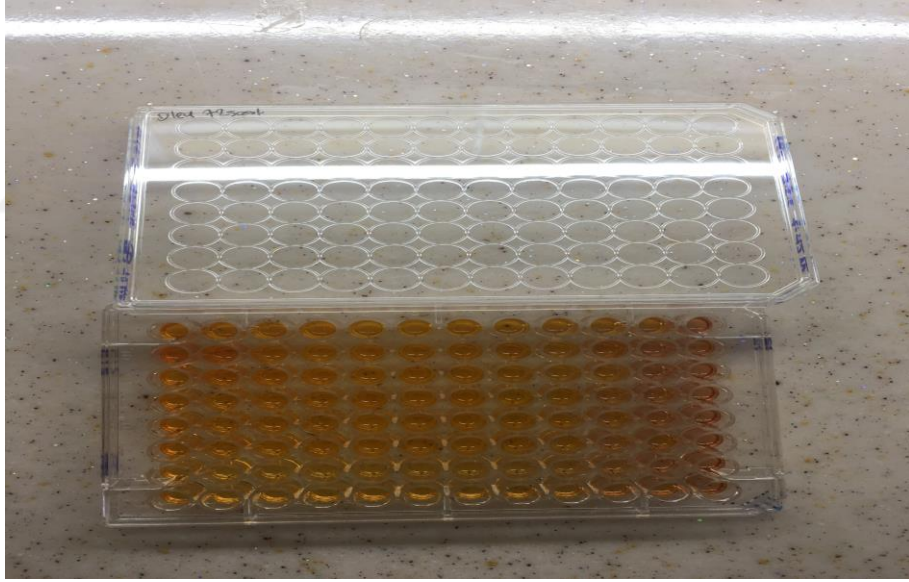
MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine en etkin dozu belirleyebilmek amacıyla farklı dozlarda oleuropein uygulandı. Ardından WST-1 yöntemiyle oleuropeinin sitotoksitesisi ve baskılayıcı konsantrasyon (IC₅₀) değeri belirlendi. 96 kuyucuklu plaklara ekilen oleuropeinin 24, 48 ve 72 saat sonundaki plak görüntüleri alındı. Ayrıca flasklara ekilen hücrelerdeki proliferasyonu göstermek amacıyla hücrelerin trinoküler invert mikroskop (olympus CKX41) ile görüntüleri alındı. Farklı konsantrasyonlardaki oleuropein uygulamasının 48 saatlik inkübasyon sonrası mikroskopik gözlem sonuçlarına göre; kontrol grubundaki hücrelerin, farklı konsantrasyonlarındaki oleuropein uygulanan gruplara göre daha yoğun, aktif ve hareketli olduğu tespit edildi (Resim 17).



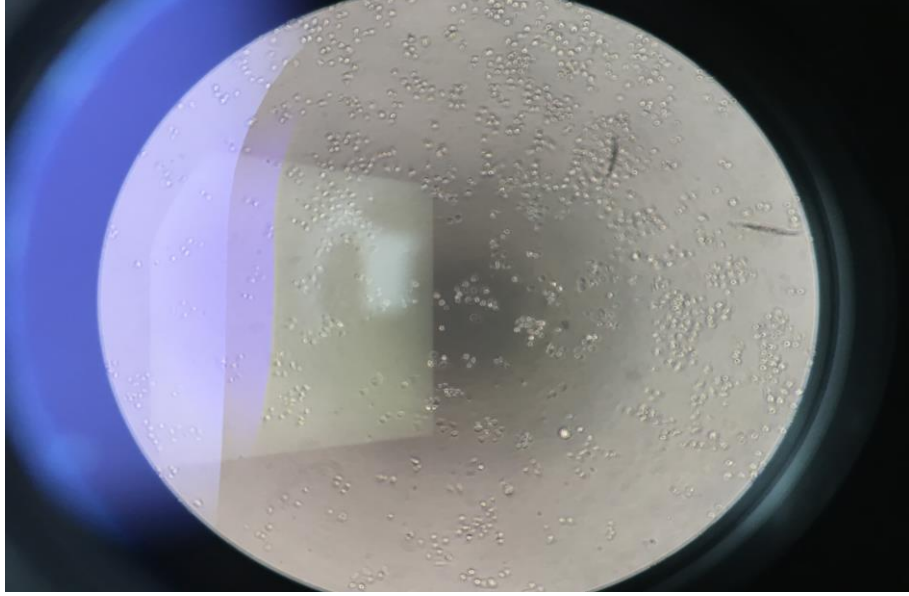
Resim 14. 24 saat oleuropeine maruz kalmış WST-1 testi görüntüsü



Resim 15. 48 saat oleuropeine maruz kalmış WST-1 testi görüntüsü



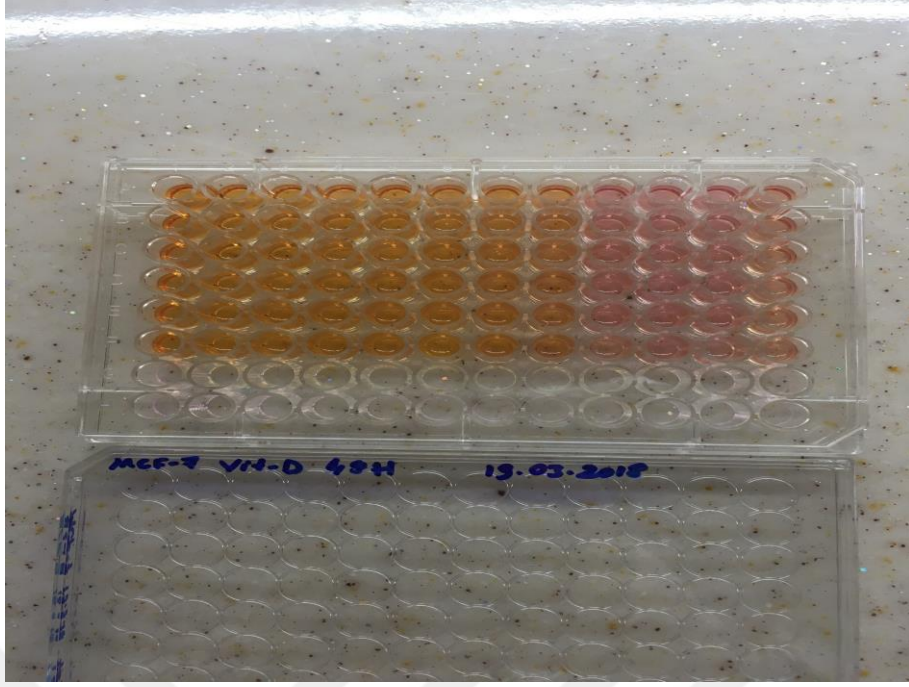
Resim 16. 72 saat oleuropeine maruz kalmış WST-1 testi görüntüsü



Resim 17. 48 saat oleuropeine maruz kalmış hücrelerin mikroskopik görüntüsü (X40)

4.1.2. Etkin Vitamin D Dozunun Belirlenmesi

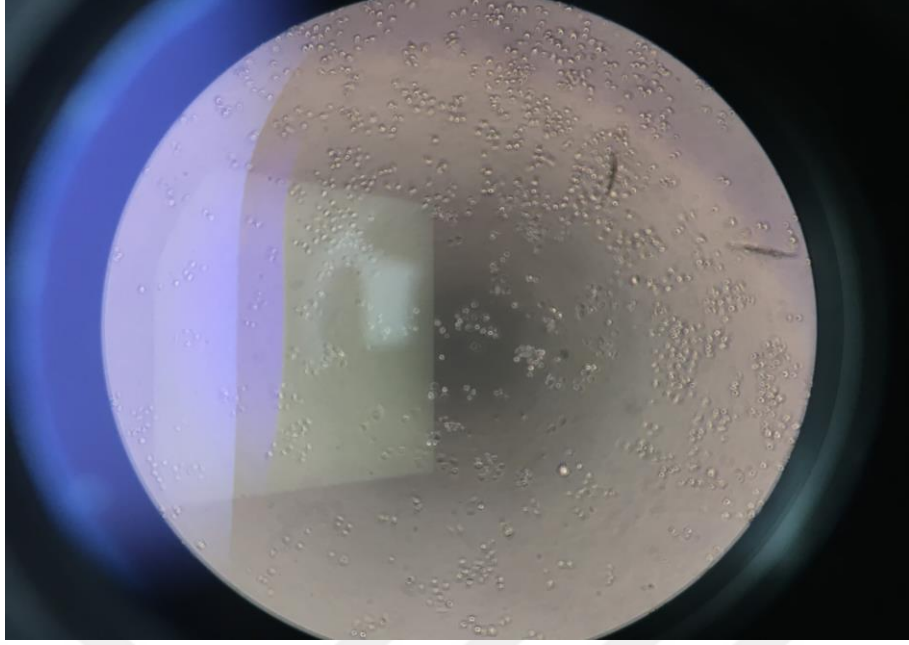
MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine en etkin dozu belirleyebilmek amacıyla farklı dozlarda vitamin D uygulandı. Ardından WST-1 yöntemiyle vitamin D'nin sitotoksitesi ve baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri belirlendi. 96 kuyucuklu plaklara ekilen D vitamininin 24, 48 ve 72 saat sonundaki plak görüntüleri alındı. Ayrıca flasklara ekilen hücrelerdeki proliferasyonu göstermek amacıyla hücrelerin trinoküler invert mikroskop (Olympus CKX41) ile görüntüleri alındı. 24. saatte anlamlı bir inhibisyon gözlemlenmedi. Bu yüzden farklı konsantrasyonlardaki vitamin D uygulamasının 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası mikroskopik gözlem sonuçlarına göre; kontrol grubundaki hücrelerin, farklı konsantrasyonlarındaki oleuropein uygulanan gruplara göre yine daha yoğun, aktif ve hareketli olduğu tespit edildi (Resim 20).



Resim 18. 48 saat D vitaminine maruz kalmış WST-1 testi görüntüsü



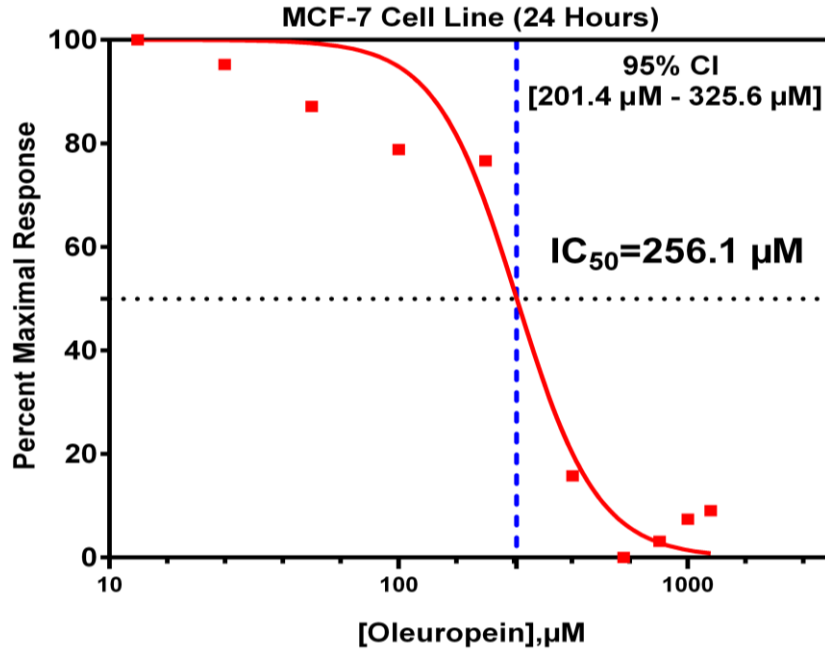
Resim 19. 72 saat D vitaminine maruz kalmış WST-1 testi görüntüsü



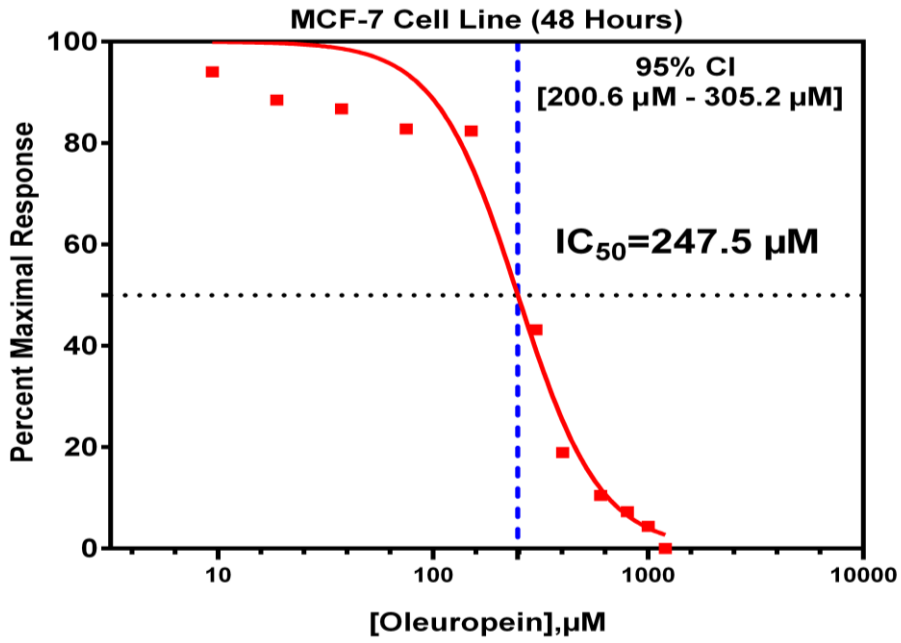
Resim 20. 48 saat D vitaminine maruz kalmış hücrelerin mikroskopik görüntüsü (X40)

4.1.3. Oleuropeinin Anti-proliferatif Etkisinin WST-1 Yöntemiyle Belirlenmesi

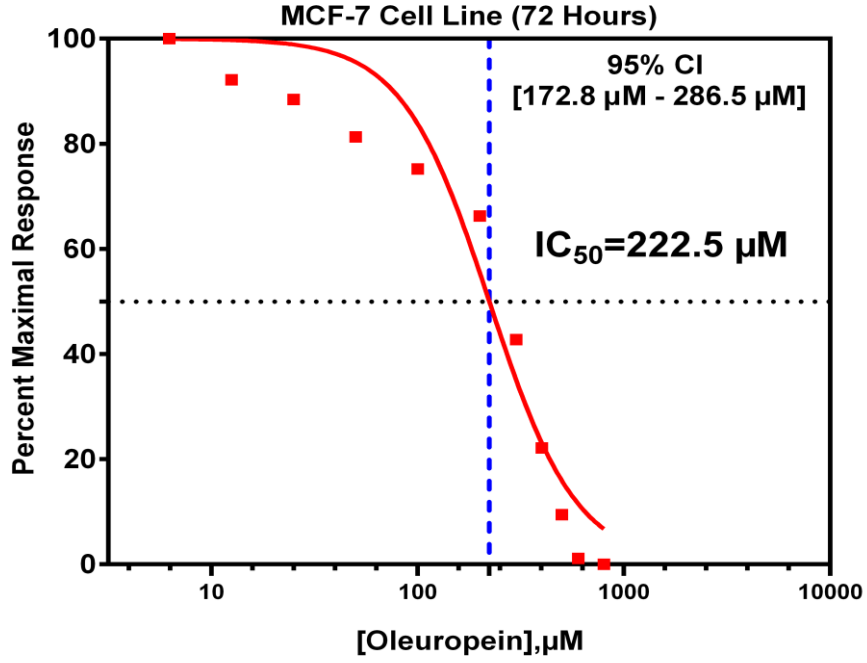
Hücre yoğunluğu, proliferasyonunu değerlendirmek için yapılan, canlı hücrelerden tetrazolium tuzlarının ayrıştırılmasına dayanan non-radyoaktif, spektrofotometrik, kolorimetrik bir test olan WST-1 (water-soluble tetrazolium salt) testi kiti (Sigma Aldrich, USA) ile belirlendi. 96'lık plak içerisine her bir kuyucuğa 200 µl volüm içerisinde $0,5 \times 10^4$ MCF-7 hücre hattı olacak şekilde hücre süspansiyonu aktarıldı. Her bir grup için üç ayrı kuyucukta çalışma yapıldı. Belirtilen süre ve dozlarda oleuropein uygulandı. Deneyin sonunda her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 solüsyonundan eklenerek oleuropeinin 24. saatteki baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri 256,1 µM olarak bulundu. 48. saatteki baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri 247,5 µM olarak bulundu. 72. saatteki baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri ise 222,5 µM olarak bulundu.



Şekil 24. Oleuropeinin 24. saatteki IC_{50} değeri



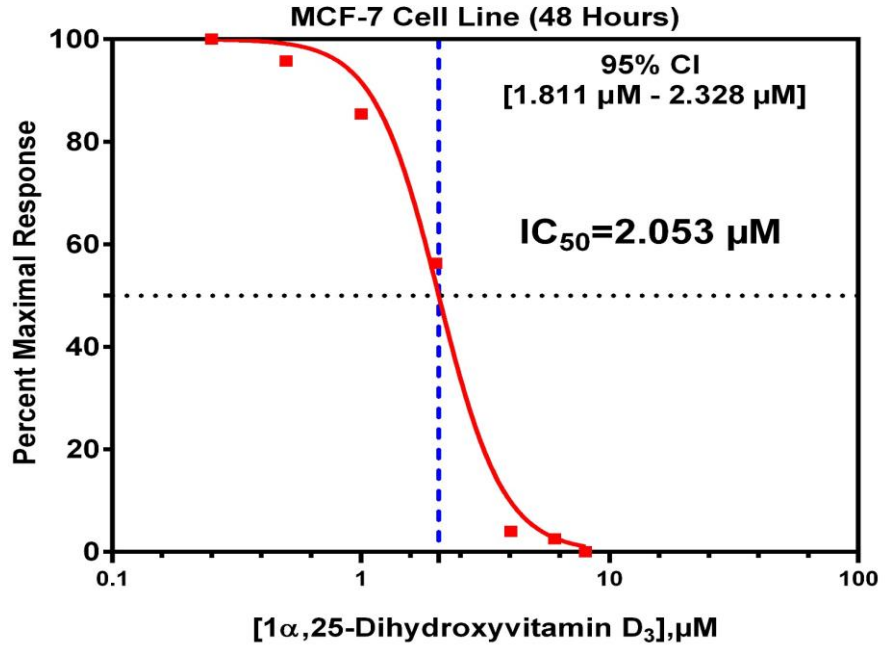
Şekil 25. Oleuropeinin 48. saatteki IC_{50} değeri



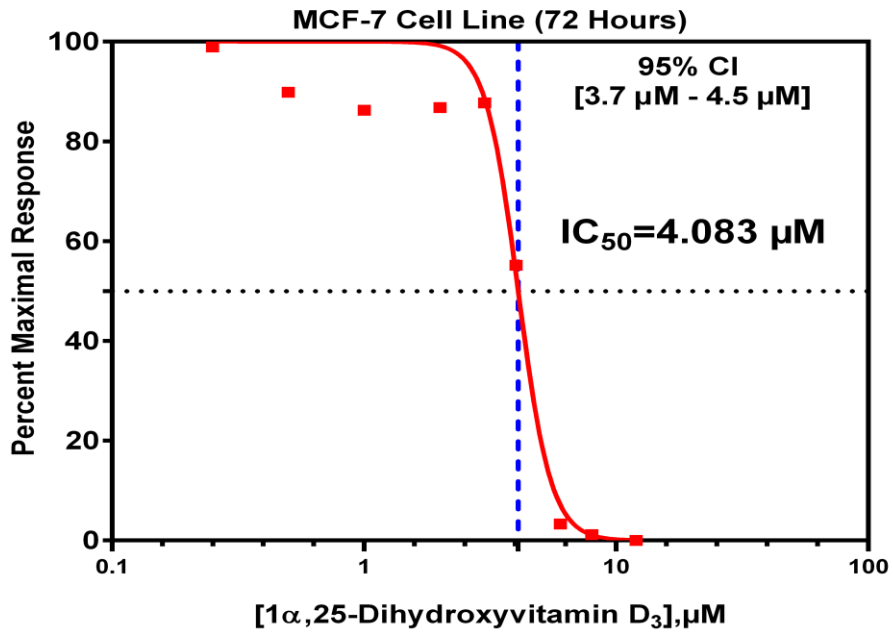
Şekil 26. Oleuropeinin 72. saatteki IC₅₀ değeri

4.1.4. Vitamin D'nin Anti-proliferatif Etkisinin WST-1 Yöntemiyle Belirlenmesi

Hücre yoğunluğu, proliferasyonunu değerlendirmek için yapılan, canlı hücrelerden tetrazolium tuzlarının ayrıştırılmasına dayanan non-radyoaktif, spektrofotometrik, kolorimetrik bir test olan WST-1 (Water-soluble tetrazolium salt) testi kiti (Sigma Aldrich, USA) ile belirlendi. 96'lık plak içerisine her bir kuyucuğa 100 µl volüm içerisinde $0,5 \times 10^4$ MCF-7 hücre hattı olacak şekilde hücre süspansiyonu aktarıldı. Her bir grup için üç ayrı kuyucukta çalışma yapıldı. Belirtilen süre ve dozlarda vitamin D uygulandı. Deneyin sonunda her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 solüsyonundan eklendi. Vitamin D'nin 24. saatinde anlamlı bir inhibisyon gözlemlenmedi. 48. saatteki baskılayıcı konsantrasyon (IC₅₀) değeri 2,053 µM olarak bulundu. 72. saatteki (IC₅₀) değeri ise 4,083 µM olarak bulundu.



Şekil 27. Vitamin D'nin 48. saatteki IC50 değeri



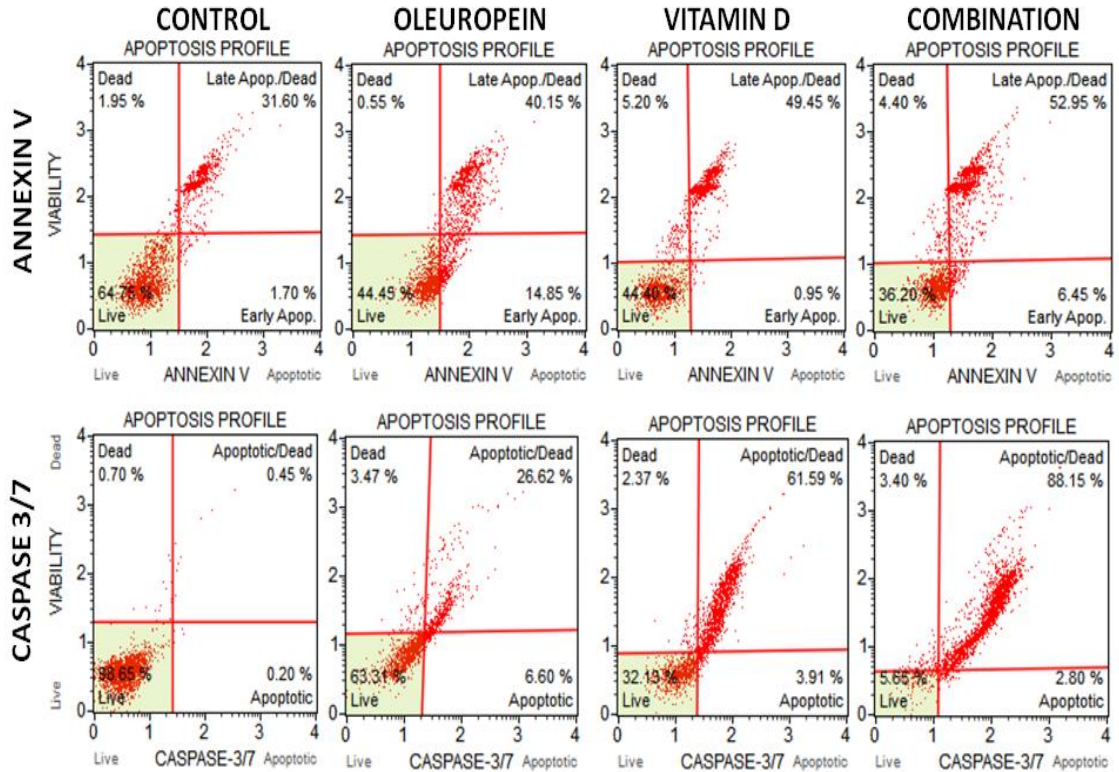
Şekil 28. Vitamin D'nin 72. saatteki IC50 değeri

4.2. WST-1 Yöntemiyle Elde Edilen Sitotoksosite Sonuçları

Şekil 24’de görüldüğü gibi oleuropeinin 24. saatteki baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri 256,1 μM olarak bulundu. Şekil 25’de görüldüğü gibi oleuropeinin 48. saatteki baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri 247,5 μM olarak bulundu. Şekil 26’da görüldüğü gibi oleuropeinin 72. saatteki baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri ise 222,5 μM olarak bulundu.

Şekil 27’de görüldüğü gibi vitamin D’nin 48. saatteki baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri 2,053 μM olarak bulundu. Şekil 28’de görüldüğü gibi vitamin D’nin 72. saatteki (IC_{50}) değeri ise 4,083 μM olarak bulundu. Hem toksisiteyi ve oksidatif stres etkisini azaltmak için hem de gelecek çalışmalarda deney hayvan, faz çalışmalarında kullanılabilmesi için 48. saatin etkin dozları seçildi.

4.3. Apoptoz Değerlendirme Sonuçları



Şekil 29. Apoptoz değerlendirme sonuçları

Anneksin V testi için, kontrol grubunda yaşam oranı %64,75 iken, sırasıyla oleuropein tedavisinde %44,45, vitamin D tedavisinde %44,40, kombinasyon tedavisinde ise %36,20 olarak bulunmuştur.

Kontrol grubuna göre apoptotik ölüm sürecinin erken evrelerinin %1,70'den oleuropein tedavisi için %14,85'e, kombinasyon tedavisi için %6,45'e çıktığı tespit edilmiştir. Vitamin D tedavisi için %0,95'e düştüğü tespit edilmiştir.

Kontrol grubuna göre apoptotik ölüm sürecinin geç evreleri değerinin %31,60'dan oleuropein tedavisi için %40,15'e, vitamin D tedavisi için %49,45'e, kombinasyon tedavisi için ise %52,95'e çıktığı tespit edilmiştir.

Kaspaz 3/7 testi için, kontrol grubunda yaşam oranı %98,65 iken, sırasıyla oleuropein tedavisinde %63,31, vitamin D tedavisinde %32,13, kombinasyon tedavisinde %5,65 olarak bulunmuştur.

Kontrol grubuna göre apoptotik ölüm sürecinin erken evrelerinin %0,20'den oleuropein tedavisi için %6,60, vitamin D tedavisi için %3,91, kombinasyon tedavisi için ise %2,80'e çıktığı tespit edilmiştir.

Kontrol grubuna göre apoptotik ölüm sürecinin geç evreleri değerinin %0,45'den oleuropein tedavisi için %26,62'ye, vitamin D tedavisi için %61,59'a, kombinasyon tedavisi için ise %88,15'e çıktığı tespit edilmiştir. Anneksin V ve kaspaz 3/7 testleri, 3 tekrar yapılarak çalışıldı. Şekil 29, bir çalışmaya ait olup, diğer çalışmaların da şekilleri mevcuttur. Tablo 10 ve tablo 11'de gösterilen değerler, 3 tekrarda çıkan sonuçların ortalamalarıdır.

Tablo 10. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen yüzde oran (%) apoptoz (Anneksin V) değerleri ve standart hata değerleri (n=3)

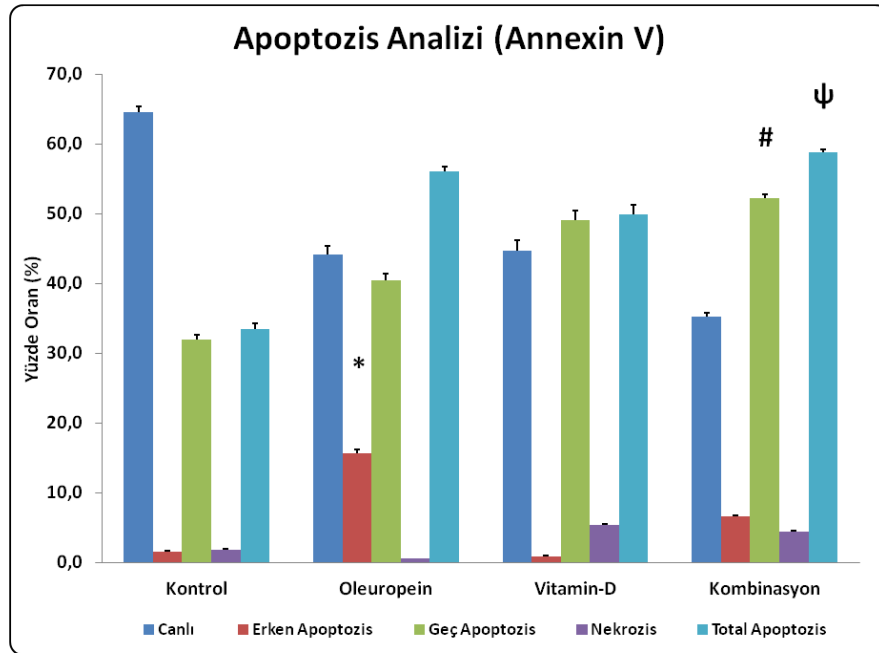
Gruplar	Canlı	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz	Nekroz	Total Apoptoz	Std Hata	Std Hata	Std Hata	Std Hata	Std Hata
Kontrol	64,6	1,6	31,9	1,8	33,5	0,9	0,1	0,8	0,1	0,7
Oleuropein	44,2	15,7	40,4	0,6	56,0	1,2	0,6	1,0	0,0	0,8
Vitamin D	44,7	0,9	49,1	5,4	50,0	1,5	0,1	1,4	0,1	1,4
Kombinasyon	35,3	6,6	52,3	4,5	58,0	0,5	0,1	0,5	0,1	0,4

Tablo 11. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen yüzde oran (%) apoptoz (Kaspaz 3/7) değerleri ve standart hata değerleri (n=3)

Gruplar	Canlı	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz	Nekroz	Total Apoptoz	Std Hata	Std Hata	Std Hata	Std Hata	Std Hata
Kontrol	98,1	0,2	0,5	0,6	0,7	0,4	0,0	0,1	0,1	0,0
Oleuropein	63,6	6,4	26,2	3,2	32,6	0,5	0,1	0,3	0,2	0,4
Vitamin D	34,0	3,3	61,3	2,4	64,7	1,0	0,3	0,5	0,2	0,6
Kombinasyon	5,0	2,8	88,4	3,4	91,2	0,4	0,1	0,5	0,1	0,4

4.3.1. Anneksin V Testi Sonuçları

Tablo 12. Anneksin V testi sonuçları



*; Oleuropein tedavisi ile diğer tedavi grupları arasında erken apoptoz parametresinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Oleuropein tedavisi, diğer tedavi gruplarına göre erken apoptoz gelişimini oransal olarak anlamlı arttırmıştır ($p<0,05$).

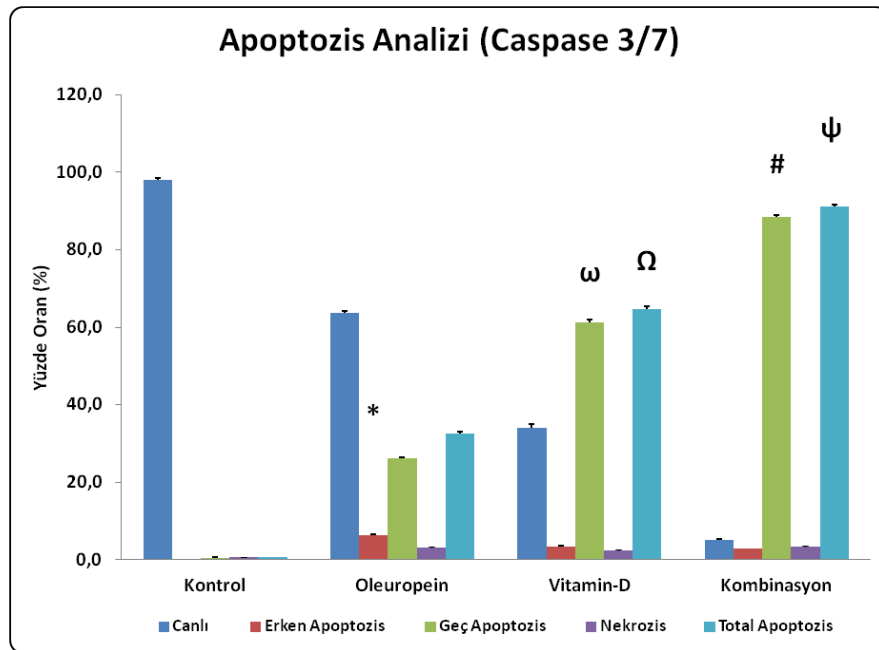
#; Kombinasyon tedavisi ile diğer tedavi grupları arasında geç apoptozis parametresinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Kombinasyon

tedavisi, diğer tedavi gruplarına göre geç apoptoz gelişimini oransal olarak anlamlı arttırmıştır ($p<0,05$).

Ψ ; Kombinasyon tedavisi ile diğer tedavi grupları arasında total apoptoz (erken+geç apoptoz) parametresinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Kombinasyon tedavisi, diğer tedavi gruplarına göre total apoptoz gelişimini oransal olarak anlamlı arttırmıştır ($p<0,05$).

4.3.2. Kaspaz 3/7 Testi Sonuçları

Tablo 13. Kaspaz 3/7 testi sonuçları



*; Oleuropein tedavisi ile diğer tedavi grupları arasında erken apoptoz parametresinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Oleuropein tedavisi, diğer tedavi gruplarına göre erken apoptoz gelişimini oransal anlamlı olarak arttırmıştır ($p<0,05$).

$\#$; Kombinasyon tedavisi ile diğer tedavi grupları arasında geç apoptoz parametresinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Kombinasyon tedavisi, diğer tedavi gruplarına göre geç apoptoz gelişimini oransal olarak anlamlı arttırmıştır ($p<0,05$).

Ψ; Kombinasyon tedavisi ile diğer tedavi grupları arasında total apoptoz (erken+geç apoptoz) parametresinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Kombinasyon tedavisi, diğer tedavi gruplarına göre total apoptoz gelişimini oransal olarak anlamlı arttırmıştır ($p<0,05$).

ω; Vitamin D tedavisi ile oleuropein tedavisi ve kontrol grupları arasında geç apoptoz parametresinde istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$).

Ω; Vitamin D tedavisi ile oleuropein tedavi ve kontrol grupları arasında total apoptoz parametresinde istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$).

4.4. Biyokimyasal Analizler

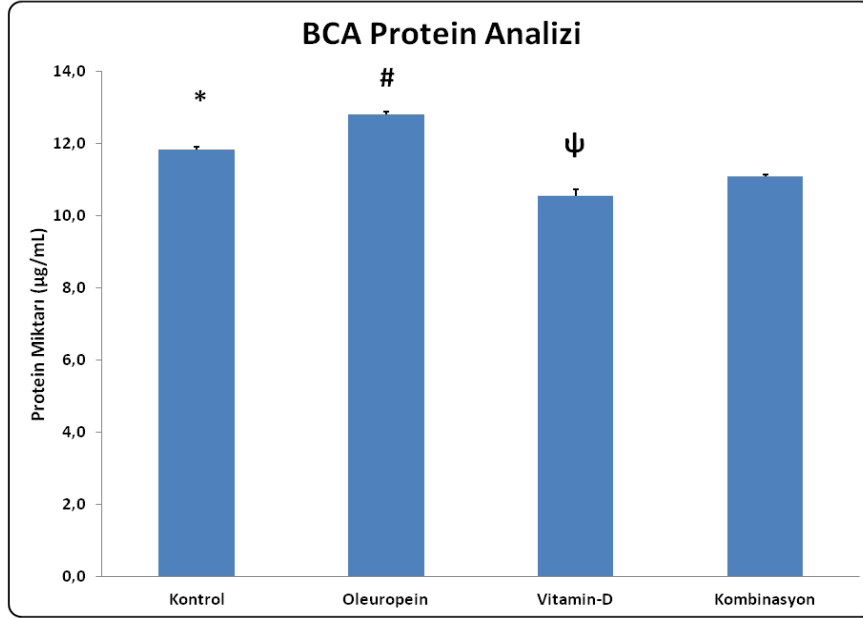
4.4.1. Total Protein Analizi Sonuçları

SOD, G-Px, MDA ve NO sonuçları protein değerine hesaplanmıştır. Total proteinin kolorimetrik tespiti ve nicelendirilmesi, bicinchoninic asit (BCA) yöntemine göre değerlendirilmiştir.

Tablo 14. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen ortalama toplam protein miktarı ve standart hata değerleri (n=3)

Konsantrasyon	Ortalama Toplam Protein $\mu\text{g/mL}$
Kontrol	11,8 \pm 0,1
Oleuropein	12,8 \pm 0,1
VitaminD	10,6 \pm 0,2
Kombinasyon	11,1 \pm 0,1

Tablo 15. BCA protein analiz sonuçları



*; Kontrol grubu ile diğer tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p < 0,05$).

#; Oleuropein tedavisi ile diğer tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$).

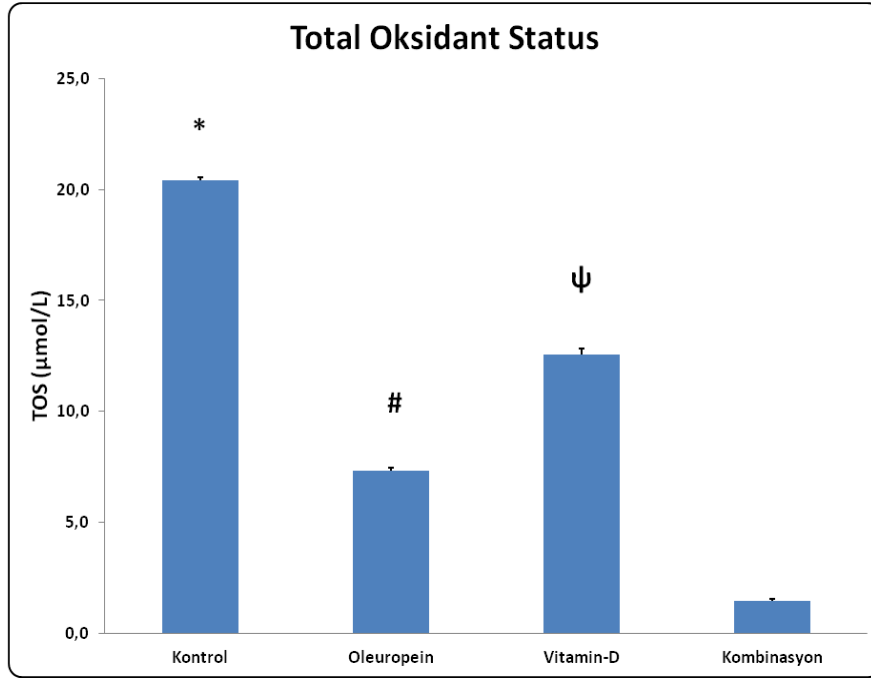
Ψ; Vitamin D tedavisi ile kombinasyon tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0,05$).

4.4.2. Biyokimyasal Total Oksidan ve Total Antioksidan Kapasitesi Analizi Sonuçları

Tablo 16. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen total oksidan kapasite (TOS) değerleri ve standart hata değerleri ($n=3$)

Konsantrasyon	Total Oksidan Kapasite $\mu\text{mol/L}$
Kontrol	$20,4 \pm 0,2$
Oleuropein	$7,3 \pm 0,1$
VitaminD	$12,6 \pm 0,3$
Kombinasyon	$1,4 \pm 0,1$

Tablo 17. Total oksidan kapasite



*; Kontrol grubu ile diğer tedavi grupları arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p<0,05$).

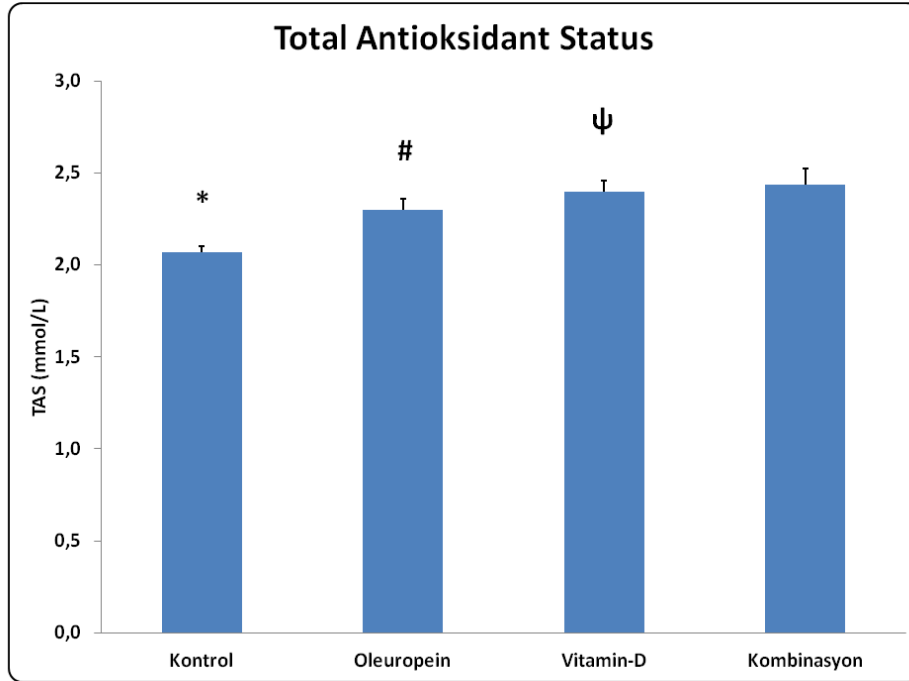
#; Oleuropein tedavisi ile diğer tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$). Oleuropein tedavisi, vitamin D tedavisine göre TOS'u anlamlı seviyede düşürmüştür. Ayrıca, kombinasyon tedavisi, TOS'u oleuropein tedavi grubuna göre anlamlı ölçüde düşürmüştür ($p<0,05$).

Ψ; Vitamin D tedavisi ile kombinasyon tedavisi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$). Kombinasyon tedavisi, TOS'u vitamin D tedavisine göre anlamlı ölçüde düşürmüştür ($p<0,05$).

Tablo 18. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen TAS değerleri ve standart hata değerleri (n=3)

Konsantrasyon	Total Antioksidan Kapasite µmol/L
Kontrol	2,1 ± 0,03
Oleuropein	2,3 ± 0,06
VitaminD	2,4 ± 0,06
Kombinasyon	2,4 ± 0,09

Tablo 19. Total antioksidan kapasite



*; Kontrol grubu ile vitamin D ve kombinasyon tedavileri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile oleuropein tedavisi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0,05$).

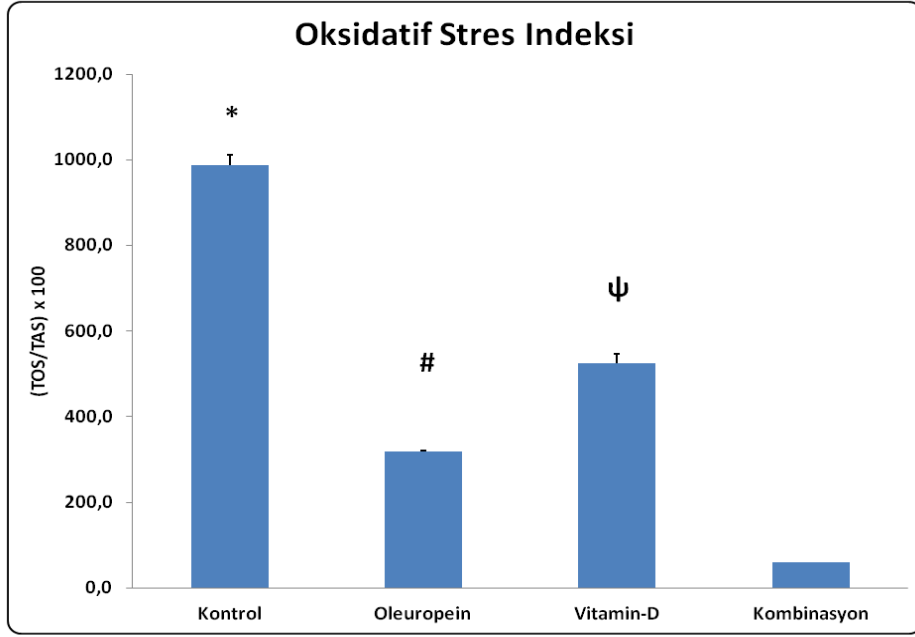
#; Oleuropein tedavisi ile diğer tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0,05$).

Ψ; Vitamin D tedavisi ile oleuropein ve kombinasyon tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0,05$).

Tablo 20. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen OSİ değerleri ve standart hata değerleri (n=3)

Konsantrasyon	OSİ (TOS/TAS*100)
Kontrol	987,9 ± 23,9
Oleuropein	318,3 ± 2,2
VitaminD	524,4 ± 23,3
Kombinasyon	59,09 ± 1,4

Tablo 21. Oksidatif stres indeksi (OSİ)



*; Kontrol grubu ile diğer tedavi grupları arasında OSİ parametresinde istatistiksel olarak oldukça anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p < 0,05$).

#; Oleuropein tedavisi ile diğer tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$). Oleuropein tedavisi, vitamin D tedavisine göre OSİ'yi anlamlı ölçüde düşürmüştür. Ayrıca kombinasyon tedavisi, OSİ'yi oleuropein tedavisine göre anlamlı ölçüde düşürmüştür ($p < 0,05$).

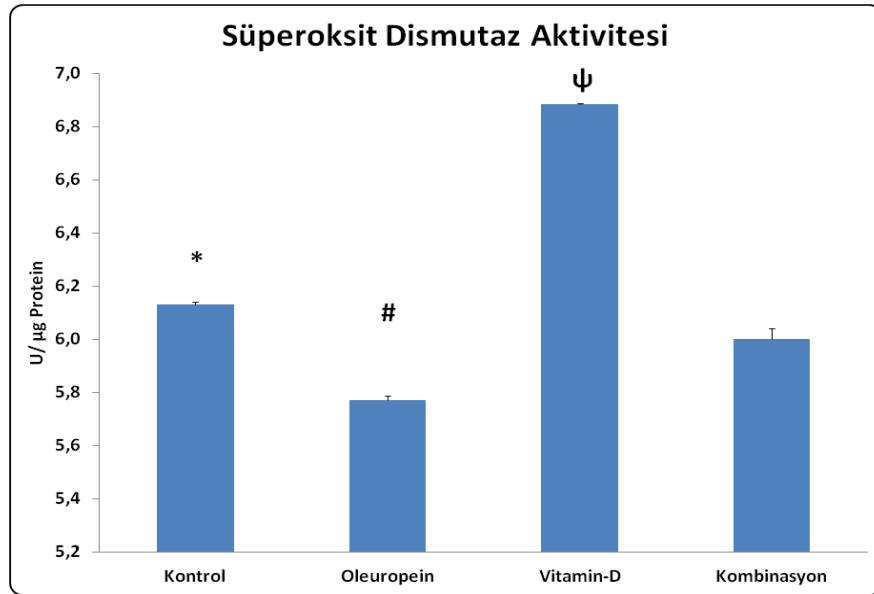
Ψ; Vitamin D tedavisi ile kombinasyon tedavisi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$). Kombinasyon tedavisi, OSİ'yi vitamin D tedavisine göre anlamlı ölçüde düşürmüştür ($p < 0,05$).

4.4.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Sonuçları

Tablo 22. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen SOD değerleri ve standart hata değerleri (n=3)

Konsantrasyon	SOD (U/ μ g protein)
Kontrol	6,1 \pm 0,009
Oleuropein	5,8 \pm 0,017
VitaminD	6,9 \pm 0,003
Kombinasyon	6,0 \pm 0,042

Tablo 23. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi



*; Kontrol grubu ile oleuropein, vitamin D ve kombinasyon tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$).

#; Oleuropein tedavi grubu ile vitamin D ve kombinasyon tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$). Vitamin D tedavisi, SOD aktivitesini anlamlı ölçüde artırmıştır ($p < 0,05$).

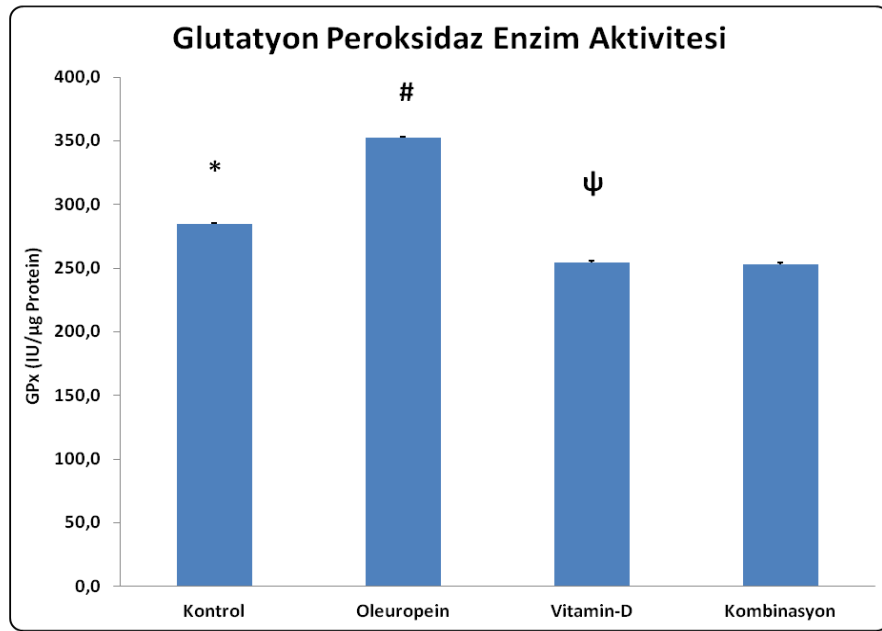
Ψ ; Vitamin D tedavi grubu ile kombinasyon tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$). Vitamin D tedavisi, kombinasyon tedavi grubuna göre, SOD aktivitesini anlamlı ölçüde artırmıştır ($p < 0,05$).

4.4.4. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivite Sonuçları

Tablo 24. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen GPx değerleri ve standart hata değerleri (n=3)

Konsantrasyon	GPx Protein (IU/μg protein)
Kontrol	284,4 ± 1,33
Oleuropein	352,6 ± 0,5
VitaminD	254,2 ± 1,4
Kombinasyon	253,3 ± 1,2

Tablo.25. Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesi



*; Kontrol grubu ile diğer tedavi grupları arasında GPx parametresinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p < 0,05$).

#; Oleuropein tedavisi ile diğer tedavi grupları ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$). Oleuropein tedavisi, vitamin D ve kombinasyon tedavisine göre GPx'i anlamlı ölçüde arttırmıştır.

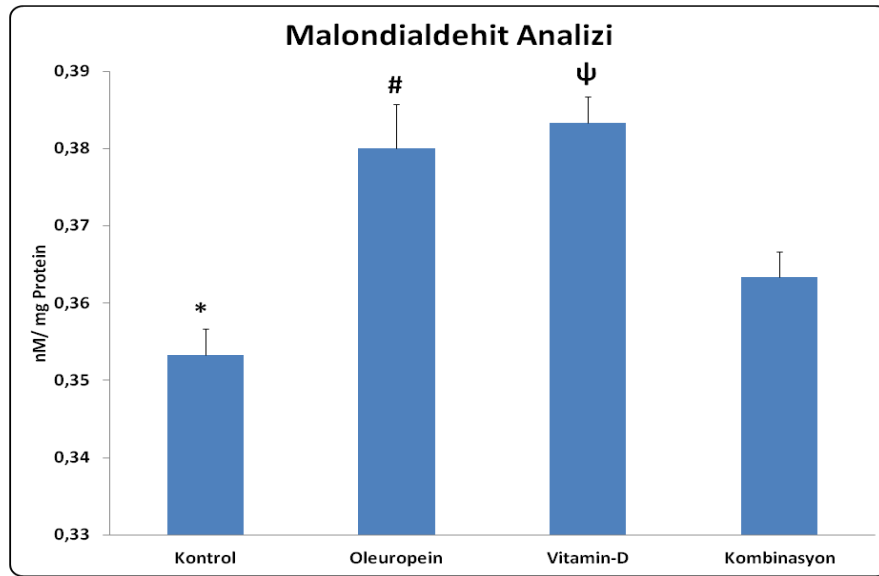
Ψ; Vitamin D tedavi grubu ile kombinasyon tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0,05$).

4.4.5. Malondialdehit (MDA) Analizi Sonuçları

Tablo 26. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen MDA değerleri ve standart hata değerleri (n=3)

Konsantrasyon	MDA (nM/mg protein)
Kontrol	0,35 ± ,0,003
Oleuropein	0,38 ± ,0,006
VitaminD	0,38 ± 0,003
Kombinasyon	0,36 ± 0,003

Tablo.27. Malondialdehit (MDA) analizi



*; Kontrol grubu ile oleuropein ve vitamin D tedavileri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Ancak, kontrol grubu ile kombinasyon tedavisi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$). Oleuropein ve vitamin D tedavisi, kontrol grubuna göre MDA miktarını arttırdığı gözlemlendi ($p > 0,05$).

#; Oleuropein tedavisi ile kombinasyon tedavisi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$).

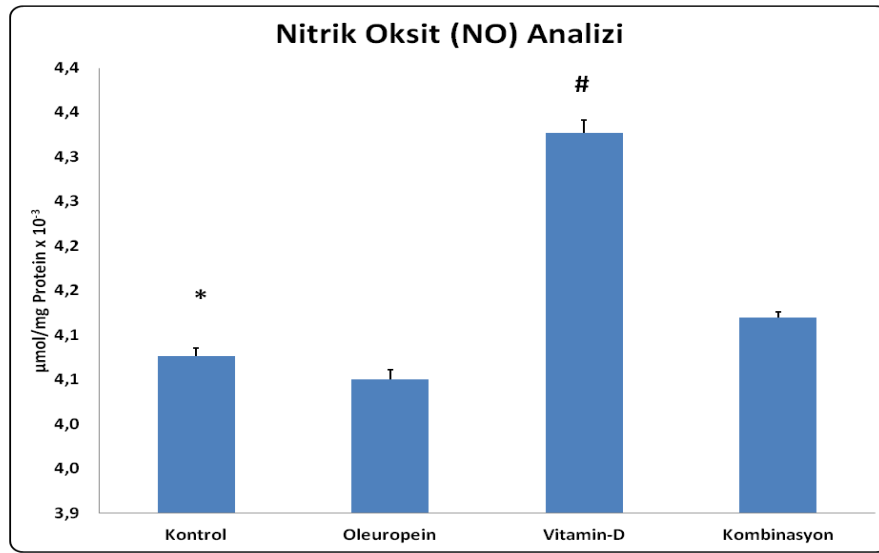
Ψ; Vitamin D tedavisi ile kombinasyon tedavisi arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$).

4.4.6. Nitrik Oksit (NO) Analizi Sonuçları

Tablo.28. 48 saatlik ölçümlerde elde edilen NO değerleri ve standart hata değerleri (n=3)

Konsantrasyon	NO ($\mu\text{mol}/\text{mg protein} \times 10^{-3}$)
Kontrol	$4,1 \pm 0,009$
Oleuropein	$4,1 \pm 0,012$
Vitamin D	$4,3 \pm 0,015$
Kombinasyon	$4,1 \pm 0,006$

Tablo.29. Nitrik oksit (NO) analizi



*; Kontrol grubu ile oleuropein ve kombinasyon tedavi grupları arasında nitrik oksit (NO) parametresinde istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0,05$).

#; Vitamin D tedavi grubu ile diğer tedavi grupları arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı fark vardır ($p < 0,05$). Vitamin D tedavi grubu, diğer tedavi gruplarına göre NO miktarını anlamlı artırdığı görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türü olup kadınlarda kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer alır. Cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve hormonal tedavinin düzgün bir prensiple uygulanması hastaların yaşam sürelerini önemli ölçüde etkiler (Duijts ve ark, 2011; Jemal ve ark, 2011). Meme kanserinin teşhis ve tedavisinde yapılan pek çok çalışma ve kaydedilen gelişmelere rağmen bu hastalıktan kaynaklanan ölüm oranları son 20 yıl içerisinde giderek artış göstermiştir (Al-Hajj ve ark, 2003; Andre ve ark, 2010).

Özellikle son on yıl boyunca meme kanserinin tedavisinde vinorelbin, paklitaksel, dosetaksel, letrozol, anastrozol gibi pek çok ilaç geliştirilmiştir. Bu ilaçlar sayesinde pek çok kanserde olumlu gelişmeler sağlanmış olsa da, çeşitli kanser türleri üzerinde uygulanan kemoterapi sayesinde olumlu sonuçlar elde edilse de, bu ilaçların aynı zamanda normal doku ve hücreler üzerinde de yan etkiler oluşturduğu için istenen sonuçlar tam olarak edilememektedir. Vücudun ilaca karşı gösterdiği direnç sonucunda da tedavi tam olarak etkili olamamaktadır. Dolayısıyla bu sebeplerden dolayı klinik olarak ciddi bir problem olan ilaç direncinin sebepleri ve biyokimyasal mekanizmaları günümüzde araştırılmakta olan popüler bir araştırma konusu olarak dikkat çekmektedir. Aynı zamanda vücudun ilaca karşı gösterdiği direnç, hücrenin apoptoz ya da antiapoptoz yolunu seçmesi tamamen vücuda verilen ilaca karşı göstermiş olduğu hassasiyet veya direnç ile ilgili bir süreçtir (Tsuruo ve ark, 2003).

Kemoterapötik ajanların asıl amacı, normal hücrelere göre daha hızlı büyüyen ve çoğalan neoplastik hücreleri proliferatif dönemde iken, daha fazla yayılım göstermeden tahrip ederek yok etmektir. Ancak kemoterapötik ajanlar neoplastik hücreleri tahrip ederken bazı normal hücreler de bundan etkilenmekte ve bu durum çeşitli yan etkilere sebep olmaktadır. Bu yan etkilerden en çok kan hücreleri, gastrointestinal sistemdeki hücreler, kıl folikülleri, spermiler, kalp, böbrekler, akciğer, mesane ve sinir sistemi organları gibi bizim için hayati öneme sahip organlar etkilenmektedir (Türk, 2013). Aynı zamanda bu ilaçlar ROS düzeylerinde artışa ve antioksidanlarda (GSH, GSH-Px, katalaz, vitamin A, E, C, çinko, melatonin ve sitokrom C) azalmalara sebep olur. Bu yüzden için parenteral veya oral yolla alınan farklı yapı ve özellikteki antioksidan maddeler ile ROS düzeyleri azaltılmaya ve antioksidan aktiviteleri arttırılmaya çalışılmaktadır. Bu sayede kemoterapötiklerin oluşturduğu muhtemel yan etkiler en aza indirilmiş olur (Aitken ve Roman, 2008). Bu

sebeple kemoterapötik ajanların antioksidan etki göstermesi, normal hücreleri tahrip etmemesi açısından önem teşkil etmektedir.

Oleuropein ve oleuropeinin parçalanma ürünü olan hidroksitirozol radikal süpürücü, etkili antioksidanlardandır. Oleuropeinin bağışıklık sistemini güçlendirici antioksidan, kan basıncı düzenleyici, anti-inflamatuar, antiaterojenik, antikanser, antimikrobiyal, antiviral, hipolipidemik ve hipoglisemik ve antiaging gibi farmakolojik etkileri tespit edilmiştir (Visioli ve ark, 1998; Carluccio ve ark, 2003; Owen ve ark, 2000; Tripoli ve ark, 2005; Fredrickson 2000; Andreadou ve ark 2007; Andreadou ve ark 2006). LDL oksidasyonu, ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıkların gelişmesinde önemli bir risk faktörüdür. Oleuropein, aynı zamanda doza bağımlı olarak güçlü bir şekilde LDL'nin (low-density lipoprotein) oksidasyonunu inhibe eder (Visioli ve ark, 2002). Oleuropeinin antioksidan etkileri; radikalleri stabilize etme, ROS süpürücü etkisi, LDL oksidasyonunu inhibe etmesi olarak sıralanabilir. Anti-inflamatuar etkileri; pro-inflamatuar sitokinlerin sentezinin inhibisyonu, lipoksijenaz inhibisyonu olarak sıralanabilir. Antimikrobiyal etkileri; bakteriyel hücre hasarı olarak ifade edilebilir. Antiviral etkileri; viral integrasyon inhibisyonu ve viral zarf etkileşimi olarak sıralanabilir. Antitümör etkileri ise; vücutta oluşan ROS düzeylerini azaltması, antiproliferatif etki göstermesi, apoptozu indüklemesi, anti-migrasyon etki göstermesi ve anjiyogenezin inhibisyonu olarak sıralanabilir. Ayrıca zeytin ürünlerinde bulunan biyofenoller de antioksidan ve antimikrobiyal etki göstermekte ve serbest radikallere karşı aktivite göstermektedir (Omar 2010; Barbaro ve ark, 2014). Oleuropein ve hidroksitirozol aynı zamanda kardiyovasküler ve metabolik hastalıklar karşısında da koruyucu rol oynamaktadır (Bulotta ve ark, 2014). Tüm bu özelliklerinden dolayı oleuropein, kanser tedavilerinde potansiyel bir kemoterapötik ajan olarak düşünülebilir.

Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda zeytinyağının kolon, deri, meme ve karaciğer, prostat kanserlerine karşı etkili olduğunu gösterilmiştir. Zeytinyağının kanserden koruyucu özellikleri arasında tekli doymamış yağ asitleri, prolifenoller adlı antioksidanlar ve zeytinyağına özgü squalen adlı madde önem teşkil etmektedir (Mutaf, 2017). Yapılan bir çalışmada, zeytin meyvesinde, yağında ve yapraklarında bulunan, oleuropeinin hidrolizi ile açığa çıkan fenolik bir bileşik olan hidroksitirozolün promiyelositik HL-60 lösemi hücreleri ve insan kolon kanseri hatlarında hücre çoğalmasını inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Fabiani ve ark, 2006; Fini ve ark, 2008). Yapılan diğer birkaç çalışmada da zeytinyağı fenolik bileşiklerinin MCF-7 ve SKBR3 meme kanseri hücrelerinde hücre büyümesini doza bağımlı

olarak inhibe ettiği; habisleşme, tümörigenez ve metastaz oluşumunda integral rol oynayan HER2 onkogeninin sentezlenmesini azalttığı saptanmıştır (Menendez ve ark, 2007; Menendez ve ark, 2009). Aynı zamanda zeytinyağı ve zeytin polifenollerinin tüketiminin kemik sağlığını iyileştirdiğine dair çalışmalar da mevcuttur. Puel ve ark (2008) yaptıkları çalışmada diyetlerine tirosol, hidroksitirosol, zeytin karasuyu ekstraktı ilave edilerek 84 gün boyunca beslenen sıçanlarda, kemik mineral yoğunluğunun, kemik biyomekanik gücünün ve kemik döngüsü belirteçlerinin değerlendirildiğinde kemik sağlığına anlamlı etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir. Zeytinyağı ve zeytin fenollerinin bu yararlı etkilerinin oksidatif stres ve inflamasyonu azaltma yeteneklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Epidemiyolojik çalışmalar, zeytinyağı tüketiminin kanser riskinde azalmayla ilişkili olduğunu göstermektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar oleuropeinin farklı kanser hücre dizilerinde proliferasyonu inhibe edici ve apoptozu indükleyici etkilerinin olduğunu göstermektedir (Boss ve ark, 2016). Oleuropein ve hidroksitirosol hücre apoptozuna yol açan proonkogenik ve antionkogenik sinyal yollarının modülasyonu aracılığıyla etki edebilir ve böylece in vitro ortamda pek çok tümör hücre hattının büyümesini durdurabilir. Sepporta ve ark (2014) yaptıkları çalışmada oleuropeinin özellikle meme kanseri gelişimini ve akciğerlere metastazını inhibe ettiğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde oleuropeinin belli dozda meme kanserine karşı antiproliferatif etki gösterdiği ve ayrıca apoptozu indüklediği gözlemlenmiştir. Oleuropeinin antikanser etkisi bilinse de altında yatan mekanizmaları hala tam olarak bilinmemektedir. Oleuropeinin antikanser etkisine ilişkin in vitro ve in vivo pek çok çalışma mevcuttur (Shaoumshoum ve ark, 2017).

Han ve ark (2009) yaptıkları çalışmada oleuropein ve hidroksitirosolün insan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) antiproliferatif ve apoptotik etkilerini araştırmışlardır. Hücre proliferasyonuna MTT testi ile, hücre apoptozuna ise flow sitometri ile bakmışlardır. Oleuropein veya hidroksitirosolün insan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) hücre viabilitesini azalttığını, hücre MTT testine göre oleuropeinin 200 µg/ml veya hidroksitirosolün 50 µg/ml'si MCF-7 hücrelerinde hücre viabilitesini ve hücre proliferasyonunu oldukça azalttığını, hücre apoptozunu ise indüklediğini gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda Hassan ve ark (2012) yaptıkları çalışmada oleuropeinin meme kanserinde anti-metastatik etkileri incelenmiştir. Meme kanseri hücreleri (MDA) 200 µg/mL oleuropeine maruz bırakıldığında anti-metastatik etkilerin indüklendiği gözlemlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada insan meme kanseri hücrelerini (MCF-7) polifenolik olan

oleuropein ve hidroksitirosole maruz bırakıldıklarında hücre proliferasyonunun inhibe olduğunu ve bunun Erk 1/2 aktivasyonunun azalmasıyla ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir (Sirianni ve ark, 2010). Yine yapılan başka bir çalışmada oleuropeinin insan meme kanseri hücrelerine (MCF-7) olan antiproliferatif etkisi WST-1 testi ile incelenmiştir. 200 µM oleuropeine maruz bıraktıklarında hücre proliferasyonunun anlamlı olarak inhibe olduğunu ve apoptozun indüklendiğini gözlemlemişlerdir. Ek olarak bu etkilerin proapoptotik olan BAX ve p21 artışı, BCL-2 ve cyclin D1'in azalmasıyla ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir (Elamin ve ark, 2013). Hassan ve ark (2013) yaptıkları çalışmada oleuropeinin meme kanseri hücrelerinde p53 geni yolağı vasıtasıyla apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. Elamin ve arkadaşlarının 2013'de yaptıkları çalışmayı baz alarak meme kanseri hücrelerini 100 ve 200 µM konsantrasyonda oleuropeine maruz bırakmışlardır. Sonuç olarak oleuropeinin meme kanseri için potansiyel bir terapötik ajan olabileceği kanısına varmışlardır. Oleuropeinin potansiyel bir terapötik ajan olabilmesi, güçlü bir antioksidan özellik gösterdiği için ayrıca önem taşımaktadır. Bizim çalışmamızda da, bu çalışmalardaki dozlar referans alınarak 24 saatlik ölçüm için 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1600 µM, 48 saatlik ölçüm için 9,4, 18,75, 37,5, 75, 150, 300, 400, 600, 800, 1000, 1200 µM ve 72 saatlik ölçüm için 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 µM konsantrasyonlarda oleuropein MCF-7 hücrelerine maruz bırakılmıştır. Oleuropeinin 24. saatteki IC50 değeri 256,1 µM, 48. saatteki IC50 değeri 247,5 µM, 72. saatteki IC50değeri ise 222,5 µM olarak bulunmuştur. 48. saatteki IC50 değerlerinin apoptozu indüklediği gözlemlenmiştir. Yine aynı IC50 dozlarında güçlü bir antioksidan etki de gösterdiği saptanmıştır.

Carrera-Gonzales ve ark (2013) yaptıkları çalışmada oleuropein ve onun metaboliti olan hidroksitirosolun kanser üzerine koruyucu etkisini araştırmışlardır. Oleuropein ve metaboliti olan hidroksitirosolun antitümöral kapasitesi olduğunu gözlemlemişlerdir. Yapılan pek çok çalışmada pek çok kanser hücresinde zeytinyağı tüketiminin apoptozu anlamlı derecede indüklediği gösterilmiştir. Seçme ve ark (2016) yaptıkları çalışmada in vitro koşullarda oleuropeinin SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattına hücre proliferasyonu, invazyonu, koloni oluşumu, hücre döngüsü ve apoptoz mekanizması gibi terapötik etkilerini araştırmışlardır. Hücre viabilitesini XTT metoduyla, apoptozu TUNNEL yöntemiyle, protein ekspresyonları western blot testiyle yapmışlardır. SH-SY5Y nöroblastoma hücresinde oleuropeinin IC50 değerini 48. saatte 350 µM olarak bulmuşlardır. Ayrıca

oleuropein BCL-2 ve BAX'ı inhibe ederek, kaspaz-9 ve kaspaz-3 gen ekspresyonlarını aktive ederek apoptozu indüklediğini invazyonu ise azalttığını gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da oleuropeinin MCF-7 hücre hattı üzerine 24, 48 ve 72. saatteki etkileri araştırılmış 24. saatteki IC50 değeri 256,1 µM, 48 saatteki IC50 değeri 247,5 µM ve 72. saatteki değeri de 222,5 µM olarak bulunmuştur. 48. saat tedavi olarak alınmıştır. Hem yapılan çalışmalar referans alınarak hem de ileride yapılacak olan faz çalışmalarında toksik etkiyi engellemek için tedavi olarak 48. saat tercih edilmiştir. Oleuropeinin 48. saatteki IC50 değeri apoptozu da anlamlı derecede indüklediği gözlemlenmiştir. Ayrıca oleuropeinin 48. saatteki IC50 değerinin ROS'u düşürücü güçlü bir antioksidan etkiye de sahip olduğu gözlemlenmiştir. Keçeli ve Gordon (2001) yaptıkları çalışmada yeşil zeytinin ve sızma zeytinyağının fenolik fraksiyonlarının efektif bir antioksidan aktiviteye gösterdiklerini gözlemlemişlerdir.

Oksidatif DNA hasarının insan karsinogenezinde etkili olduğu, aynı zamanda oksijen radikallerinin insan hücrelerine devamlı olarak saldırdığı bilinmektedir. Oluşan bu saldırı engellenemezse, oluşan DNA hasarı zamanla kanserleşmeye neden olabilmektedir. Bu açıdan ROS'u düşürmek için önlem alınması önem teşkil eder. Randomize planlı bir çalışmada, fenolce zengin zeytinyağı tüketiminin, düşük fenollü zeytinyağı tüketimi ile kıyaslandığında oksidatif DNA hasarını %30'dan fazla oranda düşürdüğü ortaya çıkmıştır (Salvini ve ark, 2006). Yine başka bir çalışmada da, fenolce zengin zeytinyağı tüketiminin DNA oksidasyonunda sistemik bir markır olan 8-oksodeoksiguanosinin (8 oxodG) idrarla atılımını azalttığı saptanmıştır (Cooke ve ark, 2003; Machowetz ve ark, 2007).

Aerobik metabolizmanın yan ürünü olarak ortaya çıkan ve oksidatif stresin ürettiği reaktif oksijen türleri ile ateroskleroz, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar arasında da anlamlı ilişkiler mevcuttur. Goya ve ark (2007) yaptıkları çalışmada insan hepatoma HepG2 hücrelerini, hidroksitirosol ile muamele etmişler ve reaktif oksijen türleri üretiminde bir azalma saptamışlardır. Fenolik bileşiklerin vücuda alındıktan sonra plazmadaki antioksidan aktivitesinin arttığı insanlar üzerinde yapılan bazı çalışmalarda ifade edilmiştir (Salvini ve ark, 2006; Visioli ve ark, 2005).

Metin ve ark (2016) yaptıkları çalışmada oleuropeinin farelerde arsenik kaynaklı oksidatif stresi iyileştirdiğini gözlemlediler. Bu çalışma için farelere günde kg başına 5 mg arsenik verildi ve bir grup oluşturuldu. Aynı zamanda günde kg başına 30 mg oleuropein

verildi ve başka bir grup oluşturuldu. Deneyin sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek karaciğer, böbrek ve beyinleri alındı. Oluşturulan iki grup arasında kan, karaciğer, böbrek ve beyindeki MDA ve nitrik oksit seviyelerine bakıldı. Arsenik verilen farelerin, kanında ve dokularındaki NO seviyesinin düştüğünü, MDA seviyesinin ise yükseldiğini gözlemlemişlerdir. Oleuropein tedavisinin MDA ve NO seviyelerini normalize etmede anlamlı etkileri olduğu kanısına varmışlardır. De La Puerta ve ark (2001) yaptıkları çalışmada oleuropeinin hem nitrik oksiti süpürme yeteneğine sahip olduğu hem de hücrede indüklenebilir nitrik oksit sentez ekspresyonunda bir artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda kontrol grubu ile oleuropein ve kombinasyon tedavi grupları arasında nitrik oksit (NO) parametresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p>0,005$). Vitamin D tedavi grubu, diğer tedavi gruplarına göre NO düzeyini istatistiksel olarak anlamlı arttırmıştır ($p<0,05$).

Literatür incelendiğinde pek çok çalışmadaki sayısız gözlemsel verilere göre klinik çalışmalar zeytinyağındaki fenolik asitler gibi polifenolikler, çayda, çikolatada ve üzümde bulunan flavonoller ve soya ürünlerinde bulunan izoflavonların meme kanseri riskini azalttığını göstermiştir. Buna göre polifenolce zengin akdeniz diyeti ile beslenenlerin meme kanserine yakalanma riskinin azaldığı gözlenmiştir. Tüm bu sebeplerden dolayı kişilerin diyeti çok önem teşkil eder. Meme kanseri hastalarının çay, sebze (soğan, brokoli), meyve (elma, narenciye) içeren flavonol polifenollerce zengin yiyecekleri tüketmeleri önerilir Kalp damar hastalıkları, ateroskleroz, prostat, kolon, meme kanseri gibi hastalıkların Akdeniz toplumlarında daha az görülmesinin nedeni, geleneksel Akdeniz diyeti ile ilişkilendirilmektedir (Braakhuis ve ark, 2016).

D vitamini sadece kalsiyum metabolizmasının devamlılığının sağlanmasında katkıda bulunmaz, aynı zamanda geniş bir yelpazede pek çok farmakolojik önemli etkileri de vardır. D vitamininin antiproliferatif, apoptotik, antioksidan etkisi, bu bileşiğin en yeni önerilen kalselik olmayan rolleri arasındadır. Aynı zamanda D vitamini, doğuştan gelen bağışıklığın düzenlenmesinde de önemli rol oynayan bir steroid hormondur. Bu yüzden D vitamini eksikliği sadece kalsiyum metabolizması ile ilişkilendirilmemelidir (Mokhtari ve ark 2017). Son zamanlarda D vitamininin daha az bilinen etkilerinin araştırıldığı pek çok çalışma bildirilmektedir. Bu çalışmalar sayesinde D vitamininin aktif formu olan kolekalsiferol (vitamin D₃) reseptörü, insan vücudunun birçok doku ve hücresinde tespit edilmiştir. Başta kanser olmak üzere, otoimmün hastalıklar, diabetes mellitus (DM) gibi bazı hastalıklarda D

vitamini düzeyleri arasındaki ilişki hakkında birçok hipotez ortaya konulmuştur (Holick, 2007).

D vitamini kanser ilişkisi ilk olarak 1941 yılında ortaya konulmuştur (Apperly, 1941). Daha sonra 2005 yılında yapılan çalışmada 25OHD₃ düzeyinin yüksekliği özellikle kolon, meme ve prostat kanseri riskini azalttığı ortaya konulmuştur (Giovanucci, 2005). Yapılan son çalışmalar D vitamininin iyi huylu (benin) ve kötü huylu (malin) hücrelerde proliferasyonu azalttığı, apoptozu indüklediğini göstermektedir. DNA hasarı yaratan ajanlar, oksidatif stres, belirli onkogenlerin aktivasyonu, tümör supresör gen inaktivasyonu, mitogenik stimülasyon gibi çeşitli stres koşulları da hücrelerde onkogenik değişikliklere yol açabilmektedir (Kıdır, 2013).

D vitamininin meme kanseri hücreleri üzerine etkilerine ilişkin pek çok in vitro hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Dolayısıyla D vitamininin meme kanserinde koruyucu rolü olması ile ilgili literatürde büyük bir bilgi birikimi oluşmuştur. Buras ve ark (1994) yaptıkları çalışmada vitamin D ve reseptörlerinin MCF-7 meme kanseri hücre hatları üzerine antiproliferatif etkilerini araştırmışlardır. 0,01 nM'dan 1000 nM konsantrasyona kadar geniş doz aralıklarında çalışmışlardır. 1,25(OH)₂D₃'ün 10 nM, 100 nM ve 1000 nM konsantrasyonlarda MCF-7 hücre hatlarının büyümesini anlamlı olarak inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir (p<0.05). Brenner ve ark (1995) yılında yaptıkları çalışmada vitamin D ve analoglarının MCF-7 insan meme kanseri hücre hatlarındaki antiproliferatif etkilerini araştırmışlardır. Buras ve arkadaşlarının 1994 yılında yaptıkları çalışmayı referans alarak 1 nM'dan 1000 nM'a kadar konsantrasyon aralıklarında vitamin D doz aralıklarını kullanmışlardır. Bu doz aralıklarından 10 nM konsantrasyonun, uygulamanın 6. gününde MCF-7 hücre hatlarının büyümesini anlamlı olarak inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir (p<0.05). Campbell ve ark (1996) yaptıkları çalışmada 1,25(OH)₂D₃'ün meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada 100 nM 1,25(OH)₂D₃'ün 48. saatte MCF-7 hücre sayısını anlamlı inhibe ettiğini ve apoptozu indüklediğini gözlemlemişlerdir. Bu bulgular, 1,25(OH)₂D₃'ün antiproliferatif etkisi, apoptozun indüklenmesini aktive ettiğini göstermektedir. Saraçlıgil ve ark (2017) yaptıkları çalışmada D vitamininin MCF-7 meme kanseri hücresi metabolizması üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. D vitamininin MCF-7 meme kanseri hücresinde antiproliferatif etkinliğini gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle gözlemlemişler ve bu verileri kullanarak 48. saatteki IC50 değerini 145 nM olarak bulmuşlardır. Bizim

çalışmamızda da Saraçlıgil ve ark 2017'de yaptıkları çalışma göz önünde bulundurularak 0,98, 1,95, 3,906, 7,8125, 15,62, 31,25, 62,50, 125, 250, 500, 1000 nM'a kadar geniş konsantrasyon aralığında antiproliferatif etkinlik WST-1 testi çalışıldı. Fakat 24, 48 ve 72. saatte de anlamlı bir inhibisyon gözlemlenmedi. Anlamlı bir sonuç çıkmayınca tekrar çalışıldı. Tekrar edilen çalışma, Murray ve ark (2017) yaptıkları çalışma referans alınarak yapıldı. Murray ve ark (2017) yaptıkları çalışmada MCF-7 hücre hattının kalsitriol üzerine etkisi MTT testi ile bakmışlar ve IC50 değerini $1.83 \pm 0.69 \mu\text{M}$ olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da Murray ve ark (2017) yaptıkları çalışma göz önünde bulundurularak 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 μM olarak konsantrasyon aralığı belirlendi. 48. saatte IC50 değeri $2,053 \mu\text{M}$ olarak bulundu. 72. saatteki IC50 değeri ise $4,083 \mu\text{M}$ olarak bulundu. İleride yapılacak olan deney hayvanları ve faz çalışmalarında toksik etkiyi engellemek için tedavi olarak 48. saat seçildi. 48. saatte bulunan IC50 değeri olan $2,053 \mu\text{M}$ dozda apoptozun da indüklendiği gözlemlenmiştir.

Segovia-Mendoza ve ark (2015) yaptıkları çalışmada kalsitriol ve gefitinibin MCF-7 üzerine ayrı ayrı ve birlikte etkisini incelemişlerdir. Kalsitriol ve gefitinib kombinasyonunun güçlü bir sinerjetik etkiye sahip olduğunu, hücre proliferasyonunu daha etkin bir şekilde inhibe ettiğini gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda da oleuropein ve vitamin D için bulunan 48. saatteki IC50 değerlerinin kombine kullanımlarının aynı şekilde apoptozu daha etkin bir şekilde indüklediği ve daha güçlü bir antioksidan etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu da oleuropein ve vitamin D kombinasyonunun güçlü bir sinerjetik bir etkisi olduğunu göstermektedir.

Kanser türlerinin %50'si p53 tümör baskılayıcı genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Bai ve Zhu, 2006). p53'ün amino ucunun delesyonu sonucu elde edilen mutant p53 ($\Delta 133\text{p}53$) ile oluşturulan transgenik farelerin daha agresif tümörler geliştirdiği, daha proliferatif hücrelere sahip olduğu, apoptoz azalırken inflamasyonda daha yatkın olduğu daha kısa ömürlü olduğu saptanmıştır (Slatter ve ark, 2011). Apoptoz, inflamatuvar olmayan bir şekilde çok hücreli organizmalardan gereksiz ya da hasarlı istenmeyen hücreleri ortadan kaldıran doğal bir süreçtir. İn vivo ya da in vitro olarak kemoterapi ya da antikanser ilaçlarıyla etkili kanser tedavisi sıklıkla artan apoptoz markırlarıyla doğrudan ilişkilidir (Call ve ark 2008). MCF-7 hücresi apoptozu kaspaz 3 yolağı üzerinden gitmemektedir (Janicke ve ark 1998). Kaspazların apoptozdaki önemli görevleri düşünüldüğünde eksiklikleri ya da mutasyon ve/veya modifikasyonlarının apoptozu dirençte ve karsinogenezde rol alacağı

düşünülmüş ve yapılan çalışmalar da bu varsayımı doğrulamıştır. Ancak insanlarda görülen tümörlerde kaspaz mutasyonlarının görülme sıklığı diğer sebeplere kıyasla daha düşüktür (Fulda, 2009). Kolorektal kanserin özellikle ikinci fazında sıklıkla kaspaz-9'un azaldığı görülmüş ve bu durum klinik durumla ilişkilendirilmiştir (Shen ve ark, 2010). Yine başka bir çalışmada, meme, yumurtalık ve servikal kanserlerde kaspaz-3 mRNA seviyelerinin çok düşük ya da belirlenemez olduğu saptanmıştır (Devarajan ve ark, 2002). Nöroblastomada kaspaz-8 delesyonları tespit edilmiştir (Fulda, 2009).

Ooi ve ark (2008) yaptıkları çalışmada *in vitro* olarak MCF-7 hücrelerinde, 1,25(OH)₂D₃ dozunun uygulanması hücre proliferasyonunu ve inhibe ederek apoptozu arttırdığını gözlemlemişlerdir. Yine Veldhuis ve ark (2011) yaptıkları *in vitro* çalışmada insan östrojen reseptörü-pozitif meme kanser hücrelerinde (MCF-7) apoptozun proliferasyona (A/P) oranı belirlenerek 1,25(OH)₂D₃ düzeylerinin *in vitro* MCF-7 meme kanseri hücrelerinde artan A/P oranına bağlı olduğunu ifade etmişlerdir. D vitamininin hiperkalsemik yan etkilerini bertaraf etmek için D vitamini analoglarıyla yapılan apoptoz çalışmalarında birisi de Chiang ve ark (2013) yaptıkları çalışmadır. Bu çalışmada MCF-7 hücreleri D vitamini ve bir D vitamini analogu olan MART-10 ile muamele edilmiş ve BAX/BCL-2 oranının MART-10 grubunda daha fazla olmak üzere her iki grupta da artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Yine Campbell ve ark (1997) yaptıkları çalışmada MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında 1,25(OH)₂D₃'ün ve EB1089'un karşılaştırmalı hücre döngüsü kinetiklerine ve apoptotik etkilerini araştırmışlardır. MCF-7 hücre hattını 1,25(OH)₂D₃'e maruz bıraktıklarında 48. saatte apoptozun indüklendiğini gözlemlemişlerdir. Bu bulgular ışığında, 1,25(OH)₂D₃'ün antiproliferatif etkisi, buna paralel olarak apoptozun indüklenmesini aktive ettiğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda da oleuropein ve D vitamininin tek tek ve kombine kullanımının MCF-7 hücre hattına uygulandığında kontrol grubuyla kıyaslandığında 48. saatte apoptozun anlamlı seviyede indüklendiğini gözlemledik. Bizim çalışmamızda apoptoz değerlendirmesi anneksin V ve kaspaz 3/7 testi ile yapılmıştır. Anneksin V sonuçlarına göre; oleuropein tedavisi, diğer tedavi gruplarına göre erken apoptoz gelişimini anlamlı derecede arttırmıştır. Kombinasyon tedavisi, diğer tedavi gruplarına göre geç apoptoz gelişimini anlamlı derecede arttırmıştır. Ayrıca kombinasyon tedavisi, diğer tedavi gruplarına göre total apoptoz gelişimini de anlamlı derecede arttırmıştır. Kaspaz 3/7 sonuçlarına göre; oleuropein tedavisi, diğer tedavi gruplarına göre erken apoptoz gelişimini anlamlı derecede arttırmıştır. Kombinasyon

tedavisi, diğer tedavi gruplarına göre geç apoptoz gelişimini anlamlı derecede arttırmıştır. Yine kombinasyon tedavisi, diğer tedavi gruplarına göre total apoptoz gelişimini anlamlı derecede arttırmıştır. Tüm bu sonuçlardan anlaşılacağı gibi, oleuropein, vitamin D'ye göre anlamlı derecede erken apoptozu indüklemiştir. Oleuropein ve D vitamininin kombine kullanımının tedavisi hem geç hem de total apoptozu oleuropein ve vitamin D'nin tek başına etkisinden anlamlı derecede daha fazla indüklemiştir. Buradan kombinasyon grubunun geç apoptoz ve total apoptoz gelişiminde sinerjetik etkisi olduğunu söyleyebiliriz. MCF-7, kaspaz 3/7 üzerinden apoptozu gitmemesine rağmen kombinasyon tedavisi kaspaz yollarını aktive ederek apoptozu güçlü bir şekilde indüklemiştir. Bu apoptoz artışı, proliferasyonun inhibisyonunu açıklamaktadır. Sonuç olarak hem oleuropeinin hem de D vitamininin meme kanseri hücreleri için proapoptotik etkisi olduğunu söyleyebiliriz.

Ayrıca D vitamininin meme kanseri hücreleri üzerine etkilerine ilişkin pek çok retrospektif çalışma da mevcuttur. Sharif ve ark (2014) yılında yaptıkları çalışmada meme kanseri hastalarının tanısı anında ve dokuz yıllık kontrol süreci esnasında 25-hidroksivitamin D seviyelerine ilişkin istatistiksel analiz gerçekleştirdi. Çalışmada hastalığın seyri iyiye giden hastalarda, milimetre başına 30 nanogram (ng/ml) 25-hidroksivitamin D ortalama değeri saptandı. Hastalığın seyri değişmeyen grupta ise, ortalama değer 17 nanogram (ng/ml) olarak saptandı. Buna göre konvansiyonel kanser tedavisine adjuvan olarak D vitamini eklemeye dair çıkarımlara sahip olabiliriz. Meme kanseri hastalarının standart tedavisine şimdiden D vitamini takviyelerinin ve ardından hastayı yakından takip edip hastalığın seyrinin nasıl gelişeceğine bakılması düşünülmektedir. Elde edilen verilere dayanarak meme kanseri olan hastalarda D vitamini takviyesinin sağ kalımı iki kat arttırdığını söyleyebiliriz. D vitamini metabolitleri agresif hücre bölünmesini bloke eden bir proteini devreye sokarak hücreler arasındaki iletişimi artırır. Vücudumuzda D vitamini reseptörleri bulunduğu sürece tümör büyümesi önlenir ve kan akışına yayılması engellenir. D vitamini reseptörleri bir tümör ilerleyene kadar kaybolmaz. Kandaki D vitamini düzeyleri yüksek olan hastalardaki daha iyi sağ kalımın sebebi bu olduğu söylenebilir.

Yine Noureen ve ark (2017) yılında vitamin D eksikliği ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla bir çalışma yapmıştır. Çalışmada yaşları 20-75 arasında olan kontrol grubu ve yeni teşhis konulan hasta grubu belirlenmiştir. 25-OH-D₃ seviyeleri ELIZA yöntemi ile ölçülmüş ve ng/ml olarak kaydedilmiştir. 20 ng/ml'nin altındaki serum değerleri vitamin D eksikliği olarak değerlendirildi. Vitamin D seviyesi kontrol grubu ile

kıyaslandığında hasta grubunda anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0,003$). Engel ve ark (2010) yaptıkları çalışmada meme kanseri riskinin azalmasının yüksek 25(OH)D₃ konsantrasyonu ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Özellikle yaşın doğrudan etkisini doğrulayamamış olmalarına rağmen menapoz öncesi kadınlarda meme kanseri riskinin azaldığını gözlemlemişlerdir. Fakat bu azalma anlamlı değildir. Peizhan ve ark (2013) yaptıkları meta analiz çalışmasında yüksek seviyede 25(OH)D₃'ün meme kanseri riskini azaltıp azaltmadığını araştırmışlardır. Şanghai'da yapılan çalışmaya yaşları 30-87 arasında olan yeni teşhis konmuş 593 meme kanserli olgu ile yaşları 25-85 arasında olan 580 kontrol grubu dahil edilmiştir. 25(OH)D₃ plazma seviyeleri radioimmunoassay kitlerle ölçüldü. Toplamda 25(OH)D₃ seviyesi normal bayanlarda 15,67 ng/ml iken meme kanserli hastalarda 11,31 ng/ml olarak ölçülmüştür. Kontrol hastaları arasında %80 (<20ng/ml) ciddi 25(OH)D₃ yetersizliği, %15,2 (20-30ng/ml) 25(OH)D₃ yetersizliği, sadece %4,8'inde (>30ng/ml) yeterli 25(OH)D₃ ölçülmüştür. Bununla beraber meme kanserli hastalarda %96,1 (<20ng/ml) ciddi 25(OH)D₃ yetersizliği, %3,2 (20-30ng/ml) 25(OH)D₃ yetersizliği ve sadece %0,7'sinde (>30ng/ml) yeterli 25(OH)D₃ ölçülmüştür. Normal bayanlarda 25(OH)D₃ seviyeleri mevsimsel olarak da değişmektedir. En yüksek seviye (17,76 ng/ml) yazın, en düşük seviye ise kışın (10,75 ng/ml) olarak ölçülmüştür. Meme kanserli hastalarda ise, en yüksek seviye (14,38 ng/ml) sonbaharda, en düşük seviye ise (10,16 ng/ml) sonbaharda ölçülmüştür. Ayrıca yazın 11,24 ng/ml ve kışın da 11,27 ng/ml olarak ölçüldü. Mevsimsel 25(OH)D₃ seviyeleri kış mevsimini hariç tutarsak anlamlı olarak meme kanserli hastalarda daha düşük bulunmuştur. Tüm bu değerler, anlamlı olarak 25(OH)D₃ seviyesi ile meme kanseri arasında ters bir ilişki olduğunu göstermektedir. Katie ve ark (2017) yaptıkları çalışmada 25-hidroksivitamin D takviyesinin meme kanseri üzerine etkisini araştırmışlardır. Vitamin D takviyesinin meme kanseri riskini azaltmasıyla ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Buldukları sonuçlar, vitamin D takviyesinin meme kanserinde koruyucu etkiye sahip olduğu hipotezini desteklemektedir. Klinikte rutin yararlanım için de referans bir çalışma olarak düşünülebilir. Bir diğer çalışmada araştırmacılar, tanıdan önce 25(OH)D₃ seviyeleri ile meme kanserinin farklı alt tipleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. 25(OH)D₃ seviyeleri düşük olan bayanların meme tümörlerinin oluşum riski daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir (Shirazi ve ark, 2016). 25-hidroksivitamin D seviyesinin meme kanseri etiolojisinde önemli rol oynadığı artık bilinmektedir. Rainville (2009) yaptıkları çalışmada üçlü negatif meme kanseri fenotipleri ortalama en düşük vitamin D seviyesinde ve hastaların en yüksek yüzdesi vitamin D eksikliği olanlarda görülmüştür. Bu veriler ışığında

düşük vitamin D seviyeleri, üçlü negatif fenotipin karakteristik yapısı olarak düşünülebilir. Neuhouser ve ark (2008) yaptıkları çalışmada meme kanseri teşhisi konmuş hastaların vitamin D seviyesi ile ilişkisini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucuna göre, meme kanseri olup hayatta olan hastaların D vitamininin yetersizliğinin yaygınlığı fazladır. Tüm bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre; klinisyenlerin, meme kanserli hastaları tedavi ederken vitamin D seviyelerini de göz önünde bulundurmaları önem taşımaktadır. Yousef ve ark (2013) yaptıkları çalışmada Suudi Arabistanlı kadınlarda 25-hidroksivitamin D ile meme kanseri riskinin ilişkisi olup olmadığını değerlendirilmiştir. 120 meme kanserli ve kontrol grubu arasında yapılan çalışmada, serum 25(OH)D₃ seviyesinin meme kanseri olan hastalarda anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Yani 25(OH)D₃ ile meme kanseri riski arasında ters ilişkinin olduğu saptanmıştır. Jamshidinaini ve ark (2016) yaptıkları çalışmada İranlı kadınların vitamin D alımının meme kanseri riskine nasıl etkileyeceğini araştırmışlardır. Fazla 25(OH)D₃ alımının meme kanseri riskini azaltıcı yönde etkisini desteklediğini gözlemlemişlerdir. Tüm bu çalışmalar, diyetle alınan vitamin D'nin meme kanseri riskini azaltıcı yönde etki ettiğini göstermektedir.

D vitamini eksikliği geniş bir yelpazede bakacak olursak tip 1 diyabet gibi otoimmün hastalıklar, insülin direnci ve tip 2 diyabet gibi kronik hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, kronik böbrek hastalığı ve kanser gibi pek çok önemli hastalıkla ilişkilendirilebilir (Wang ve ark, 2008; Ravani ve ark 2009; Small ve ark 2012; Forouhi ve ark 2008; Gradinaru ve ark 2012). Aynı zamanda kolesterol ile homolog bir yapıya sahip olan D vitamini bir antioksidan olarak kabul edilebilir. Sardar ve ark (1996) sıçanlarda yaptıkları çalışmada, D vitamininin antioksidan etkilerini vitamin E'ye benzer, hatta daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Son yıllarda yapılan çalışmalar da bu bulguyu destekler niteliktedir. Özellikle diabetes mellitus, azalmış antioksidan kapasitesi, ROS (lipid, protein ve DNA oksidasyon ürünleri) ürünlerinin artışı ile doğrudan ilişkilidir. D vitamini, glutatyon, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz dahil olmak üzere antioksidan savunma sistemine dahil olan birkaç molekülün ekspresyonunu indükler ve NADPH oksidaz ekspresyonunu baskılar. NADPH oksidaz, ROS'un ana kaynağı ve oksidatif stresin aktivasyonu için pozitif bir markerdir (Mokhtari ve ark, 2017). Bizim çalışmamızda da vitamin D tedavisi, SOD aktivitesini anlamlı seviyede arttırmıştır. Farelerde yapılan çalışmada Vitamin D₃'ün lipid peroksidasyonunu azalttığı ve SOD aktivitesini arttırdığı gözlemlenmiştir. SOD, hücrel antioksidan savunmanın başlangıç çizgisidir. Oksijen

kullanımının yüksek olduğu dokularda aktivitesi fazla olmasına rağmen hücre dışı alanda oldukça düşük aktiviteye sahiptir. SOD enzimi yapısında bulunan metal iyonlarına göre farklı şekilde isimlendirilebilir. Hücredeki dağılım yerlerine, aktif metal kısımlarına ve aminoasit dizilimlerine göre farklılık göstererek prokaryotlarda Mn-SOD ve Fe-SOD, ökaryotlarda ise Mn-SOD, CuZn-SOD ve ECSOD formlarında bulunur. Metal iyonlarına göre farklı isimlendirilen SOD'un her formu temelde süperoksit radikalinin moleküler oksijene ve hidrojen peroksida dönüşümünü kataliz eder ve hücresel kısımlarda süperoksit düzeyinin kontrolünde önemli rol oynar (Zong ve ark, 2014; Hamden ve ark 2008). Pek çok klinik çalışma, D vitamini ve kalsiyum takviyelerinin kombinasyonunun plazmada MDA azalmasına ve plazma total antioksidan kapasitesinde anlamlı bir artış gösterdiğini göstermiştir (Foroozanfard ve ark 2015). Sonuç olarak, D vitamininin yapılan in vitro ve retrospektif çalışmalarda kanser, otoimmün gibi pek çok hastalıkta anlamlı etkisi olmasına rağmen, henüz günümüzde D vitamini eksikliğinin taranma ve tedavisi ile ilgili bir guideline bulunmamaktadır. Dolayısıyla hangi hastaya, hangi risk faktörleri varlığında ve hangi dozda D vitamini desteği önerilmesi gerektiği konusu belirsizdir (Pil ve ark, 2011).

Meme kanserinin mekanizmalarından birisi de patogenezinde önemli rol oynayan oksidatif strestir. Oksitleyicilerin artmış üretimi ve/veya etkili olmayan atılımı doku hasarında çok önemli rol oynayabilir. Oksidatif stres, intraselüler sinyal transdüksiyon sinyallerini ve transkripsiyon faktörlerini direkt etkileyerek hücelerin hasar görmesine neden olur, gen mutasyonunu indükler. Bu sebeplerden dolayı karsinogenezde önemli rol oynar (Noda ve Wakasugi 2001). Antioksidanlar, kanserden korunmak veya etkilerini azaltmak için yaygın kullanılmaktadır. Oksidan/antioksidan denge kanserin başlangıcı ve ilerlemesi açısından önemli bir faktör olarak gösterilmiştir. Diğer taraftan; sayısı artan çalışmalarla, kontrolsüz ve gözetimsiz antioksidan kullanımının kanserin yayılmasını hızlandırıyor olabileceği üzerinde durulmaktadır. Çok kademeli karsinogenezin hem başlamasında hem artmasında ROS'u işaret eden güçlü bulgular vardır. Hidrojen peroksitin kanserin başlaması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Çiftçi 2017). ROS'un detoksifikasyonu için antioksidan enzimler veya enzimatik olmayan moleküller devreye girer. Antioksidan enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GRx)'dir. Antioksidanlar sayesinde ROS'un vereceği olası hasarlar engelleneceği gibi oluşan hasarın onarılması da sağlanabilir. Böylece immün sistem savunması artırılıp ve böylece kanser gibi hastalıkları engellemek mümkün hale gelebilir (Pham-Huy ve ark 2008).

Yapılan çalışmada meme karsinoma tanısı almış hastaların serumlarında malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), kırmızı kan hücreleri süperoksit dismutaz aktivitesi (RBC-SOD), nitrik oksit sentaz (NOS), glutatyon (GSH), vitamin A, C, E, bakır (Cu), çinko (Zn), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) seviyelerine bakılmıştır. Sağlıklı kontrol grubu ile kıyaslandığında MDA, NO ve RBC-SOD seviyeleri anlamlı olarak yüksek bulundu. Bununla beraber GSH, vitamin A, C, E, bakır ve çinko aktiviteleri, GPx ve katalaz seviyeleri anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Serumda daha yüksek MDA seviyesine sahip olan hastalar, serumda antioksidanların eksikliğini göstermiştir. Bu sebeple meme kanseri hastalarının antioksidan ve oksidan seviyelerini dengelemek için besleyici takviyeleri almaları önerilir (Hussain ve Ashafaq 2018).

Omar ve ark (2011) yaptıkları çalışmada kemoterapi gören meme kanseri olan hastalarda total antioksidan kapasiteye, ürikasit, MDA, nitrik oksit (nitrit/nitrat), Cu^{2+} ve Fe^{2+} seviyelerine bakmışlardır. Sağlıklı kontrol grubu ile kıyaslandığında meme kanseri olan hastalarda total antioksidan kapasite (TAS) (%32,7-%37,5), ürik asit (%28,1-%49,2), MDA (%20,7-%25,2) ve nitrik oksit (%50,4-%60,9) anlamlı seviyede düşüş gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Cu^{2+} ve Fe^{2+} seviyeleri de sağlıklı kontrol gruplarına göre anlamlı seviyede azaldığını gözlemlemişlerdir. Feng ve ark (2012) yaptıkları çalışmada meme kanseri teşhisi almış hastalarda total antioksidan seviye (TAS), total oksidan seviye (TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ), ve Cu, Zn, Fe, Se, Mg ve Mn seviyelerine bakmışlardır. Zn hariç tüm eser elementler benzer seviyelerde bulunmuştur. Sağlıklı kontrol grubu ile kıyaslandığında TAS seviyesi düşük bulunmuştur. OSİ değeri yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar eser elementlerin seviyelerinden daha çok TAS, TOS ve OSİ değerlerinin meme kanserinin klinik durumunu izlemek için yararlı biyobelirteçler olabileceğini göstermektedir. Bu biyobelirteçler, meme kanserinin patogenezinin aydınlatılmasında da katkı sağlayabilir (Feng ve ark 2012). Wu ve ark (2017) yaptıkları çalışmada da kolorektal kanser teşhisi almış hastaların TAS, TOS ve OSİ değerlerine bakıldığında, TOS ve OSİ değerlerinin anlamlı derecede yüksek ($p<0,01$), TAS değerinin ise anlamlı derece düşük olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,01$). Şener ve ark (2007) yaptıkları çalışmada meme kanseri teşhisi almış hastaların serumlarında total antioksidan seviye (TAS) seviyelerini kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede düşük seviyede bulmuşlardır (2.01 ± 0.01 mmol/l ve 2.07 ± 0.03 mmol/l, $p<0.05$). MDA seviyelerini ise anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır (3.64 ± 0.25 mM ve 2.72 ± 0.22 mM, $p<0.05$). Yine Gönenç ve ark (2001) yaptıkları

çalışmada meme ve akciğer kanseri teşhisi almış hastaların serumlarında lipid peroksidasyon markırı olan MDA seviyelerini sağlıklı kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır ($p<0,001$). Ortalama MDA seviyeleri meme kanseri teşhisi almış hastalarda 6,33 $\mu\text{mol/l}$ iken akciğer kanseri teşhisi almış hastalarda 5,87 $\mu\text{mol/l}$ olarak bulunmuştur. Torun ve ark (1995) yaptıkları çalışmada da buna benzer şekilde meme kanseri teşhisi almış hastaların serumlarında lipid peroksidasyon markırı olan MDA seviyelerini sağlıklı kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır ($p<0,005$). Ortalama MDA seviyeleri meme kanseri teşhisi almış hastalarda 6,82 $\mu\text{mol/l}$ iken sağlıklı kontrol gruplarının MDA seviyeleri 3,65 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda MCF-7 hücre hattı üzerine oleuropein, vitamin D ve oleuropein-vitamin D kombinasyonunun IC50 dozları verildiğinde TOS, TAS, SOD, GPx, MDA ve NO seviyelerine bakılmıştır.

TOS analizlerine bakacak olursak; oleuropein tedavisi, vitamin D tedavisine göre TOS'u anlamlı ölçüde düşürmüştür. Kombinasyon tedavisi de TOS'u oleuropein tedavisine göre anlamlı ölçüde düşürmüştür. Kombinasyon tedavisi, TOS'u vitamin D tedavisine göre de anlamlı ölçüde düşürmüştür. Bu sonuçlar, kombinasyon tedavisinin güçlü bir sinerjetik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

TAS sonuçlarına bakacak olursak; kontrol grubu ile vitamin D ve kombinasyon tedavisi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubu ile oleuropein tedavisi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p>0,05$).

Total oksidan seviyesinin total antioksidan seviyesine bölünmesiyle bulunan oksidatif stres indeksi hesaplanmıştır. Oleuropein tedavisi, vitamin D tedavisine göre OSI'yi anlamlı ölçüde düşürmüştür. Ayrıca, kombinasyon tedavisi OSI'yi oleuropein tedavisine göre anlamlı ölçüde düşürmüştür. Kombinasyon tedavisi, OSI'yi vitamin D tedavisine göre de anlamlı ölçüde düşürmüştür ($p<0,05$). Yapılan pek çok çalışmaya paralel olarak oleuropein ve vitamin D, meme kanseri hücre hattında bir antioksidan etki göstererek OSI'yi düşürmüştür. Ayrıca oleuropein ve D vitamininin kombine tedavisi, tek tek etkisinden daha etkili olmuştur. Buradan kombinasyon tedavisinin antioksidan etkisinin sinerjetik bir etkisi olduğunu söyleyebiliriz. Yapılan pek çok çalışmada TAS, TOS seviyelerinin yanı sıra eser element seviyelerine de bakılmıştır. Fakat araştırmacılar, eser elementlerin seviyelerinden daha çok TAS, TOS ve OSI değerlerinin meme kanserinin

klirik durumunu izlemek için daha yararlı biyobelirteçler olabileceği ve dolayısıyla bu biyobelirteçlerin meme kanserinin patogenezinin aydınlatılmasına da katkı sağlayabileceği kanısındadırlar (Feng ve ark 2012).

SOD aktivite sonuçlarına bakacak olursak; kontrol grubu ile oleuropein, vitamin D ve kombinasyon tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$). Oleuropein tedavi grubu ile vitamin D ve kombinasyon tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$). Oleuropein tedavisi tek başına hücrede SOD aktivitesini azaltmıştır. Vitamin D tedavisi ise SOD aktivitesini anlamlı ölçüde artırmıştır ($p<0,05$). Kombinasyon tedavisi ise vitamin D tedavi grubunun etkisini azaltmıştır. Oleuropeinin güçlü antioksidan etkisi olmasına rağmen hücrede oleuropein tedavisi SOD miktarını azaltmıştır. Yapılan çalışmalarda bazı kanser tedavilerinde SOD artış gösterebilmektedir. SOD, hücresel antioksidan savunmanın başlangıç çizgisidir. İlk olarak SOD, sonra GPx aktive olur. SOD enizimi yapısında bulunan metal iyonlarına göre prokaryotlarda Mn-SOD ve Fe-SOD; ökaryotlarda ise Mn-SOD, CuZn-SOD ve ECSOD formlarında bulunur. Bizim çalışmada total SOD aktivitesine bakıldı. Tüm bu formların mekanizmaları farklıdır. Hücreye oleuropeinin etkisi bu formlardan biri üzerinden olabilir, ya da oleuropeinin antioksidan etkisi SOD üzerinden değil de GPx üzerinden olabileceğini düşündürmektedir. D vitamini, glutatyon, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz dahil olmak üzere antioksidan savunma sistemine dahil olan birkaç molekülün ekspresyonunu indükler ve NADPH oksidaz ekspresyonunu baskılar (Mokhtari ve ark, 2017). Buna paralel olarak D vitamini tedavisi, SOD aktivitesini anlamlı ölçüde artırmıştır ($p<0,05$). Yapılan bir çalışmada $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün prostat epitel hücreleri ve LNCaP hücrelerinde SOD aktivitesini indüklediği saptanmıştır (Pehl ve ark, 2004; Lambert ve ark, 2006). Bu çalışma, bizim bulgumuzu teyit etmektedir.

GPx sonuçlarına bakacak olursak; oleuropein tedavisi, vitamin D ve kombinasyon tedavisine göre GPx'i anlamlı ölçüde artırmıştır. Vitamin D tedavisi ile kombinasyon tedavisi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p>0,05$). Buradan anlaşılacağı gibi, sadece oleuropein tedavisinin GPx'i arttırdığı gözlemlenmiştir. Kombinasyon tedavisi ise hücrede GPx aktivitesini bir şekilde anlamlı ölçüde düşürmüştür ($p<0,05$). Bu sonuca göre oleuropeinin, hücrede oluşan oksidatif strese karşı oluşan antioksidan savunma sistemi nedeniyle meme kanseri hücre hattı üzerinde güçlü bir antioksidan etki gösterdiğini, kombinasyon tedavisinin ise güçlü bir sinerjetik antioksidan etki göstermesi sebebiyle

meme kanseri hücre hattı strese girmeden aniden apoptoza (ölüme) götürdüğünü, bu sebeple hücrelerde GPx aktivitesinin azaldığını söyleyebiliriz.

MDA sonuçlarına bakacak olursak; oleuropein ve vitamin D tedavilerinin kontrol grubuna göre MDA miktarını arttırdığı gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Ancak, kontrol grubu ile kombinasyon tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Hücre, oleuropein ve vitamin D tedavisini aldıktan sonra oksidatif strese girip apoptoza uğrarken (ölürken) lipid peroksidasyonunu ciddi oranda arttırmış olabilir. Dolayısıyla hücre, strese girerken MDA'yı da arttırmış olabileceği düşüncesindeyiz.

NO sonuçlarına bakacak olursak; kontrol grubu ile oleuropein ve kombinasyon tedavi grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Fakat vitamin D tedavisi ile diğer tedavi grupları arasında oldukça anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,005$). Vitamin D tedavisinin total NO miktarını anlamlı seviyede arttırdığı saptanmıştır. Kanserli hücrelerde düşük NO, tümör büyümesini desteklerken, yüksek NO seviyesi ise sitotoksik bir etkiye sahip olabilir (Pance 2006). MCF-7 hücre hattına vitamin D tedavisi verildiğinde NO seviyesinin yüksek çıkması, vitamin D tedavisinin MCF-7 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermesi ile açıklanabilir. NO aynı zamanda hücrede hormon benzeri görev almaktadır. Hücrede c-AMP'yi uyarır. Böylece apoptoz tetiklenmiş olur (Xu ve ark 2002). Kemopreventif ajanlar, NO üretimini indükler, böylece apoptozu kolaylaştırır. Bu yüzden yakın gelecekte NO, kanser terapötikleri için kullanılma potansiyeli olabilecek bir özellik göstermektedir (Vahora ve ark, 2016).

Endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak da bilinen NO (nitrik oksit) eşleşmemiş bir elektron taşıyan yüksüz bir molekül olarak tanımlanır. NO, bu özelliği sayesinde eşsiz bir mesajcı olarak görev yapar. Yani yüksüz olduğu için membranlardan rahatça geçebilir. Eşleşmemiş bir elektrona sahip olmasından dolayı ile çok hızlı reaksiyona girer. Yarı ömrü 20-30 saniyedir. NO'nun sentezlenmesinde nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini görev alır. Memelilerde NO sentezleyen üç değişik NOS vardır. NO sentezi ile ilgili ilk bilgiler inflamatuvar hücreler (makrofaj vb.) üzerinde yapılan gözlemlerle elde edilmiştir (Akçakoyun 2004). Yapılan çalışmalarda NO'nun kanser ve tümör büyüme progresyonu ile doğrudan ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte kanserdeki rolünün anlaşılmasında önemli tartışmalar ve karışıklıklar vardır.

NO (Nitrik oksit) normalde DNA hasarını destekler ve mutasyona sebep olur. Direkt kaspaz aktivitesini inhibe eder, sitokrom c salınımını inhibe eder, BCL-2 ekspresyonunu artırır, siklojenaz aktivasyonunu gerçekleştirir. Dolayısıyla apoptozu geciktirir (Xu ve ark 2002). Fakat zamanlaması, yeri ve konsantrasyonuna bağlı olarak hem tümör öldürücü hem de tümör teşvik edici etkilere de sahip olduğu söylenmektedir. Anjiyogenez, apoptoz, hücre döngüsü, invazyon ve metastaz dahil pek çok olayın ayarlanmasında görev almaktadır. Başka bir deyişle potansiyel antionkojenik bir ajan olarak düşünülebilir. Thomsen ve ark (1995) yaptıkları çalışmada benign ya da normal meme dokusu ile karşılaştırıldığında meme kanseri teşhisi almış hastaların kanında NO miktarlarında artış ve yüksek NOS aktivitesi gözlemlenmiştir. Tüm bu bulgular NO biyosentezi ve malignite derecesi arasındaki pozitif korelasyonu açıklamaktadır. Diğer kanser türlerinden farklı olarak, memenin tümörleri steroid hormonlarından büyük ölçüde etkilenmektedir. NO konsantrasyon fazlalığı DNA hasarı oluşturabilir. Bu mutasyonlara ve sonuçlara neden olabilir. Güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olan oleuropein NO miktarını kontrol grubuna göre azaltmıştır, fakat bu azalma anlamlı değildir. NO, üretilen hücre tipine ve konsantrasyonlarına bağlı olarak kanserde ikili bir rol oynar. Kanserli hücrelerde düşük NO konsantrasyonları tümör büyümesini destekleyebilirken, yüksek konsantrasyonda NO sitotoksik bir etkiye sahiptir (Pance 2006). Yüksek dozlarda NO'nun kanser terapötüğünde bir rolü olduğu açıktır. Geleneksel tedavilere ek olarak tümör hücresi direncinin üstesinden gelmek için NO kullanılabilir (Huerta 2015). Bizim çalışmamızda vitamin D tedavisinin kontrol grubu ile kıyaslandığında NO'yu anlamlı derecede arttırdığı gözlemlenmiştir. Vitamin D'nin MCF-7 hücre hattı üzerinde güçlü bir antiproliferatif etkisinin olması, bu anlamlı yükselişi açıklamaktadır.

Yapılan çalışmalar dikkate alındığında konunun güncel ve üzerinde yoğunlaşmış olduğu ve her geçen gün yeni çalışmaların eklendiği görülmektedir. Yoğun bir literatür bilgisine ulaşılmaktadır. Dolayısıyla bu çalışma konusunun multidisipliner bir çalışma olup umut vaat eden yeni araştırma konularına vesile olacak orijinal bir araştırma olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada gösterilen sonuçlar bize oleuropein ve D vitamininin antiproliferatif, apoptotik ve antioksidan etkilerinin olduğunu, aynı zamanda oleuropein ve D vitamininin kombine kullanımının güçlü bir sinerjetik etkisi olduğunu göstermektedir. Bu da meme kanserine karşı alternatif bir tedavi için yeni bir bakış açısı oluşturmuştur.

Özellikle oleuropein ve D vitamini için bulunan IC50 değerleri, ileride yapılacak daha kapsamlı deney hayvanları veya faz çalışmalarına da da ışık tutacağı kanaatindeyiz.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızdan elde edilen sonuçları özetleyecek olursak;

1. Meme kanseri hücre hatlarında (MCF-7) oleuropein ve D vitamininin farklı konsantrasyonları uygulanarak doza bağlı bir korelasyon olup olmadığı gözlemlenmiştir. Oleuropein ve D vitamininin dozlarına bağlı MCF-7 hücre canlılığında istatistiksel açıdan belirgin bir farklanma olup olmadığı değerlendirilmiştir. WST-1 testiyle sitotoksosite analizleri yapılarak en etkili oleuropein ve vitamin D dozu belirlenmiştir. Oleuropein 24. saatteki baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değerinin 256,1 μM , 48. saatteki konsantrasyon (IC50) değerinin 247,5 μM , 72. saatteki konsantrasyon (IC50) değerinin ise 222,5 μM olduğu tespit edilmiştir. D vitamininin 24. saatinde anlamlı bir inhibisyon gözlemlenmemiştir. 48. saatteki baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değerinin 2,053 μM , 72. saatteki baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değerinin ise 4,083 μM olduğu tespit edilmiştir.
2. MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine uygulanan oleuropein ve D vitamininin hücreyi apoptoza götürüp götürmediği anneksin V ve kaspaz-3/7 kitleriyle Muse[®] cell analyzer cihazında değerlendirilmiştir. Hem daha önce yapılmış çalışmalar dikkate alınarak, hem de ileride yapılacak olan deney hayvanları ve faz çalışmalarında toksik etkiyi engellemek için 48. saatteki IC50 değerleri dikkate alınmıştır. Oleuropein ve D vitamininin 48. saatteki IC50 değerlerinin apoptozu anlamlı derecede indüklediği gözlemlenmiştir. Kombinasyon tedavisinin apoptozu indüklemeye güçlü bir sinerjetik etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir.
3. MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine uygulanan oleuropein ve D vitamininin ayrı ayrı ve kombinasyon olarak total oksidan ve antioksidan seviyelerinde değişikliğe neden olup olmadığı değerlendirilmiştir. Böylece total oksidan seviyesinin total antioksidan seviyesine bölünmesiyle bulunan oksidatif stres indeksi hesaplanmıştır. Aynı zamanda SOD ve GPx enzim aktiviteleri, MDA ve NO seviyeleri değerlendirilmiştir. Oleuropein ve D vitamini tedavisinin MCF-7 hücre hattı üzerinde antioksidan etki gösterdiği, kombinasyon tedavisinin de güçlü bir sinerjetik etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

4. Literatür bilgilerine göre; terapötik bir ajan olarak düşündüğümüzde doğal antimikrobiyal maddeler arasında gösterilen oleuropeinin, aynı zamanda bağışıklık sistemi güçlendirici, serbest radikallere ve kansere karşı aktivite gösteren fenolik bir antioksidan olduğu bilinmektedir. D vitamininin de farklı konsantrasyonlarının proliferasyonu azaltarak ve apoptozu indükleyerek tümör supresör gen inaktivasyonuna gerçekleştirdiği bilinmektedir. Ayrıca D vitamininin apoptozu tetiklemesi, meme kanseri başta olmak üzere tüm kanser tedavilerinde değerlendirilebileceği, yapılan pek çok çalışmadan bilinmektedir. Buna bağlı olarak, oleuropein ve D vitamininin farklı konsantrasyonları ile MCF-7 hücre canlılığı arasında istatistiksel bir korelasyon yakalamayı umarak bu çalışmayı gerçekleştirdik. Nitekim elde edilen bulgulara göre hem oleuropeinin hem de D vitamininin anlamlı derecede antiproliferatif, apoptotik ve ROS düşürücü antioksidan etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca oleuropein ve D vitamininin kombine kullanımının güçlü bir sinerjetik etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir.
5. Çalışmadan elde edilen bulguların değerlendirilmesiyle anlamlı sonuçların elde edilmesi, kanser tedavisinde yeni açılımların, yeni ilaçların ve tedavi ajanlarının geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Kanser hastalarının tedavi sürecinde ilaçların yarattığı yan etkiler düşünüldüğünde, özellikle antioksidan etki gösteren yeni ilaçların ve ilaç kombinasyonlarının geliştirilmesi ve bu ilaçların rutinde kullanılabilmesi önem teşkil etmektedir.

Çalışmamızdan elde edilebilecek çıkarımları özetlediğimizde ise;

Kanser hastalığının tedavisi için dünyada pek çok araştırma yapılmakta, alternatif tedavi yöntemleri ve yeni ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Dolayısıyla günümüzün en popüler çalışma alanlarından birisidir. Hâli hazırda kullanılan kemoterapötiklerin hedef organ ve doku dışında da pek çok organı da kötü yönde etkilediği ve hücrede serbest radikallerin artmasına neden olduğu için, buna paralel olarak hedef hücrelerde daha fazla DNA hasarı ve mutasyona sebep olmaktadır. Bu açıdan baktığımızda antikanserojenik ve antioksidan özellik taşıyan maddelerin farmakolojik ajanlar ile kombine kullanımının önemi ortaya çıkmaktadır.

Literatürde yapılmış in vitro çalışmalara benzer sonuçlar aldığımız bu çalışmamız, hem zaman hem de doz artımıyla sitotoksik etkinin arttığı ve apoptozun indüklendiği

gözlemlenmiştir. Sitotoksik etki ve apoptozun indüklendiği dozlarda aynı zamanda ROS'un etkisini düşürücü etki de göstermektedir. Belirlenen bu özellikler doğrultusunda meme kanserinde, diğer tedavilere ek olarak destek tedavi niteliğinde oleuropein ve D vitamininin kullanılabilceği görüşü desteklenmektedir. Bizim çalışmamızın kanser tedavisinde etkili olabilecek yeni terapötik ajanların geliştirilmesine, yapılacak olan daha detaylı moleküler çalışmalara kaynak teşkil etmesine ve ayrıca antikanser terapi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

- Aitken RJ, Roman SD.** Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2008, 1, 15-24.
- Akbel E.** Yüksek protein içeren diyetle beslenen sıçanlara atkestanesi ekstresi verilmesinin kemik ve kalsiyum metabolizmasına etkileri. Doktora Tezi, Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi, Afyonkarahisar, Türkiye. 2005.
- Akçakoyun M.** Koroner arter hastalığı olgularında koroner risk faktörleri ile endotel fonksiyonları arasındaki ilişki. Uzmanlık Tezi 2004.
- Akkuş İ.** Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. S.Ü. Tıp Fakültesi, Mimoza Yayınları, 1995, 32-41.
- Alenzi FQ, Lofty M, Wyse R.** Swords of cell death: caspase activation and regulation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2010, 11(2), 271-280.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF.** Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100, 3983-3988.
- Altan N, Dinçel AS, Koca C.** Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi*, 2006, 31, 51-56.
- Altunkaynak BZ, Özbek E.** Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir? *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 2008, 6, 93-104.
- Altunkaynak BZ, Ünal D, Aksak S, Ünal B.** Östrojen hormonu ve menopoza. *Deneyisel ve Klinik Tıp Dergisi*, 2012, 29, 252-256.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen MT.** Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy Science*, 1993, 90, 7915-22.
- Andre F, Broglio K, Pusztai L, Berrada N, Mackey JR, Nabholz JM, Chan S, Hortobagyi GN.** Estrogen receptor expression and docetaxel efficacy in patients with metastatic breast cancer: A pooled analysis of four randomized trials. *The Oncologist*, 2010, 15, 476-483.

Andreadou I, Iliodromitis EK, Mikros E, Constantinou M, Agalias A, Magiatis P, Skaltsounis AL, Kamber E, Tsantili-Kakoulidou A, Kremastinos DT. The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *The Journal of Nutrition*, 2006, 136, 2213–2219.

Andreadou I, Sigala F, Iliodromitis EK, Papaefthimiou M, Sigalas C, Aligiannis N, Savvari P, Gorgoulis V, Papalabros E, Kremastinos DT. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2007, 42, 549–558.

Antmen ŞE. Beta Talasemide Oksidatif Stres. Yüksek Lisans. Adana Çukurova Üniversitesi, 2005.

Apperly FL. The relation of solar radiation to cancer mortality in North America. *Cancer Research*, 1941, 1, 191-195.

Aslan G. Tümör immünolojisi. *Turkish Journal of Immunology*, 2010, 15, 7-13.

Atıcı E. Tümör immünolojisi. *Turkish Journal of Immunology*, 2010, 15, 7-13.

Atmaca E, Aksoy A. Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2009, 20, 79-83.

Aydemir B, Sarı EK. Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 2009, 2, 56-60.

Bai L, Zhu W. P53: Structure, function and therapeutic applications. 2006, 141-153.

Balkan F, Ünal OK. Nadir bir hiperkalsemi sebebi: D vitamini intoksikasyonu. *Genel Tıp Dergisi*, 2013, 23 (3), 90-2.

Baran Y. Kanser moleküler biyolojisi. Yardımcı Editörler: Kiraz Y, Ulu GT. ISBN: 978-605-2329-30-6. 2018, 45-52..

Barbaro B, Toietta G, Maggio R, Ariciello M, Tarocchi M, Galli A, Balsano C. Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. 2014, 15, 18508-18524.

Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination as a risk modifier of tobacco related cancers. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 2000, 9, 3-28.

Başağa HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biocheical Cell Biology*, 1990, 68, 989-98.

Başkol M, Başkol G, Koçer D, Artış T, Z Yılmaz. Mide kanserli hastalarda oksidan ve antioksidan parametreler ve birbiriyle ilişkileri. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2007, 5, 83-89.

Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany (Lond)*, 2003, 91, 179–94.

Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. The role of oxidative damage and stres in aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2004, 811-826.

Bombick B, Bombick PH, Ayers K, Putnam J, Avalos MF, Doolittle DJ. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic potential of mainstream whole smoke and smoke condensate from a cigarette containing a novel carbon filter. *Fundamental and Applied Toxicology*, 1997, 39, 11–17.

Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Letters* 1985, 24(2-3), 119-124.

Boss A, Bishop KS, Marlow G, Barnett MPG, Ferguson LR. Evidence to support the anti-cancer effect of olive leaf extract and future directions, 2016, 8:513.

Bouaziz M, Hammami H, Bouallagui Z, Jemai H, Sayadi S. Production of antioxidants from olive processing by-products. *EJEAFCh*, 2008, 7(8), 3231-3236.

Braakhuis AJ, Campion P, Bishop KS. Reducing breast cancer reccurence: The role of dietary polyphenolics. *Nutrients*, 2016, 8:547.

Brenes M ve De Castro A. Transformation of oleuropein and its hydrolysis products during Spanish-style green olive processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998, 77, 353–358.

Brenner RV, Shabahang M, Schumaker LM, Nauta RJ, Uskokovic MR, Evans SRT, Buras RR. The antiproliferative effect of vitamin D analogs on MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Letters*, 1995, 92, 77-82.

Bridges JW, Benford, DJ, Hubbard SA. The design and use of in vitro toxicity tests. *Turner (Ed., Macmillian, London*, 1983, 47.

- Bulotta S, Celano M, Lepore SM, Montalcini T, Pujia A, Russo D.** Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. 2014, 12, 219.
- Buras RR, Schumaker LM, Davoodi F, Brenner RV, Shabahang M, Nauta RJ, Evans SRT.** Vitamin D receptors in breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. 1994, 31, 191-202.
- Burtis CA, Ashwood ER, & Bruns DE.** Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. *Elsevier Health Sciences*, 2012.
- Cabadak H.** Hücre siklusu ve kanser. *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2008, 9(3), 51-61.
- Call JA, Eckhardt SG, Camidge DR.** Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *Lancet Oncology*. 2008, 9(10), 1002-1011.
- Campbell MS, Narvaez CJ, Tenniswood M, Welsh J.** 1,25-Dihidroksivitamin D₃ induces morphological and biochemical markers of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, 58(4), 367-376.
- Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distante A, De Caterina R.** Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thrombosis and Vascular Biology*, 2003, 23, 622–629.
- Carmicheal J, De Grafit WG, Gazdar, AF, Minna, JD, Mitchell JB.** Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Research*, 1987, 47, 936-942.
- Carrera-Gonzales MP, Ramirez-Exposito MJ, Mayas MD, Martinez-Martos JM.** Protective role of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol on cancer. *Trends in Food Science Technology*, 2013, 31, 92-99.
- Chan SW, Nguyen PN, Ayele D, Chevalier S, Aprikian A, Chen JZ.** Mitochondrial DNA damage is sensitive to exogenous H₂O₂ but independent of cellular ROS production in prostate cancer cells. *Mutation Research*, 2011, 716, 40-50.

Chen P, Li M, Gu X, Liu Y, Li X, Li C, Wang Y, Xie D, Wang F, Yu C, Li J, Chen X, Chu R, Zhu J, Ou Z, Wang H. Higher blood 25(OH)D level may reduce the breast cancer risk: Evidence from a chinese population based case-control study and meta-analysis of the observational studies. 2013, 8(1).

Chesney WR. Vitamin D and magicmountain: The anti infectious role of vitamin. *Journal of Pediatrics*, 2010, 156(5), 698-703.

Chiang KC, Chen TC. The anti-cancer actions of vitamin D. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2013, 13(1), 126-139.

Chodosh, LA. Ekspresyon of BRCA1 and BRCA2 in normal and neoplastic cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplsia*, 1998, 3, 389-402.

Colston KW, Hansen CM. Mechanisms implicated in the growth regulatory effects of vitamin D in breast cancer. *Endocrine Related Cancer*, 2002, 9(1), 45-59.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroğlu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *FASEB Journal*, 2003, 17(10), 1195-1214.

Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2011, 20, 145-158.

Cummings SR, Tice JA, Bauer S, Browner WS, Cuzick J, Ziv E, Vogel V, Shepherd J, Vaccjion C, Smith-Bindman R, Kerlikowske K. Prevention of breast cancer in postmenopausal women: approaches to estimating and reducing risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 2009, 101(6), 384-98.

Çiftçi N. Oksidatif Stresin Kanserdeki Rolü: Antioksidanlar kanser progresyonunun yakıtı olabilir mi? *Ahi Evran Tıp Dergisi*, 2017, 1, 8-13.

Dawson-Huhges, B, Dallal, GE, Kral EA, Haris S, Sokoll LJ and Falconer G. Effect of vitamin D supplementation on wintertime and overall bone loss in healthy postmenopausal women. *Annals of Internal Medicine*, 1991, 115, 505-12.

De La Puerta R, Dominguez MEM, Ruiz-Guttierrez V, Flavill JA, Hoult JRS. Effects of olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitregeric neurotransmission. *Life Science*, 2001, 69, 1213–1222.

De Luca HF, Zierold C. Mechanisms and functions of vitamin D. *Nutrition reviews*, 1998, 56, 4-10.

- Devarajan E, Sahim AA, Cgen JS ve ark.** Down regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene*. 2002, 21(57), 8843-8851.
- Dikmen M, Öztürk N, Öztürk Y.** Nar meyve kabuğu ekstresinin MCF7 hücre proliferasyonu üzerine sitotoksik ve inhibitör etkileri, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2008, 37(3), 179-190.
- Dittmer KE, Thompson KG.** Vitamin D Metabolism and Rickets in Domestic Animals. *Veterinary Pathology*, 2011, 48(2), 389-407.
- Duijts SFA, Faber MM, Oldenburg HSA, Beurden M, Aaronson NK.** Effectiveness of behavioral techniques and physical exercise on psychosocial functioning and health-related quality of life in breast cancer patients and survivors-a meta-analysis. *Psycho-Oncology*, 2011, 20, 115-126.
- Edinger AL, Thompson CB.** Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 2004, 16(6), 663-669.
- Elamin MH, Daghestani MH, Omer SA, Elobeid MA, Virk P, Al-Olayan EM, Hassan ZK, Mohammed OB, Aboussekhra A.** Olive oil oleuropein has anti-breast cancer properties with higher efficiency on ER-negative cells. *Food and chemical toxicology*, 2013, 53, 310-316.
- Elmore S.** Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 2007, 35, 495-516.
- Erman Y.** Erkek ve kadınların diyet-kanser ilişkisi hakkında bilgi ve inanışları. Ev Ekonomisi Yüksekokulu, Beslenme Bilimleri Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2007.
- Eröz R, Karataş A, Alkoç OA, Baltacı D, Oktay M, Çolakoğlu S.** Apoptozis hakkında bilinenler (Literatür Taraması). *Düzce Tıp Dergisi*, 2012, 14, 87-101.
- Ersöz M.** İnsan Meme Kanseri (MCF 7) ve Fare Fibroblast (L-929) Hücre Kültürlerinde Poliakrilik Asidin Toksisitesinin İncelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi, 2007.

Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Montedoro GF, Di Saverio C, Morozzi G. Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *The Journal of Nutrition*, 2006, 614-619.

Feldman D, Krishnan AV, Swami S, et al. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nature Reviews Cancer*, 2014, 14(5), 342-357.

Feng JF, Lu L, Zeng P, Yang YH, Luo J, Yang YW, Wang D. Serum total oxidant/antioxidant status and trace element levels in breast cancer patients. *International Journal of Clinical Oncology*, 2012, 17, 575-583.

Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocol*. 2016, DOI:10.1101/pdb.prot087379.

Findley HW, Gu L, Yeager AM, Zhou M. Expression and regulation of bcl-2, bcl-xl and bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*: 1997, 89(8), 2986-2993.

Fini L, Hotchkiss E, Fogliano V, Graziani G, Romano M, De Vol EB, Qin H, Selgrad M, Boland CR, Ricciardiello L. Chemopreventive properties of pinoselin-rich olive oil involve a selective activation of the ATM-P-53 cascade in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis*. 2008, 29(1), 139-146.

Fogaça Manoela Viar, Priscila de Matos Cândido-Bacani, Lucas Milanez Benicio, Lara Martinelli Zapata, Priscilla de Freitas Cardoso, Marcelo Tempesta de Oliveira, Tamara Regina Calvo, Eliana Aparecida Varanda, Wagner Vilegas & Ilce Mara de Syllos Cólus. “Effects of Indirubin and Isatin on Cell Viability, Mutagenicity, Genotoxicity and BAX/ERCC1 Gene Expression.” *Pharmaceutical Biology* 2017, 55(1), 2005–14.

Foroozanfard F, Jamilian M, Bahmani F, Talaei R, Talaei N, Hashemi T, et al. Calcium plus vitamin D supplementation influences biomarkers of inflammation and oxidative stress in overweight and vitamin D-deficient women with polycystic ovary syndrome: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Clinical Endocrinology*, 2015, 83, 888-94.

Forouhi NG, Luan JA, Cooper A, Boucher BJ, Wareham NJ. Baseline serum 25-hydroxy vitamin D predictive of future glycemic status and insulin resistance: the medical research council elderly prospective study 1990–2000. *Diabetes*. 2008, 57, 2619-25.

Fredrickson WR, F and S Group, Inc. Method and Composition for Antiviral Therapy with Olive Leaves. U.S. Patent. 2000, 6, 117,884.

Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *International Journal of Cancer*. 2009, 124(3), 511-515.

Garland FC, Garland CF, Gorham ED, Young JF. Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Preventive Medicine*, 1990, 19(6), 614-622.

Geoffey MC, Robert EH. The Cell a molecular Approach. Boston: ASM Press; 2004.

Giovanucci E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: a review (United States). *Cancer causes control*, 2005, 16(2), 83-95.

Goya L, Meteos R, Bravo L. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stres induced by tert-butylhydroperoxide. *European Journal of Nutrition*, 2007, 46(2), 70–78.

Gök V, Kayacier A, Telli R. Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı doğal antioksidanlar. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2006, 2, 35-40.

Gölbaşı Z, Çetin R, Kalkan S, Durmuş T. Üniversite öğrencisi kızların meme kanseri ve kendi kendine meme muayenesi ile ilgili bilgi ve davranışları. *The Journal of Breast Health*, 2010, 6, 69-73.

Gönenç A, Özkan Y, Torun M, Şimşek B. Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2001, 26, 141-144.

Gradinaru D, Borsa C, Ionescu C, Margina D, Prada GI, Jansen E. Vitamin D status and oxidative stress markers in the elderly with impaired fasting glucose and type 2 diabetes mellitus. *Aging Clinical and Experimental Research*, 2012, 24, 595-602.

Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Cheical*, 1995, 41(12), 1819-28.

Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2008, 2, 73-78.

- Gürel DK.** Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Erişkin Onkoloji, Hematoloji Kliniklerinde Kemoterapi Uygulanan Hastaların Yaşam Kalitesi ve Bunu etkileyen Faktörlerin İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hemşirelik Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2007.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease, An overview. *Methods Enzymol*, 1990, 186, 1-85.
- Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, Ayadi F, Garmazi F, Mezgenni N, et al.** Inhibitory effects of 1alpha, 25dihydroxyvitamin D3 and Ajuga iva extract on oxidative stress, toxicity and hypo-fertility in diabetic rat testes. *Journal of Physiology Biochemistry*, 2008, 64, 231-9
- Han J, Terence kPN, Yamada TP, Isoda H.** Anti-proliferatif and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*, 2009, 59, 45-53.
- Hannahan D ve Weinberg RA.** The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100(1), 55-70.
- Hassan ZK, Elamin MH, Daghestani MH, Omer SA, Al-Olayan EM, Elobeid MA, Virk P, Mohammed OB.** Oleuropein induces anti-metastatic effects in breast cancer. *Asian Pasific Journal of Cancer Prevention*, 2012, 13, 4555-4559.
- Hassan ZK, Elamin MH, Omer SA, Daghestani MH, Al-Olayan ES et al.** Oleuropein induces apoptosis via the p53 pathway in breast cancer cells. *Asian Pasific Journal of Cancer Prevention*. 2013;14:6739-6742.
- Hekim N.** <http://bilimvebilimadami.com/programli-hucre-olumleri-birbirlerinden-farkli-olabilir/> 06.06.2018.
- Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JPL.** The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *OsteoArthritis and Cartilage*, 2003, 11, 747-755.
- Hochberg Z.** Requirements for vitamin D in an indoors culture. *Highlights*, 2004, 12:19-23.
- Holick MF.** Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *The Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116(8), 2062-72.
- Holick MF.** Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(6 Suppl), 2004, 1678-1688.

Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases cancer and cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, 80(6), 1678- 88.

Holick MF. Vitamin D deficiency. *The new England journal of medicine*. 2007, 357(3), 266-81.

http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/ANA_rapor_2013v01_2.pdf 22.04.2018.

Huang HL, Hsing HW, Lai TC, Chen YW, Lee TR, Chan HT, Lyu PC, Wu CL, Lu YC, Lin ST, Lin CW, Lai CH, Chang HT, Chou HC, Chan HL. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *Journal of Biomedical Science*, 2010, 17, 36.

Huerta S, Goulet EJ, Yopez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *Journal of Surgery Research* 2007, 139, 143-156.

Huerta S. Nitric oxide for cancer therapy. *Future Science. OA*, 2015, 1(1).

Hussain S, Ashafaq M. Oxidative stress and anti-oxidants in pre and post operative cases of breast carcinoma. Ahead of print. TJPS-93063.

Hücre Siklusu. Erişim tarihi: 04.04.2018Ç <http://www.belgeci.com/mitoz-bolunme.html>.

Jamshidinaini Y, Akbari ME, Abdollahi M, Ajami M, Davoodi SH. Vitamin D status and risk of breast cancer in Iranian women: A case-control study. *Journal of American College Nutrition*, 2016, 35(7), 639-646.

Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273, 9357–9360.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal of Clinicians*, 2011, 61, 69-90.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer Statistics, 2006. *CA: A Cancer Journal of Clinicians*, 2006, 56, 106-130.

Jensen SS, Madsen MW, Lukas J, Binderup L, & Bartek J. Inhibitory effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) on the G(1)-S phase-controlling machinery. *Molecular Endocrinology*, 2001, 15(8), 1370-1380.

Kaçar Ö. Çeşitli kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkili paladyum türevlerinin moleküler etki mekanizmalarının aydınlatılması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2016, 156.

Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Graham LB, Parker CE, Ames BN, et al. Biomarkers of oxidative stress study III. Effects of the nonsteroidal antiinflammatory agents indomethacin and meclofenamic acid on measurements of oxidative products of lipids in CCl4 poisoning. *Free Radical Biology & Medicine Journal*, 2005, 38, 711-8.

Karakuş E. Östrojen-bağımlı meme kanseri ve sodyum-bağımlı organik anyon taşıyıcı. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2010, 5, 155-166.

Karaman A. Mide kanserinde p53 tümör supresör geninin rolü. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 2003, 23, 67-73.

Keçeli T, Gordon MH. The antioxidant activity and stability of the phenolic fraction of green olives and extra virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2001, 81, 1-1396.

Kıdır M. D vitamininin immun sistem, deri ve kanser ile ilişkisi. Derleme, *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2013, 20(4), 158-161.

King, J. B.R., Robins, M.W. Cancer biology, 3. Baskı, Pearson Education Limited, Essex, İngiltere, 2006.

Kömürcü HE. Memenin Malign Epitelyal Tümörlerinde İmmünohistokimyasal Olarak Saptanan pS₂ Proteininin Östrojen ve Progesteron Reseptörleriyle Karşılaştırması. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı Başkanlığı. Uzmanlık Tezi, Ankara: Genelkurmay Başkanlığı, 1995.

Krishnan AV, Swami S, Peng L, Wang J, Moreno J, Feldman D. Tissue selective regulation of aromatase expression by calcitriol: implications for breast cancer therapy. *Endocrinology*, 2010, 151(1), 32-42.

Kushi LH, Doyle C, McCullough M, et al. American Cancer Society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA: A Cancer of Journal of Clinicians*, 2012, 62(1), 30-67.

Lian, Z, Niwa, K., Gao, J., Tagami, K. , Mori, H, Tamaya, T. Association of cellular apoptosis with anti-tumor effects of the Chinese herbal complex in endocrine-resistant cancer cell line, *Cancer Detection and Prevention*, 2003, 27, 147-154.

Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 2000, 21(3), 485-495.

Lowitz BB, Casciato DA. Kanser Biyolojisi ve Onkogenler: Ana bilgi. Medical Oncology& Principles of Cancer Biology. Erişim tarihi: 06.04.2018. www.stoma-seite.de/SiklusApoptozisKanser.pdf.

Machowetz A, Poulsen HE, Gruendel S, Weimann A, Fito M, Marrugat J, De La Torre R, Salonen JT, Nyssonen K, Mursu J, Nascetti S, Gaddi A, Kiesewetter H, Baumler H, Selmi H, Kaikkonen J, Zunft HJ, Covas MI, Koebnick C. Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans. *FASEB J*, 2007; 21(1), 45–52.

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death. *American Journal of Pathology*, 1995, 146, 3-15.

Marsillo V ve Lanza B. Characterisation of an oleuropein degrading strain of *Lactobacillus plantarum*. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines (phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity. *Journal of Science Food Agriculture*, 1998, 76, 520-524.

Martin AM, Weber BL. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 2000, 92, 1126-1135.

Martin SP, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Research*, 1990, 50, 7415-7421.

Mccormick M, Denning GM, Reszka GM, Bilski P, Buettners GR, Rasmussen GT, et al. Biological effects of menadione photochemistry: effects of menadione on biological systems may not involve classical oxidant production. *Biochemical Journal*, 2000, 350, 797-804.

McPherson K, Steel C, Dixon JM. Breast cancer epidemiology, risk factors and genetics. *BMJ* volume 2000, 321, 624-8.

Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005, 3, 30-39.

Menendez JA, Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Carrasco-Pancorbo A, Garcia-Villalba R, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer*, 2007, 7, 80.

Menendez JA, Vazquez-Martin A, Oliveras Ferraros C, Garcia-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Extra virgin olive oil polyphenolics inhibit HER2 (erB-2) induced malignant transformation in human breast epithelial cells: relationship between the chemical structures of extra-virgin olive oil secoiridoids and lignans and their inhibitory activities on the tyrosine kinase activity of HER2. *International Journal of Oncology*. 2009, 34(1), 43–51.

Mokhtari Z, Hekmatdoost A, Nourian M. Antioxidant efficacy of vitamin D. *Journal of Parathyroid Disease*, 2017, 5(1), 11-6.

Murray A, Madden SF, Synnott N, Klinger R, O'Connor D, O'Donovan N, Gallagher W, Grown J, Duffy MJ. Vitamin D receptor as a target for breast cancer therapy. *Society for Endocrinology*, 2017, ERC-16-0463.

Mutaf O. <http://oktaymutaf.blogspot.com.tr/> 18.04.218.

National Cancer Institute. Stages of Breast Cancer. <https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq>. 03.06.20178.

Navarro –González JA, García-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids,” *Clinical Chemistry*. 1998, 44(3), 679–681.

Neuhouser ML, Sorensen B, Hollis BW, Ambis A, Ulrich CM, Mc Tierman A, Bernstein L, Wayne S, Gilliland F, Baumgartner R, Ballard-Barbash R. Vitamin D insufficiency in a multiethnic cohort of breast cancer survivors. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2008, 88, 133-9.

Noda N, Wakasugi H. Cancer and Oxidative stress. *Japan Medical Association*, 2001, 44(12), 535-539.

Noureen S, Farhat J, Foad AM, Naeem AQ. Association between vitamin D deficiency and Breast Cancer. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 2017, 33(3), 645-649.

O'Brien KM, Sandler DP, Taylor JA, Weinberg CR. Serum vitamin D and risk of breast cancer within five years. *Environmental Health Perspectives*, 2017.

- Ogun M, Ozcan A, Karaman M, Merhan O, Ozen H, Kukurt A, Karapehlivan M.** Oleuropein ameliorates arsenic induced oxidative stress in mice. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 2016, 36, 1-6.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K:** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 1979, 95, 351-358.
- Omar SH.** Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica*, 2010, 78, 133-154.
- Ooi LL, Zhou H, Kalak R, Zheng Y, Conigrave AD, Seibel MJ, Dunstan CR.** Vitamin D deficiency promotes human breast cancer growth in a murine model of bone metastasis. *Cancer Research*, 2010, 70(5).
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Würtele G, Spiegelhalder B, Bartsch H.** Olive oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncology*, 2000, 1, 107–112.
- Öncel M.** Isı şok proteinleri ve kanser. *European Journal of Basic Medical Sciences*, 2012, 2, 16-23.
- Özay G, Ülker E.** Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Y.Y.Ü Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2008, 2, 73-78.
- Özsoylu S.** How long has cholecalciferol been called vitamin D. *Journal Pediatrics Gastroenterol Nutrition*, 1988, 7(2), 303.
- Öztürk, F.** Apoptoz, *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2002, 9(2), 143-148.
- Paglia DE Valentine WN.** Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1967, 70 (1), 158–169.
- Pance A.** Nitric oxide and hormones in breast cancer: allies or enemies? *Future Oncology*, 2006, 2(2), 275-288.
- Panizzi L, Scarpati ML, Oriente G.** Chemical structure of oleuropein, bitter glucoside of olive with hypotensive activity. *Gazzetta Chimica Italiana*, 1960, 90, 1449-1485.
- Pazarbaşı A, Kasap M.** Kanser genetiği. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2003, 12, 328-340.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 2008, 4(2), 89-96.

Pınarbaşı E. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü) (in) Moleküler Biyoloji. A Yıldırım, F Bardakçı, M Karataş, B Tanyolaç (Editör), 2007, 423-468, Nobel Yayın, Ankara.

Pierre E, Guy F, Anne, B, Thierry D, Sylvie M, Marie-Christine BR, Françoise CC. Serum 25(OH) vitamin D and risk of breast cancer: A nested case-control study from the French E3N cohort. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2010, 19(9).

Pilz S, Tomaschitz A, Marz W, Drechsler C, Ritz E, Zittermann A, et al. Vitamin D, cardiovascular disease and mortality. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 2011, 75, 575-84.

Puel C, Mardon J, Agalias A, Davicco MJ, Lebecque P, Mazur A, Horcajada MN, Skaltsounis AL, Coxam V. Major phenolic compounds in olive oil modulate bone loss in an ovariectomy/inflammation experimental model. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 2008, 56(20), 9417-9422.

Rainville C, Khan Y, Tisman G. Triple negative breast cancer patients presenting with low serum vitamin D levels: a case series. *Cases Journal*, 2009, 2, 8390.

Ravani P, Malberti F, Tripepi G, Pecchini P, Cutrupi S, Pizzini P, et al. Vitamin D levels and patient outcome in chronic kidney disease. *Kidney International*, 2009 Jan, 75, 88-95.

Reiter RJ. Melatonin: Lowering the high price of free radicals. *Physiology*, 2000, 15, 246-250.

Renahan AG, Tyson M, Egger M, et al. Body-mass index and incidence of cancer: systematic review and metaanalysis of prospective observational studies. *Lancet*, 2008, 371(9612), 569-78.

Romrell LJ, Bland KI. Anatomy of the breast, axilla, chest wall and related metastatic sites. 2nd ed. Philadelphia: *WB Saunders Company*, 1998, 19-37.

Rosser, BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications, *Gastroenterology*, 1995, 108(1), 252-75.

Rusinska A, Pludowski P, Walczak M, Borszewska-Kornacka M, Bossowski A, Chalebna-Sokol D. Vitamin D supplementation guidelines for general population and groups at risk of vitamin D deficiency in Poland-Recommendations of the Polish society of pediatric endocrinology and diabetes and the expert panel with the participation of the national specialist consultants and representatives of scientific societies-2018 update. *Frontiers in Endocrinology*, 2018, 9, 246.

Russo J, Lareef MH, Balogh G, Guo S, Russo IH. Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2003, 87, 1-25.

Russo, Jose, Ronald H. Bradley, Charles Mcgrath, and Irma H. Russo. "Scanning and Transmission Electron Microscopy Study of a Human Breast Carcinoma Cell Line (MCF-7) Cultured in Collagen-Coated Cellulose Sponge1." *Cancer Research* 1977, 37, 2004–14.

Saip P, Keskin S, Özkan M, Kaplan MA, Aydoğan F, Demirağ GG, Uzunoğlu S, Engin H, Başaran G, Güler N, Uygun K, Demirkan B, Özdemir F, Çubukçu E, Salepci T, Çiçin İ. Türkiye’de meme kanserli hastaların tanı ve tedavi yöntemlerine ulaşım hızı; çok merkezli gözlemsel çalışma. *The Journal of Breast Health*, 2011, 7, 109-117.

Salvini S, Sera F, Caruso D, Giovannelli L, Visioli F, Saieva C, Masala G, Ceroti M, Giovacchini V, Pitozzi V, Galli C, Romani A, Mulinacci N, Bortolomeazzi R, Dolara P, Palli D. Daily consumption of a high-phenol extra virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *British Journal of Nutrition*, 2006, 95(4), 742–751.

Saraçlıgil B, Ozturk B, Unlu A, Abusoglu S, Tekin G. The effect of vitamin D on MCF-7 breast cancer cell metabolism. *Bratislava Medical Journal*, 2017, 118(2), 101-106.

Sardar S, Chakraborty A, Chatterjee M. Comparative effectiveness of vitamin D3 and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in Sprague--Dawley rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 1996, 66, 39-45.

Schwartzman R A, Cidloski J A. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews*, 1993, 14, 133-144.

Seçme M, Eroglu C, Dodurga Y, Bağcı G. Investigation of anticancer mechanism of oleuropein via cell cycle and apoptotic pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Gene*, 2016, 585, 93-99.

Segovia-Mendoza M, Diaz L, Gonzalez-Gonzalez ME, et al. Calcitriol and its analogues enhance the antiproliferative activity of gefi-tinib in breast cancer cells. *The Journal Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 148, 122-131.

Sepporta MV, Fuccelli R, Rosignoli P, Ricci G, Servili M, Morozzi G, Fabiani R. Oleuropein inhibits tumour growth and metastases dissemination in ovariectomised nude mice with MCF-7 human breast tumour xenografts. *Journal of Functional Foods*, 2014, 8, 269–273

Seven A, Candan G. Serbest Radikaller ve Lipid Peroksidasyon. *Klinik Gelişim*, 1995, 8, 3906-11.

Shamshoum H, Vlacheski F, Tsiani E. Anticancer effects of oleuropein. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminumphthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Biofactors*, 2017, 43(4), 517-528.

Shao T, Klein P, Grossbard ML. Vitamin D and breast cancer. *Oncologist*, 2012, 17(1), 36-45.

Sharif BM, Edward DG, June K, Heather H, Cedrif FG. Meta-analysis of vitamin D sufficiency for improving survival of patients with breast cancer. *Anticancer research*, 2014, 34, 1163-1166.

Shen XG, Wang C, Li Y ve ark. Down regulation of caspase-9 is a frequent event in patient with stage II colorectal cancer and correlates with poor clinical outcome. *Colorectal Disease*, 2010, 12(12), 1213-1218.

Shirazi L, Almquist M, Borgquist S, Malm J, Manjer J. Serum vitamin D (25(OH)D₃) levels and the risk of different subtypes of breast cancer: A nested case-control study. *The Breast*, 2016, 28, 184-190.

Simboli-Campbell, M, Narvaez, C. J, van Weelden, K, Tenniswood, M, & Welsh, J. Comparative effects of 1,25(OH)₂D₃ and EB1089 on cell cycle kinetics and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 1997, 42(1), 31-41.

Sirianni R, Chimento A, De Luca A, Casaburi I, Rizza P, Onofrio A, Lacopetta D, Puoci F, Ando S, Maggiolini M, Pezzi V. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 54, 833-840.

- Slatter TL, Hung N, Campbell H ve ark.** Hyperproliferation, cancer and inflammation in mice expressing a $\Delta 133p53$ -like isoform. *Blood*, 2011, 117(19), 5166-5177.
- Small DM, Coombes JS, Bennett N, Johnson DW, Gobe GC.** Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology*, 2012, 17, 311-21.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC.** "Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid." *Analytical Biochemistry*, 1985, 150(1), 76-85.
- Solakoglu Z.** Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. *Klinik Gelişim*, 2009, 22, 20-25.
- Somunoğlu S.** Meme kanseri: Belirtileri ve erken tanıda kullanılan tarama yöntemleri. *Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 2009, 4, 103-122.
- Soule, HD, Vazquez J, Long A, Albert S, & Brennan M.** A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 1973, 51(5), 1409-1416.
- Soyalp M.** Çevresel Asbeste Maruz Kalanlarda Oksidatif Stres ve Kollajen Metabolizmasının Değerlendirilmesi. Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Şanlıurfa: Harran Üniversitesi, 2011.
- Sun J, Liu RH.** Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF7 breast cancer cells. *Cancer letters*, 2005, 20, 1-11.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y.** A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 1988,34, 497-500.
- Suzuki R, Orsini N, Saji S, et all.** Body weight and incidence of breast cancer defined by estrogen and progesterone receptor status- a meta analysis. *International Journal of Cancer*, 2009, 124(3), 698-712.
- Şener DE, Gönenç A, Akıncı M, Torun M.** Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. *Cell Biochemistry and Function*, 2007, 25, 377-382.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Türkiye Kanser İstatistikleri.**
- Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B, Atik U.** Serbest radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2000, (1), 52-58.
- Tezcan I.** D Vitamini ve İmmün Sistem. *Türkiye Klinikleri*. 2012, 8(2), 66-8.

- Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles RG, Moncada S.** Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *British Journal of Cancer*, 1995, 72(1), 41–44.
- Topal T, Öter Ş, Korkmaz A.** Melatonin ve kanserle ilişkisi. *Genel Tıp Dergisi*, 2009, 19, 137-143.
- Topçul M.** Kanser. <http://www.sb.k12.tr/IMG/pdf/kanser.pdf> 22.04.2018.
- Topuz E, Aydın A, Dinçer M.** Meme Kanseri. Nobel Tıp Kitapevi, 2003, 1.
- Torun M, Gönenç A, Yardım S, Sargın H, Menevse A, Şimşek B.** Serum Malondialdehyde, vitamin E, β -carotene levels in breast cancer. *Pharmacy and pharmacology com*, 1995, 1.
- Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M.** The phenolic composition of olive oil: structure, biological activity, and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 2005, 18, 98–112.
- Tsuruo T, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, sakamoto H, Haga N.** Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Science*, 2003, 94, 15-21.
- Türk G.** Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etkileri ve koruyucu stratejiler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 2013, 17, 73-92.
- Türkiye Kanser İstatistikleri Kurumu. http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/Turkiye_Kanser_istatistikleri.pdf, 18.04.2018.
- Vahora H, Khan MA, Alalami U, Hussain A.** The potential role of nitric oxide in halting cancer progression through chemoprevention. *Journal of Cancer Prevention*, 2016, 21, 1.
- Varela-Rey M, Woodhoo A, Martinez-Chantar ML, Mato JM, Lu SC.** Alcohol, DNA methylation and cancer. *Alcohol Research*, 2013, 35(1), 25-35.
- Veldhuis S, Wolbers F, Brouckaert O, Vermes I, Franke HR.** Cancer prevalence in osteoporotic women with low serum vitamin D levels. *Menopause*, 2011, 18(3), 319-322.
- Visioli F, Bellosta S, Galli C.** Oleuropein, the bitter principles of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Science*, 1998, 62, 541–546.

- Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, Villa M, Galli G, Sirtori C, Galli C.** Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *European Journal of Nutrition*, 2005, 44(2), 121–127.
- Visioli F, Galli C, Galli G, Caruso D.** Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2002, 104, 677–684.
- Wang D, Dubois RN.** Cyclooxygenase-2: a potential target in breast cancer. *Semin Oncology*, 2004, 31(1 Suppl 3), 64-73.
- Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al.** Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*, 2008, 117, 503-11.
- Winkelhausen ER, Pospiech G, Laufenberg G.** Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. *Bulletin of the Chemist and Technologist of Macedonia*, 2005, 24(1), 41-46.
- Wranciz J, Szostak-Wegierek D.** Health outcomes of vitamin D. Part I. Characteristics and classic role. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 2014, 65(3), 179-84.
- Wu R, Feng J, Yang Y, Dai C, Lu A, Li J, Liao Y, Xiang M, Huang Q, Wang D, Du X.** Significance of serum total oxidant/antioxidant status in patients with colorectal cancer. DOI:10.1371/journal.pone.0170003.2017.
- Wyllie AH.** Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 1980, 284, 555-556.
- Xu W, Liu LZ, Loizidou M, Ahmed M, Charles IG.** The role of nitric oxide in cancer. *Cell Research*, 2002, 12(5-6), 311-320.
- Xue F, Willet WC, Rosner BA, et al.** Cigarette smoking and incidence of breast cancer. *Arch Internal Medicine*, 2011, 171(2), 125-33.
- Yıldız G, Uylaşer V.** Doğal bir antimikrobiyal: Oleuropein. *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*. 2011, 25(1), 131-42.
- Yılmaz E, Altunok V.** Kanser ve p53 geni. *Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2011, 1, 19-23.
- Yokuş B, Çakır DÜ.** Kanser biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2012, 1, 7-18.

- Young IS, Woodside JV.** Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 2001, 54, 176-186.
- Yousef FM, Jacobs ET, Kang PT, Hakim IA, Going A, Yousef JM, Al-Raddadi RM, Kumosani TA, Thomson CA.** Vitamin D status and breast cancer in Saudi Arabian women: case-control study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2013, 105-10.
- Yu, FY, Liao, YC, Chang, CH, Liu, BH.** Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of mitochondrial pathway. *Toxicology Letters*, 2006, 161(2), 143-51.
- Zehnder, D, Bland, R, Williams, M.C, McNinch, RW, Howie, AJ, Stewart, PM, & Hewison, M.** Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2001, 86(2), 888-894.
- Zhao Y, Tan YS, Aupperlee MD, Langohr IM, Kirk EL, Troester MA, Schwartz RC, Haslam SZ.** Pubertal high fat diet: effects on mammary cancer development. *Breast Cancer Research*, 2013, 15(5), 100.
- Zhong W, Gu B, Gu Y, Groome LJ, Sun J, Wang Y.** Activation of vitamin D receptor promotes VEGF and CuZn-SOD expression in endothelial cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2014;140:56-62.
- Zimmerman KC, Gren DR.** How cells die: apoptosis pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2001, 108 (4), 99-103.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : ARI, Murat
Uyruğu :T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Aydın 17.12.1981
Telefon : 0 532 153 1403
E-mail : muratari60@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

<u>Derece</u>	<u>Kurum</u>	<u>Mezuniyet tarihi:</u>
Yüksek Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalı	2010-2013
Lisans	Ege Üniverstesi Fen Fakültesi Biyokimya	2002-2007

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

İŞ DENEYİMİ

<u>Yıl</u>	<u>Yer/Kurum</u>	<u>Ünvanı</u>
2010-2012	Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Parazitoloji Anabilim Dalı	Biyokimyager
2012-	Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Satınalma Birimi	Memur

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Arı M, Ögüt S, Döger F. Kanserin Önlenmesinde Antioksidanların Rolü. Adnan Menderes Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi. 2017, 1(2), 15-22.

Arı HF, Meşe T, Yılmaz MM, Arı M, Ağın H, Çavuşoğlu E, Turhan T, Devrim İ. İnkrakraniyal Apse Saptanan Konjenital Kalp Hastalıklı Olgu. 2017, 1(3), 106-111.

Arı M, Bildik A, Ertug S. Investigation of bone metabolism in dogs with leishmaniasis. Polish Journal of Veterinary Sciences. 2017, 20(2), 411-415.

Berksoy EA, Arı HF, Soylu ÖB, Öztürk Ş, Arı M, Çelik T, Karakoyun M. A Mediastinal

Abscess Developing After Endoscopy to Remove an Ingested Foreign Body. An Unusual Clinical Presentation. J Pediatr Intensive Care Med 2016, 3, 159-61.

Arı M, Döger F, Kırdar S, Yüksel H. Servikal Biyopsi, Smear Değerlendirmesi ve HPV Alt Tiplendirme Sonuçlarının Karşılaştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi Meandros Medical and Dental Journal. 2016, 17, 17-21.

2. KİTAPLAR

Sağlık Bilimleri için Biyokimya. (Editör: Serdal Ögüt Yayın Tarihi: 2016)

(Bölüm: Biyokimya ve Dermatoloji Laboratuvarı'nda Kullanılan Yöntemler) ISBN: 978-1-62100-131-7.

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Arı M, Ögüt S. Nutrigenomik Teknolojileri. 1. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi-Aydın-2017.

Arı HF, **Arı M**. Süt Çocukluğu Döneminde Beslenme. I. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, 2017.

Arı M, Oğut S. Kanserin Önlenmesinde Antioksidanların Rolü. 1. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi-Aydın-2017.

Arı HF, **Arı M**, Meşe T, Yılmaz MM. Congenital Heart Disease Case with Intracranial Abscess. I. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, 2017.

Arı M, Oğut S. Chlororpyrifos-Ethylene and Rose Water Applications Effects of Oxidant and Nonoxidant Parameters in Rat Kidneys - 41st FEBS Congress-Molecular and Systems Biology for a Better Life-Efes/Kuşadası-2016.

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Oğut S, **Arı M**, Erdoğan Ö. Chlorpyrifos-ethyl ve Gülsuyu Uygulamalarının Sıçan Böbrek Dokuları ve Malondialdehit (MDA) Seviyeleri Üzerine Etkisi-19. Uluslararası Katılımlı Ulusal Biyoteknoloji Kongresi-Biyoteknoloji Derneği-Osmangazi Üniversitesi-2017.

Döger F, Akcan M, **Arı M**, Çeçen E. Kemik İliğinde Nöroblastom Metastazı Gösteren Olguların İmmunhistokimyasal Değerlendirilmesi-XX. Ege Onkoloji Günleri-Endokrin Kanserler Sempozyumu-Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi-İzmir-2016.

Arı HF, Sandal ÖS, **Arı M**, Sarı F, Ceylan G. Pediatrik Akut Viral Miyokardit Olgusunda Laboratuvar Tetkiklerinin İzlemi. 27. Ulusal Türk Biyokimya Kongresi, 2015.

Arı M, Döger F, Kırdar S, Yüksel H. Servikal İntraepitelial Neoplazilerle İlişkili HPV Alt Tipleri- 27. Ulusal Biyokimya Kongresi-Antalya-2015.

Arı M, Bildik A, **Ertuğ S**. Leishmaniasisli Köpeklerde Kemik Metabolizmasının Araştırılması 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi- Denizli 2013.

Ertuğ S, Özlem S, **Arı M**, Ertabaklar H. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na 2005-2012 Yılları Arasında Kistik Ekinokokkozis Ön Tanısı ile Gönderilen Olguların Değerlendirilmesi-6. Ulusal Hidatidoloji Kongresi(Uluslararası Katılımlı)-Gaziantep 2012.