

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MDA-MB-453 MEME KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNDE
TAMOKSİFEN ve DEİNOKSANTİNİN SİNERJİK ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

Nihan GÜNAY

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KUZUCU

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
2020
Her Hakkı Saklıdır.

Bilimsel Etiğe Uygunluk Sayfası

“MDA-MB-453 Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Tamoksifen ve Deinoksantin Sinerjik Etkilerinin İncelenmesi” isimli “Yüksek Lisans” tezim tarafımca intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim.
22/07/2020

(İmza)

Nihan GÜNAY

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MDA-MB-453 MEME KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNDE TAMOKSİFEN ve DEİNOKSANTİNİN SİNERJİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Nihan GÜNAY

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KUZUCU

Dünyada en sık karşılaşılan kanser çeşidi olan meme kanseri, ülkemizde akciğer kanserinin ardından ikinci sırayı almaktadır. Meme kanserine karşı tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde, bu patogenezin özelliklerinin daha iyi anlaşılması önemli rol üstlenmektedir. Son yıllarda progesteron reseptörü (PR), östrojen reseptörü (ER), Epidermal Büyüme Faktör reseptörü-2 (HER2) ifade düzeyleri önemli prognostik belirteçler olmuştur.

Kombinasyon tedavisi son yıllarda büyük bir ivme kazanan, iki veya daha fazla ilacın veyahut yöntemin kullanılma şeklidir. Bu tedavinin en önemli faydalarından biri karsinomun aynı anda birden fazla ilaca karşı direnç gösterme olasılıkları daha düşük olacağından ilaç direnci gelişimini azaltmasıdır.

Östrojen engelleyici ve non-steroid bir bileşik olan Tamoksifen, yaklaşık 20 yıldır hormon reseptör pozitif meme kanseri olan hastaları tedavi etmek için kullanılmaktadır.

Deinoksantin, radyasyona dirençli bakteri olan *Deinococcus radiodurans*'ın hücre duvarında bulunan S-tabakadan izole edilen ksantin türevidir. Yapılan çalışmalarda bu ksantin türevinin bazı kanser türleri üzerinde pro-apoptotik ve anti-proliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir.

Tez kapsamında Tamoksifen ve Deinoksantin bir HER2 pozitif meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-453) üzerine anti-kanser ve anti-proliferatif sinerjik etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda hücre kültürüne maddelerin ayrı ve kombinasyonlarının uygulanması sonucunda; *Bax*, *Bcl2*, *Caspase 3* ve *HER2* genlerinin ifade düzeyleri ve protein seviyelerinin araştırılması RT-qPCR ve ELISA yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir.

2020, 72 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Deinoksantin, HER2, Meme Kanseri, MDA-MB-453, Tamoksifen

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION of THE SYNERGISTIC EFFECTS of TAMOXIFEN and DEINOXHANTIN on MDA-MB-453 BREAST CANCER CELL LINE

Nihan GÜNAY

Erzincan Binali Yıldırım University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Mehmet KUZUCU

Breast cancer, which is the most common cancer type in the world, takes the second place after lung cancer in our country. A good understanding of the features of this pathogenesis plays an important role in the development of new treatment methods in breast cancer. In recent years, “Human Epidermal Growth Factor Receptor-2” (HER2) status, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) levels have been important prognostic factors.

Combination therapy is the way in which two or more drugs or methods are used that has gained momentum in recent years. One of the most important aspects of this treatment is that it reduces the development of drug resistance, as the tumor or a pathogen will be less likely to resist more than one drug at the same time.

Tamoxifen, an estrogen blocking and non-steroid compound, has been used to treat patients with hormone receptor positive breast cancer for nearly 20 years.

Deinoxanthin is a xanthine derivative isolated from the S-layer in the cell wall of the radiation-resistant bacteria *Deinococcus radiodurans*. Studies have shown that this xanthine derivative shows pro-apoptotic and anti-proliferative effects on some types of cancer.

Within the scope of the thesis, the anti-cancer and anti-proliferative synergistic effects of Tamoxifen and Deinoxanthin on the MDA-MB-453 breast cancer cell line were investigated. In this context, as a result of applying single and combinations of substances to cell culture; Investigation of expression levels and protein levels of *Bax*, *Bcl2*, *Caspase 3* and *HER2* genes were carried out by RT-qPCR and ELISA methods.

2020, 72 Pages

Keywords: Breast Cancer, Deinoxhantin, HER2, MDA-MB-453, Tamoxifen

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam da desteğini ve yardımını hiç bir zaman eksik etmeyen, bilgi ve tecrübelerinden her daim faydalanabildiğim çok değerli danışman hocam, sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KUZUCU'ya sonsuz teőekkürlerimi sunmaktayım. Tez süresince benden desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Murat ÇANKAYA'ya teőekkürü bir borç bilirim. Hücre kültürü çalışmalarının her aşamasında yardım ve desteklerini esirgemeyen sayın Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZGÜR ve Dr. Ahmet ÇETİN'e teőekkürlerimi sunarım. Deinoksantin üretimi ve saflaőtırılmasında bana her zaman destek veren Seda KILINÇ'a yardımlarından dolayı çok teşekkür ediyorum.

Lisans üstü eğitimim süresince beni her zaman destekleyen sevgili babam Yaőar Faruk GÜNAY ve her daim yanımda olan sevgili annem Nermin GÜNAY'a sabır ve anlayıőlarından dolayı sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Ayrıca FLY-2019-643 nolu proje ile bana maddi kaynak sağlayarak tezimi tamamlamamı sağlayan Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri yönetimine teőekkürlerimi sunarım.

Nihan GÜNAY

Temmuz, 2020

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Meme Kanseri	4
2.2. Meme Kanserinin Reseptör Bakımından Sınıflandırılması.....	8
2.2.1. Luminal A	8
2.2.2. Luminal B	9
2.2.3. HER2 pozitif	9
2.2.4. Üçlü negatif-Bazal benzeri	10
2.3. Meme Kanserinde Evreleme	11
2.4. Kanser Mekanizması	13
2.5. Genetik Değişiklikler	14
2.6. Kanserde Önemli Reseptör Çeşitleri	14
2.6.1. Östrojen reseptörleri	15
2.6.2. Progesteron reseptörleri	15
2.6.3. HER2	16
2.7. Meme Kanserinde Tedavi Yöntemleri	18
2.7.1. Meme kanserinde radyoterapi.....	18
2.7.2. Meme kanserinde kemoterapi.....	19
2.7.3. Meme kanserinde hedefe yönelik tedaviler	22
2.7.4. Hipertemi	24
2.8. Tamoksifen.....	25
2.9. Deinoksantin.....	29

2.10. Kombinasyonel İlaç Çalışmaları	33
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	38
3.1. Materyal	38
3.1.1. Kullanılan aletler ve cihazlar.....	38
3.1.2. Hücre Hattı	38
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler.....	38
3.2. Yöntem.....	39
3.2.1. Hücre kültürasyonu	39
3.2.1.1. Hücre kültürü koşulları	39
3.2.1.2. Hücre kültürünün pasajlanması.....	40
3.2.1.3. Hücre kültürünün stoklanması	41
3.2.1.4. Dondurulan hücrelerin çözündürülmesi.....	41
3.2.1.5. Hücre sayımı	42
3.2.2. Sitotoksikite çalışmaları.....	42
3.2.2.1. Uygulanacak kimyasalların hazırlanması	42
3.2.2.2. Hücre canlılık testi	43
3.2.3. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi.....	44
3.2.4. RNA ve cDNA konsantrasyonu ve saflığının tespiti	46
3.2.5. Gen ifade düzeylerinin belirlenmesi	46
3.2.6. Protein ekstraksiyonu	48
3.2.7. İstatistiksel hesaplamalar	49
4. BULGULAR.....	50
4.1. Hücre Canlılık Testi	50
4.2. Kombinasyonel Etki Değeri	51
4.3. Gen İfade Düzeyleri	53
4.4. Protein Seviyeleri	55
4. SONUÇ ve TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ	73

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Normal/Kanser Hücresi Bölünmesi	7
Şekil 2.2. Meme Kanserinin Reseptör Bakımından Sınıflandırılması	8
Şekil 2.3. Meme kanseri evreleri.....	11
Şekil 2.4. HER2 Yolağı.....	17
Şekil 2.5. Tamoksifen – Kanser İlişkisi	26
Şekil 2.6. Tamoksifen’in Moleküler Yapısı	28
Şekil 2.7. Deinoksantin Moleküler Yapısı (Betlem vd., 2012).....	31
Şekil 3.1. MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattı mikroskopik görüntüsü.....	40
Şekil 3.2. Steril kabinde hücrelerin pasajlanması	41
Şekil 3.3. Steril kabin de hücre ekimi çalışmaları.....	44
Şekil 3.4. Kombinasyon indeksi değerlendirmesi.....	44
Şekil 4.1. 24. saat MDA-MB-453 üzerine Tamoksifen, Deinoksantin ve T+D’nin anti-kanser aktivitesi.....	50
Şekil 4.2. 48. saat MDA-MB-453 üzerine Tamoksifen, Deinoksantin ve T+D’nin anti-kanser aktivitesi.....	51
Şekil 4.3. 24. saat MDA-MB-453 üzerine Tamoksifen, Deinoksantin ve T+D’nin oluşturduğu CI grafiği.	52
Şekil 4.4. 48. saat MDA-MB-453 üzerine Tamoksifen, Deinoksantin ve T+D’nin oluşturduğu CI grafiği.	53
Şekil 4.5. Tamoksifen, Deinoksantin ve kombinasyonlarının <i>BAX</i> geni ifade düzeyine etkisi.....	53
Şekil 4.6. Tamoksifen, Deinoksantin ve kombinasyonlarının <i>Bcl2</i> geni ifade düzeyine etkisi.....	54
Şekil 4.7. Tamoksifen, Deinoksantin ve kombinasyonlarının <i>HER2</i> geni ifade düzeyine etkisi.....	54
Şekil 4.8. Tamoksifen, Deinoksantin ve kombinasyonlarının <i>Caspaz-3</i> geni ifade düzeyine etkisi.....	55
Şekil 4.9. Tamoksifen, Deinoksantin ve kombinasyonlarının <i>BAX</i> proteini miktarı üzerine etkisi.	55

Şekil 4.10. Tamoksifen, Deinoksantin ve kombinasyonlarının Bcl-2 proteini miktarı üzerine etkisi.	56
Şekil 4.11. Tamoksifen, Deinoksantin ve kombinasyonlarının Caspase-3 proteini miktarı üzerine etkisi.	56
Şekil 4.12. Tamoksifen, Deinoksantin ve kombinasyonlarının HER2 proteini miktarı üzerine etkisi.	57



TABLolar LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Uygulanan kimyasallar ve konsantrasyonları	43
Tablo 3.2. RNA saflaştırma için deney seti kodları	47
Tablo 3.3. Primer dizileri	47
Tablo 3.4. RT-qPCR sıcaklık siklusu.....	48
Tablo 3 5. Protein ekstraksiyonu için deney seti kodları.	48
Tablo 4.1. 24. saat MDA-MB-453 üzerine Tamoksifen, Deinoksantin ve T+D'nin uygulaması sonucu hesaplanan CI değerleri	51
Tablo 4.2. 48. saat MDA-MB-453 üzerine Tamoksifen, Deinoksantin ve T+D'nin uygulaması sonucu hesaplanan CI değerleri.	52
Tablo 4.3. BAX, BCL2, HER2 ve Caspase-3 protein seviyeleri.	57

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
°C	Celsius
µg	Mikro gram
µl	Mikro litre
µM	Mikro molar
dk	Dakika
L	Litre
M	Molar
ml	Mili litre
ng	Nano gram
nm	Nano metre

Kısaltmalar

BRCA1/2	Göğüs Kanseri Duyarlılık Geni 1/2
cDNA	Komplementer DNA
CI	Kombinasyon İndeksi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	Östrojen Reseptörü
ERBB2	Eritroblastik Onkogen B 2
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör 2
HSGM	Halk Sağlığı Genel Merkezi
MDR	Çoklu İlaç Direnci
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PR	Progesteron Reseptörü
RT-qPCR	Ters Transkriptaz Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SERM	Seçici Östrojen Reseptör Modülatörü
TNBC	Triple Negatif Meme Kanseri
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Kanser, normal hücre bölünmesinin aksine kontrolsüz bölünen ve anormal olarak çoğalan hücrelerin neden olduğu bir hastalık grubudur (Lodish vd., 2004). Anormal büyüme ve çoğalma gösteren kanser hücre topluluklarına tümör adı verilir.

Giderek artan dünya nüfusu ve yaşlanma oranı ile birlikte önümüzdeki süreçlerde kanserli vaka oranlarının artış göstereceği ön görülmektedir. Bu da gelecekte kanser kaynaklı ölümlerin sayısının artışı demektir (WHO, 2008). Kanser hastalarını iyileştirmek için cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve alternatif tıp gibi kanser tedavi metotları günümüzde mevcut olup vakaya en uygun yöntem seçilerek tedavi çalışmaları yürütülmektedir. Anti-kanser olarak tanımlanan bazı ilaçlar kemoterapide kullanılmaktadır. Ancak bir çoğunun kesin olarak etki mekanizmaları bilinmemekle birlikte güçlü proliferasyon önleyici etkileri olduğu belirtilmektedir (Borovskaya vd., 2006; Mork vd., 2007; Vetoshkina vd., 2007).

Kullanılan anti-kanser ilaçları kanserli hücreler üzerinde toksik etki gösterme özelliğine sahiptirler. Bir çok kemoterapi ajanı, sağlıklı hücreler üzerinde de toksik etki göstererek hücrelerin bulunduğu organları da tahrip etmektedirler. Bu tür ilaçların yan etkilerinden dolayı ölümlerle sonuçlanan vakalarda mevcut olup, kemoterapi uygulanan bazı hastalarda kullanılan anti-kanser ilaçlara karşı direnç oluştuğu belirlenmiştir. Kemoterapi uygulamasına tabi tutulan hastaların olduğu bir çalışmada hastaların %80'inde iyileşme görülür iken kalan %20'lik kısımdaki hastalarda kanserli hücrelerin ilaçlara direnç geliştirdiği ve ölümcül toksisite oluşturduğu tespit edilmiştir (Korkmaz, 2002).

Kanser hastalığı çeşitlilik göstermekte olup, meme, akciğer, kolektal, rahim, deri vb. türleri mevcuttur. Kanser hastalığına yakalanan kadınlarda en çok görülen kanser türü %30'luk kısımla meme kanseri olarak gösterilmektedir (TÜİK, 2011).

Östrojen reseptörü (ER) ifade düzeyi ile karakterize edilen lümen meme tümörleri, meme kanserlerinin %70'ini oluşturmaktadır ve meme kanseri ölümlerinin çoğundan sorumludur. Endokrin tedavi, metastatik hastalığı olan hastalarda tedavinin temelini oluşturur. Seçenekler arasında selektif ER modülatörleri (tamoksifen gibi), aromataz inhibitörleri ve selektif ER düşürücüler bulunur (İbrahim vd., 2019).

Erken evre meme kanserinin tedavisi ve nükslerin azaltılmasında yaygın olarak kullanılan, tümör östrojen reseptörleri bakımından zengin olan seçici östrojen reseptörü modülatörü Tamoksifen, östrojen reseptörünün aktifleştirici bölgelerinden birine bağlanarak östrojen etkisini engeller. Östrojen reseptörü pozitif meme kanseri olan kadınlara ameliyat sonrası beş yıl boyunca Tamoksifen tedavisi uygulandığında, tekrarlama riski % 47, ölüm riski % 26 azalmaktadır (Ibrahim vd., 2019).

Deinococcus radiodurans, iyonlaştırıcı radyasyona ve oksidatif strese maruz bırakılarak reaktif oksijen türlerine dirençli olarak bilinen bir bakteridir. Bu bakterinin antioksidan gücü, sahip olduğu karotenoidlerle bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Tian vd., 2010).

Ekstrakte edilen karotenoidler arasında en bol bulunan deinoksanthinin, DNA hasarına karşı oldukça güçlü bir koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Ji, 2010).

Deinoksantin antioksidan etkiye sahip olmasının yanı sıra belirli koşullarda pro-oksidatif etki de gösterebilmektedir. Pro-oksidant, ya ROT üreterek ya da antioksidan sistemleri inhibe ederek oksidatif strese yol açan herhangi bir endobiyotik ya da ksenobiyotik anlamına gelir. Oksidatif stres ise apoptozisin stimülasyonunu sağlaması bakımından önemlidir ve birçok çalışma, apoptozisin indüksiyonu sırasında oksidatif mekanizmaların önemli roller üstlendiğini göstermiştir. Yapılan çalışmalarda, deinoksantin pro-oksidant aktivitesine bağlı olarak hücre içi ROT artışına sebep olduğu ve çeşitli kanser hatlarında apoptozisi indüklediği belirlenmiştir (Muller vd., 2002; Nara vd., 2005; Choi vd., 2012; Özcan vd., 2015; Rahal vd., 2014).

Yapılan çalışmalar, β -karoten, fukoksantin, neoksantin ve deinoksantin gibi karotenoidlerin pro-oksidatif etkiye sahip olduğunu ve reaktif oksijen türlerinin üretimini artırarak oksidatif strese neden olduğunu ve böylelikle de kanserli hücreleri apoptoza sürüklediğini göstermiştir.

Yapılan çalışmalarda anti-kanser aktiviteye sahip deinoksantin; prostat kanseri, meme kanseri, kolon kanseri ve hepatoselüler karsinoma hücre hatları üzerinde apoptotik stimülatör olarak davrandığı bildirilmiştir (Choi vd., 2012).

Deinoksantin kemoterapide yardımcı kür maddesi olabilecek bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

Tez çalışması kapsamında Tamoksifen ve deinoksantin MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattında sinerjik etkisinin incelemesi için *BAX*, *BCL2*, *Caspase-3* ve *HER2* genlerinin RT-qPCR ile gen ifade düzeylerine bakılmıştır. *ACTB* geni housekeeping gen olarak kullanılmıştır. ELISA yöntemiyle, *BAX*, *BCL2*, *Caspase-3*, *HER2* proteinlerinin miktarları tespit edilerek RT-qPCR sonuçları ile mukayese edilmiştir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Meme Kanseri

Global bir tehlike haline gelen ve milyonlarca insanın hayatını kaybetmesine neden olan kanser, mortalite nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra gelmektedir (Merey, 2002).

Bütün dünyada kadınlarda en çok görülen malignite olan meme kanseri ve erken evre metastatik hastalığı olmayan hastaların yaklaşık %70-80'inde tedavi başarılı olmaktadır. Uzak organ metastazları olan meme kanseri, mevcut tedavi yöntemlerinin başarısız olması ve %15'lik mortalite oranıyla akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (Hortobagyi, 2005; Jemal, 2007).

2013 verilerine göre, ülkemizde meme kanseri kadınlarda en sık rastlanılan kanser türü olup bu hastalığa yakalanan kadınların yaklaşık %25'nin HER2 pozitif meme kanseri olduğu bilinmektedir (Gültekin, 2014).

Hereditör meme kanseri olgusu toplam vaka sayısının %10'u olmakla birlikte bu kişilerde genellikle *BRCA-1* ve *BRCA-2* genlerinin mutasyonuna rastlanılmaktadır. *BRCA-1* ve *BRCA-2* genleri meme kanseri gelişimini engelleyen tümör supresör genlerdir. *BRCA-1* ya da *BRCA-2* gen çiftlerinden birinin mutasyona uğrayarak bozulması meme ve/veya yumurtalık kanseri geliştirme riskini çok büyük ölçüde artırmaktadır. Bu hastalarda meme kanserinin oluşma ihtimali; *BRCA-1* mutasyonu varlığında %72, *BRCA-2* mutasyonu varlığında %69'dur (Kuchenbaecker vd., 2017).

Zararlı bir *BRCA-1* veya *BRCA-2* mutasyonu, bir kişinin annesinden veya babasından miras kalabilir. Bu genlerden birinde mutasyon taşıyan bir ebeveynden her çocuğun, mutasyonu kalıtım yoluyla alma olasılığı % 50'dir. *BRCA-1* ve *BRCA-2*'de ki mutasyonların etkileri, bir kişinin o geninin ikinci kopyası normal olduğunda bile görülebilmektedir (Ulusal Kanser Enstitüsü, 2018).

Meme lezyonlarının tanımlanması meme kanserinin oluşumu açısından önem arz etmektedir. Duktusda ve lobüllerde meydana gelen lezyonların karsinogeneze dönüşümü ihtimali yüksektir (Breast Cancer, 2018).

Duktal karsinom In situ, meme kanserinin çok erken bir evresi olup meme kanalında mamografide saptanabilen karakteristik desenler oluşturan anormal hücreleri ifade eder. Bu öncül karsinomlar duktus kanallarının içinde bulunmaktadır ve diğer meme dokularına yayılmaya başlamamıştır (Breast Cancer, 2018).

Lobüler karsinom In situ, süt üretiminin gerçekleştirildiği hücrelerin değişikliği anlamına gelmektedir. Bu lezyonlar kanser olmamakla birlikte meme kanserinin oluşma riskinin arttığını göstermeleri açısından önemlidir. Bazen de bu durumun aksine Lobüler karsinoma hastalarının birçoğunda meme kanserinin gelişmediği raporlanmıştır (Breast Cancer, 2018).

Meme kanserinde en sık rastlanan çeşit; invazif meme kanseridir. Genel olarak meme kanseri ile invazif meme kanseri terimleri aynı durumu ifade etmektedirler. İnvazif lobüler karsinom ve invazif duktal karsinom en sık rastlanılan alt türlerdir. Meme kanserleri arasında en sık karşılaşılan tür olan invazif duktal meme kanseri, toplam tanının yaklaşık %70-80'ini oluşturmaktadır. İnvazif duktal meme karsinomu, duktus kanallarının çeperlerindeki hücrelerde ortaya çıkarak çevresindeki meme dokusuna yayılım gösteren bir kanser çeşididir. Toplam tanı koyulan meme kanseri hastalarının %0,1'in de invazif lobüler karsinom görülmektedir. İnvazif lobüler kanserin en sık karşılaşıldığı yaş aralığı 45-55 olarak ortaya çıkmaktadır (Kanser Vakfı, 2014).

Kronik inflamasyon temelli meme kanseri toplam vakaların yaklaşık olarak %1-4'ünü oluşturmaktadır. Hastalık seyrinde meydana gelen şişliklerin oluşmasına neden olan etken karsinomaların kılcak lenf damarlarını tıkamasıdır. Böyle olgularda inflamasyon memede kızarıklık, şişlik, sert ve sıcak bir meme dokusu oluşumuna sebep olmaktadır (Kanser Vakfı, 2014).

Meme kanseri komorbiditesinde %1-4 oranında rastlanılan Paget hastalığı meme başında veya meme başının etrafındaki koyu alanda (areola) ortaya çıkmaktadır. Kırmızı, pullu döküntü şeklinde başlayan, kaşıntı ve ardından yara oluşumu ile tanımlanabilen Paget hastalığı, görünüm olarak sedef hastalığı veya egzamaya çok benzemektedir. Paget hastalığı, bazen meme başının arkasındaki bir meme dokusunda kanser oluşumunun işareti olabilmektedir. Birçok hastada Paget hastalığı, meme kanseri veya duktal karsinom In situ'nun önemli bir belirtisidir (Kanser Vakfı, 2014).

Tedavi çeşidinin belirlenmesi büyük bir önem arz ettiğinden bilim insanları meme kanseri çeşitlerinin tanımlanmasında farklı parametreler kullanmışlardır. Nadir görülen meme kanserleri, özel tip; yaygın görülen meme kanserleri ise özel olmayan tip olarak adlandırılmıştır. Nadir görülen özel tip meme kanserlerinde spesifik özelliklere sahip hücreler bulunmaktadır (Kanser Vakfı, 2014).

Nadir meme kanseri tipleri şunlardır; (Turkcerrahi, 2020)

- Medüller
- Musinoz
- Adenoid kistik
- Tübüler
- Metaplastik
- Anjiyosarkom
- Bazal tip
- Filloides veya sistosarkoma filloides
- Papiller

Medüller meme kanseri; BRCA-1 gen mutasyonu ile ilişkili olduğu bilinen bu kanser türünde klasik meme kanseri tedavisi uygulanır. Tüm invaziv meme kanserleri içerisinde % 4 oranında rastlanılmaktadır.

Müsinöz meme kanseri; büyüme ve yayılım açısından yavaş seyreden bir türdür. Müsinoz meme kanseri, invaziv meme kanseri vakalarının tümünde %2 oranında rastlanılmaktadır. Vakalarda hormon reseptörü % 66 pozitifdir.

Adenoid kistik meme kanseri; çok nadir görülen bir tür olan adenoid kistik meme kanseri tüm meme kanserlerinin %0,1-1'ini oluşturmaktadır. Çoğunlukla yavaş büyüme eğilimindedirler.

Tübüler meme kanseri; lobüler karsinom ve duktal karsinom türlerinin prognozundan çok daha iyi olan tübüler karsinom, invaziv meme kanserlerinin %2'sini oluşturmaktadır. Nüks ihtimali düşüktür.

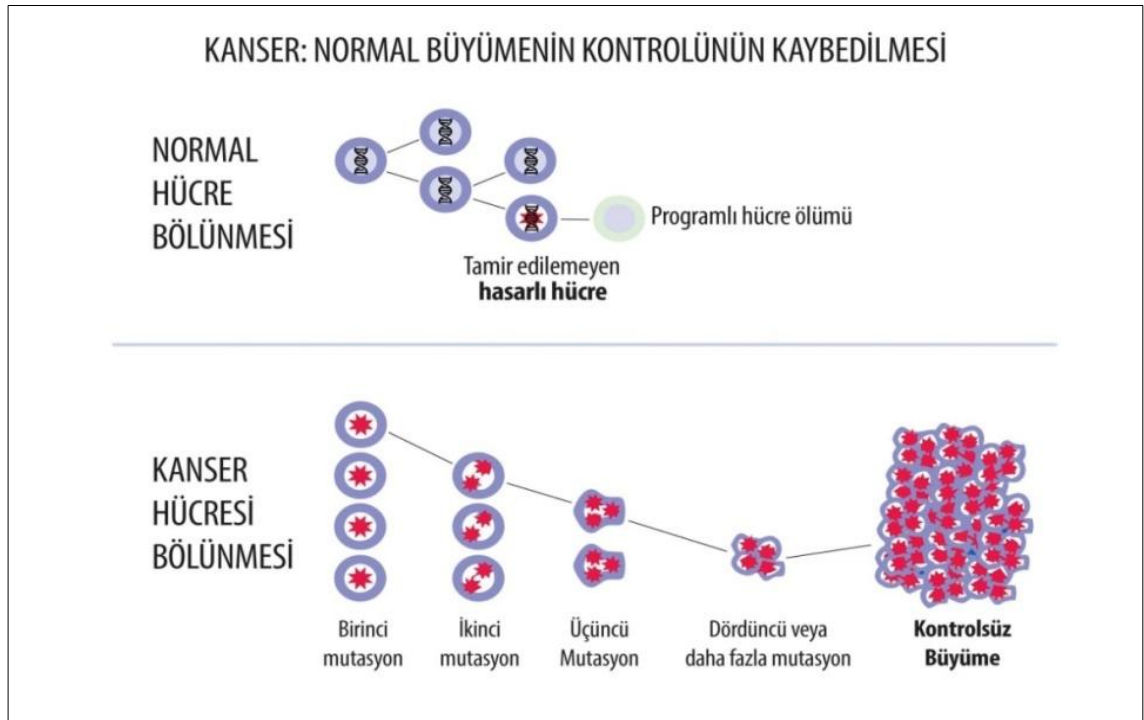
Metaplastik meme kanseri; 2 farklı doku türünden oluşan heterojen bir gruptur. Metaplastik meme kanseri, invaziv duktal karsinomun tedavi şekli baz alınarak tedavi edilse de bazı durumlarda daha agresif tedaviler uygulanabilmektedir (Acar vd., 2018).

Memenin anjiosarkomu; anjiosarkomlar, damar dokusunu oluşturan hücrelerde ortaya çıkan ve damar yapısını taklit eden, oldukça nadir görülen malign tümörlerdendir. Sarkomlar, kemik, bağ dokusu, sinirler, kan damarları gibi yapısal ve destek dokuların kanseridir.

Bazal tip meme kanseri; P53 geninin mutasyonu sonucu oluşmaktadır. Bazal tip meme kanseri hücreleri HER2, östrojen ve progesteron reseptörleri taşımadıkları için triple negatif olarak da kendilerini göstermektedirler.

Filloides veya sistosarkoma filloides; tüm meme tümörlerinin yaklaşık %1'ini oluşturan filloidesler hem benign hem malign olabilen tümör türleridir.

Papiller meme kanseri; yavaş gelişim gösteren papiller meme tümörlerine sıkça ileri yaş kadınlarda rastlanılmaktadır. Tüm meme kanserlerinin %1-2'sini oluştururlar (Akagi vd., 2009).

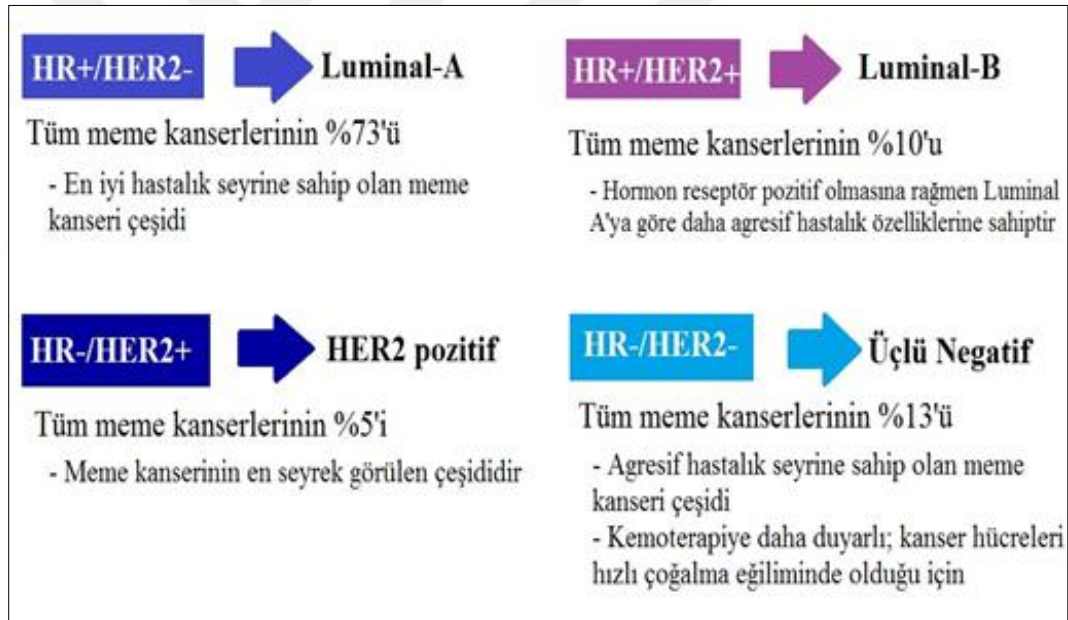


Şekil 2.1. Normal/Kanser Hücresi Bölünmesi

2.2. Meme Kanserinin Reseptör Bakımından Sınıflandırılması

Perou ve arkadaşlarının (2000) yaptıkları çalışma öncesine kadar meme kanseri östrojen hormonuna duyarlı veya duyarsız olarak incelerken, günümüzde bu veri yapılan çalışmalar neticesinde değişikliğe uğrayarak meme kanserlerinin, hücre yüzeylerinde taşıdıkları veya taşımadıkları reseptörlere göre ayrılan 4 ana türü olduğu keşfedilmiştir.

1. *Luminal A*: Hormon reseptörüne duyarlı tümörler (HR pozitif)
2. *Luminal B*: Hormon reseptörüne zayıf duyarlı ve/veya aynı zamanda HER2 reseptörü taşıyan tümörler (HER2 pozitif)
3. *HER2 pozitif*: Hormon reseptörüne duyarsız, HER2 reseptörü taşıyan tümörler
4. *Üçlü negatif*: Hormon ve HER2 reseptörü taşımayan tümörler



Şekil 2.2. Meme Kanserinin Reseptör Bakımından Sınıflandırılması

2.2.1. Luminal A

Luminal A tümörleri, meme kanallarını kaplayan luminal (iç) hücrelerde başlayan meme kanserlerine en çok benzeyen hücrelerdir. Meme kanserlerinin yaklaşık %70'i lümen A tümörleridir (Voduc vd., 2010; Foukakis ve Bergh 2019).

Luminal A meme tümörleri, hormon reseptör pozitif, HER2 negatiftir ve kanser hücrelerinin ne kadar hızlı büyüdüğünü kontrol etmeye yardımcı olan düşük seviyelerde Ki-67 proteinine sahiptirler. Dört ana alt tipten biri olan luminal A kanserleri, düşük derecelidir, yavaş büyür oldukça yüksek sağkalım oranları ve oldukça düşük nüks ihtimalleri ile en iyi prognoza sahip olma eğilimindedir (Voduc vd., 2010; McGuire vd., 2017).

2.2.2. Luminal B

Luminal B meme kanseri, hormon reseptör pozitif, HER2 pozitif ve yüksek Ki-67 seviyeleri vardır. Meme kanserlerinin yaklaşık %10'u luminal B tümörleridir (Voduc vd., 2010; Foukakis ve Bergh 2019).

Luminal B kanserleri genellikle luminal A kanserlerinden daha hızlı büyür ve prognozu biraz daha kötüdür. Luminal B tümörü olan kadınlarda genellikle luminal A tümörü olanlardan daha genç yaşta teşhis konulabilmektedir (Metzger-Filho vd., 2013; Partridge vd., 2016). Luminal B tümörü olan kadınlar, luminal A tümörü olanlara göre yüksek olmasa da oldukça yüksek sağkalım oranlarına sahip olma eğilimindedirler (Metzger-Filho vd., 2013; McGuire vd., 2017).

Luminal A tümörleri ile karşılaştırıldığında, luminal B tümörleri bazı daha kötü prognoza yol açan faktörlere sahiptirler, bunlar; (Haque vd., 2012).

- Kötü tümör derecesi
- Daha büyük tümör boyutu
- Lenf nodunun pozitifliği

2.2.3. HER2 pozitif

Hormon reseptör negatif ve HER2 pozitif olan HER2 pozitif kanserler, lümen kanserlerinden daha hızlı büyüme eğilimindedir ve daha kötü bir prognoza sahip olabilirler ancak HER2 proteinini hedefleyen terapiler ile başarıyla tedavi edilebilmektedirler. HER2 reseptörü bakımından zengin tümörlerin çoğu HER2

pozitifdir ve bu nedenle bu adla adlandırılmıştır ancak %30'u kadarı HER2 negatif olabilmektedir (Foukakis ve Bergh, 2019).

- Lenf nodu pozitif
- ER (-)
- PR (-)
- Kötü tümör derecesi

Meme kanserlerinin yaklaşık %5-15'i HER2 pozitiftir. HER2 pozitif olan kadınlara lümen A ve lümen B tümörleri olanlardan daha genç yaşta tanı konulabilir (Metzger-Filho vd., 2013; Patridge vd., 2016).

2.2.4. Üçlü negatif-Bazal benzeri

Üçlü-negatif/bazal benzeri meme kanseri, hormon reseptör negatif ve HER2 negatiftir. Bu kanser türü *BRCA-1* gen mutasyonları olan kadınlarda daha yaygındır. Araştırmacılar nedeninden emin olamamaları da bu kanser türünün genç ve siyahi kadınlar arasında daha yaygın olduğunu saptamışlardır (Partridge vd., 2016; Kohler vd., 2015; Scott vd., 2019).

Bazal benzeri tümörler, meme kanallarını çevreleyen bazal (dış) hücrelerine benzeyen hücrelere sahiptir. Çoğu üçlü negatif tümör bazal benzeri ve çoğu bazal benzeri tümör ise üçlü negatiftir (Voduc vd., 2010; Foukakis ve Bergh, 2019).

Meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'si üçlü negatif/bazal benzeridir. Bu tümörler daha sık görülme eğilimindedirler. Üçlü negatif/bazal benzeri tümörler sıklıkla agresiftir ve ER pozitif alt tiplere kıyasla daha kötü prognoza sahiptir. Ancak başarılı bir şekilde tedavi edilebilirler (Voduc vd., 2010; McGuire vd., 2017; Anders ve Carey, 2019).

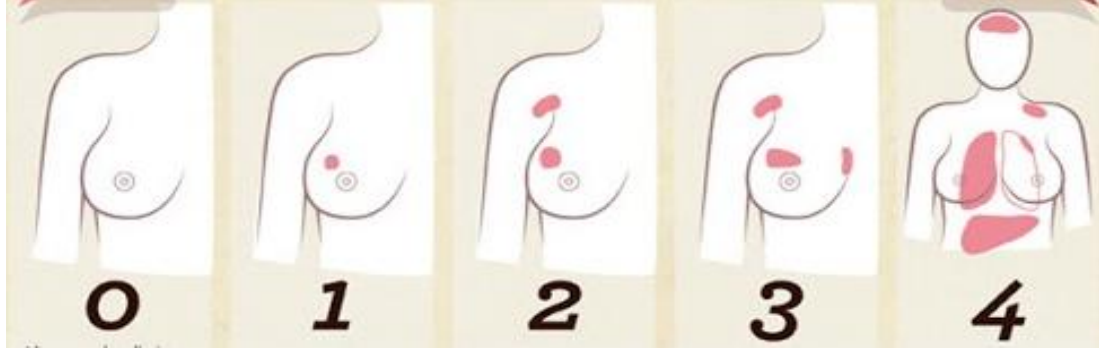
López-Ozuna ve arkadaşları (2016), triple-negatif meme kanseri hastalarında prolaktin hormon reseptörlerinin hayatta kalma süresinin artmasında ve tedavi yönteminin seçilmesinde önemli bir marker olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışma triple-negatif meme kanserinin alt türlerinin varlığına önemli bir delil sayılabilmektedir.

2.3. Meme Kanserinde Evreleme

Kanserde ki evreler, kanser tedavisinin belirlenmesinde ve bu tedavi süreçlerinin yürütülmesinde oldukça önem arz etmektedir. Tümör düğümü metastazı (TNM) sistemi, 1942'den başlayarak Pierre Denoix tarafından geliştirilmiştir, hastalık prognozunu etkilediği düşünülen malign tümörlerin başlıca morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır (Singletary ve Connolly, 2006).

Kanser de evreleme sisteminde üç ana veri baz alınır. TNM olarak adlandırılan bu sistem de, tümörün boyutunu (T), lenf bezlerine etkisini ve derecesini (N), metastazını (M) tanımlamak için kullanılır. T evresi tümörün oluşum gösterdiği bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. N ve M evresinde PET-Pozitron Emisyon Tomografi oldukça fayda sağlamaktadır (Singletary ve Connolly, 2006).

En erken evre kanserlerine karinoma in situ yani evre 0 denilmektedir. Bunu takiben evre I (1) ila IV (4) arasında derecelendirilir ve a, b, c harfleri ile alt aşamalara da ayrılmaktadır.



Şekil 2.3. Meme kanseri evreleri

Moleküler düzeyde, meme kanseri heterojen bir hastalıktır; insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (ERBB2 tarafından kodlanan HER2) aktivasyonu, hormon reseptörlerinin aktivasyonu ve/veya *BRCA* gen mutasyonlarını içermektedir.

Tedavi stratejileri moleküler alt tipe göre farklılık gösterir. Meme kanseri yönetimi multidisiplinerdir; lokomotif (cerrahi ve radyasyon tedavisi) ve sistemik terapi yaklaşımlarını içerir.

Geliştirilen tanı ve tedavi yöntemleri vasıtasıyla meme kanseri ölüm vakalarında belirgin azalmalar gözlemlenmektedir. Tümör özelliklerinin çok daha iyi anlaşılmasıyla yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir. Son yıllarda lenfovasküler invazyon durumu, ER, PR düzeyleri ve HER2 durumu da önemli prognostik faktörler olmuştur (Ravdin vd., 2007).

Östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PR) ifade eden tümörler, hormon reseptörü pozitif meme kanserleri olarak kabul edilmektedir.

ER, PR veya HER2'yi ifade etmeyen tümörler, triple negatif meme kanseridir (TNBC).

Östrojen ve progesteron reseptörlerinin durumunun tayini, tedavi planının belirlenmesi açısından çok önemli olup incelemenin rutin bir parçası olmuştur. Hormon reseptörü pozitif olan tümörlerde hormonal tedavi ile yanıt oranı, negatif olanlara göre oldukça yüksektir (Dowsett vd., 2006). Hormon reseptörünün ifade düzeyinin miktarı arttıkça hormonal tedaviye yanıt oranı artmaktadır. Hormon reseptörü negatif olan hastalar ise adjuvan kemoterapiden daha fazla fayda görmektedir (Berry vd., 2006).

Hastalığın erken evreden ileri metastatik düzene kadar evrimi karmaşıktır ve birçok yönden farklı bir hastalığın gelişmesine yol açar. Bu hastalık evrimi, değiştirilmiş gen ifade düzeyi ve yeni mutasyonların edinilmesi de dahil olmak üzere bir takım özellikler ile işaretlenmiştir; bu, artmış proliferasyona, metastaz oluşumuna ve en önemlisi tedavi direncinin gelişmesine neden olabilir (Hart vd., 2015).

Geçtiğimiz 10-15 yıl boyunca tedavi kavramları, bu heterojenliği hesaba katarak, tedavinin olumsuz etkilerini azaltmak için daha biyolojik olarak yönlendirilen tedavilere ve tedavinin azaltılmasına önem vermiştir. Ayrıca ölüm oranlarına bakıldığında, HER2-pozitif hastalığa sahip meme kanseri alt tipleri daha yüksek ölüm oranıyla ilişkilirken, bu oranı sırasıyla TNBC, lümen A ve lümen B alt tiplerinin takip ettiği gözlemlenmiştir. (Harbeck vd., 2019).

Kanserin gelişim sürecinde meydana gelen bölünme, apoptoz ve göç gibi mekanizmaların çözülebilmesi için meme kanseri hücre hatları araştırma amaçlı kullanılmaktadırlar. Bu vasıtayla genler ve hücrede meydana gelen süreçleri düzenleyen sinyal yolları hakkında veriler elde edilmesi sağlanmıştır ve devam eden çalışmalarla bu

veri akışı artmaktadır. İstenilen hücre hatlarının göreceli olarak genetik muamelelerle uyumlu çoğaltılabilmesi, şartları iyi hazırlanmış deneysel koşullar altında tekrar tekrar üretilen, gözlemlenebilen, sayılabilen sonuçlar sağlamaktadır.

2.4. Kanser Mekanizması

Meme kanserinin başlatıldığı mekanizma bilinmemektedir; bununla birlikte, meme kanserini moleküler olarak karakterize etmek, oluşumunu ve ilerlemesini sınırlandırmak için çok çaba sarfedilmektedir (Harbeck vd., 2019).

Kökü hücre düzeyinde, klonal evrim modeli (mutasyonların biriktiği, tümör hücrelerinde epigenetik değişiklikler meydana geldiği ve en uygun hücrelerin hayatta kaldığı) ve kanser kök hücre modelinde (sadece prekürsör kanser hücrelerinin ilerlemesini başlatıp sürdürdüğü) kanser kök hücrelerinin aynı zamanda klonal bir şekilde evrimleşebildikleri gerçeğiyle oldukça komplikedir (Harbeck vd., 2019).

Morfolojik düzeyde, normal bezlerden kansere kadar süreklilik gösteren bir lezyon ve genetik modifikasyon vardır (Harbeck vd., 2019).

Moleküler düzeyde, meme kanserinin, esasen ER ifade düzeyi, tümör derecesi ve proliferasyonu ile ilgili iki farklı moleküler progresyon yolu boyunca geliştiğini gösteren kanıtlar vardır (Harbeck vd., 2019).

ER sinyal yolu, çoğalmayı teşvik etmek ve hayatta kalma avantajı elde etmek için ER + meme kanseri hücrelerinde kullanılan bir özellik olan hücre büyümesini ve fonksiyonunu sürdürmek için karmaşık ve son derece bütünleşik sinyal yolları ile entegredir (Osborne ve Schiff, 2011).

En sık görülen meme kanseri histolojisi, invaziv duktal karsinomdur (% 50-75), bunu invazif lobüler karsinom izler (% 5-15'), kalan kısmı duktal/lobüler karsinomlar ve diğer nadir histolojiler oluşturur (Romond vd., 2005).

2.5. Genetik Değişiklikler

Tümör hücrelerinde en sık mutasyona uğramış genler şunlardır; *GATA3* (% 10), *FGFR1* (% 11), *ERBB2* (% 13), *CCND1* (% 16), *PTEN* (% 16), *MYC* (% 20), *PIK3CA* (% 30), *TP53* (% 41) (Nik-Zainal vd., 2016).

Bu genler, bastırılmış (örneğin, *p53*) veya aktive edilmiş (örneğin, siklin D) hücre çoğaltan modülatörleri kodlar, proliferasyonu sürdürür ve/veya apoptozu inhibe eder, aktive olan onkojenik yolları inhibe eder (*MYC*, *HER2* ve *FGFR1*) veya artık bastırılmayan faktörleri engeller (*PTEN*) (Harbeck vd., 2019).

Luminal A tümörleri yüksek *PIK3CA* mutasyonları prevalansına (% 49) sahipken, *TP53* mutasyonlarının yüksek prevalansı bazal benzeri tümörlerin ayırt edici özelliğidir. Diğer epigenetik mekanizmalar, kromatin yapısının sessizlik gen ifade düzeyinde ve nükleozomal remodelinde değişikliklere neden olarak DNA metilasyonu ile histon kuyruğu modifikasyonlarını içerir. Bu değişiklikler geri dönüşümlü, enzimli ve potansiyel olarak hedeflenebilir (Harbeck vd., 2019).

2.6. Kanserde Önemli Reseptör Çeşitleri

Sporadik meme kanseri için ana risk faktörleri hormona maruz kalmayla bağlantılıdır. Meme kanseri hücrelerinde adaptif veya edinilmiş değişiklikler östrojene duyarlılığın değişmesine neden olabilir, böylece büyümeye izin vermek için sadece çok düşük seviyelerde hormonlar gerekir veya ligand bağlanmasından bağımsız hücre büyümesine neden olur (Chan vd., 2002).

Hormonlar vücutta kimyasal uyarılar olarak işlev gören maddelerdir. Vücudun çeşitli yerlerindeki hücrelerin ve dokuların hareketlerini etkiler, genellikle kan dolaşımıyla hedeflerine ulaşırlar. Hormonlar ergenlik, adet döngüsü ve hamilelik sırasında meme gelişimini uyarır. Adet döngüleri sırasında, östrojen ve progesteron arasındaki dengesizlik hücre proliferasyonunu artırır ve DNA hasarı birikimine neden olabilir. İşlemin her döngüde tekrarlanmasıyla, malign hücrelerde mutasyonlara yol açan hatalı bir onarım işlemi ortaya çıkabilir. Bu aşamada östrojen, bu hücrelerin büyümesini ve kanser gelişimini destekleyen stromal hücrelerin çoğalmasını uyarır (Harbeck vd., 2019).

Ligand bağlanmasıyla aktive edildiğinde, östrojen reseptörleri, spesifik genlerin promotör bölgesinde bulunan östrojen tepki elemanları ile etkileşime girerek gen ifade düzeyini modüle edebilir. Hücre dışı sinyaller ayrıca östrojen yokluğunda östrojen reseptörlerinin ifadesini ve aktivasyonunu uyarabilir. Ayrıca, östrojen reseptörleri proliferasyon ve apoptotik süreç represörlerinin ifade düzeyini artıran büyüme faktörü reseptörleri ile etkileşime girebilmektedir (Harbeck vd., 2019).

2.6.1. Östrojen reseptörleri

Östrojen hormonu vasıtasıyla aktive edilen östrojen reseptörleri (ER), hücrelerin içinde bulunan bir grup proteindir (Dahlman-Wright vd., 2006).

Östrojen, kadınlarda ve erkeklerde farklı vücut sistemlerinde çeşitli eylemler uygulayarak normal gelişim ve fizyolojinin önemli bir modülatörü olan pleiotrofik bir steroid hormondur (Singh vd., 2008).

Meme kanserlerinin yaklaşık % 65'i östrojen reseptörü alfa (ER α) pozitifdir ve büyüme için ER α sinyaline bağlıdır. Klinik veriler, başka bir hormon reseptörünün progesteron reseptörü (PR) ile birlikte ifade edildiğinde ER α pozitif meme kanserlerinin daha iyi bir prognoza sahip olduğunu göstermektedir. Son çalışmalar, ligand progesteronun varlığında PR'nin ER α kromatin bağlanması ve transkripsiyon aktivitesini yönlendirdiğini, böylece prognozu ve terapötik yanıtı etkilediğini göstermektedir (Young vd., 2018).

2.6.2. Progesteron reseptörleri

NR3C3 veya nükleer reseptör alt ailesi 3, grup C, üye 3 olarak da bilinen progesteron reseptörü (PR), hücrelerin içinde bulunan bir proteindir. Steroid hormon progesteronu tarafından aktive edilir.

İnsanlarda PR, 11q22 kromozomunda bulunan tek bir *PGR* geni tarafından kodlanır, (Misrahi vd., 1987; Law vd., 1987). Moleküler ağırlıklarında farklılık gösteren iki izoformu vardır; PR-A ve PR-B (Gadkar-Sable vd., 2005). PR-B, progesteronun etkilerinin pozitif düzenleyicisidir, PR-A ise PR-B'nin etkilerini antagonize etmeye yarar (Falcone ve Hurd, 2013).

Progesteronun yumurtlama, meme bezi gelişimi, gebeliğin oluşması ve sürdürülmesi gibi çeşitli olaylarda önemli bir rolü vardır. Ayrıca erkek üreme olaylarının rolü hakkında ki veriler de birikmektedir. Progesteron ve meme kanseri, hormona bağlı kanserler kavramı ilk kez geliştirildiğinden beri bağlantılıdır (Huggins ve Scott, 1945; Huggins vd., 1962).

Kadınlarda progesteronun genellikle kanser gelişimine karşı koruyucu bir etkisi olduğu düşünülmektedir (Kaufman vd., 1980). Ve insan meme kanserinde progesteron reseptörlerinin (PR) varlığı hormon bağımlılığı ve uzun süreli sağ kalım ile ilişkilidir (Horwitz vd., 1975; Clark vd., 1983).

PR'ler, hastanın progestasyonel durumuna bakılmaksızın meme kanserlerinin iyi prognostik belirteçleri olarak kabul edilmektedir (Jacobsen vd., 2004).

PR-A ve PR-B normal memede eş miktarlarda bulunur ancak ilerlemiş hastalıkta oranları değişmektedir. PR-A açısından zengin tümörleri olan hastalar, PR-B'ye özgü tümörleri olan hastalardan çok daha hızlı hastalık nüksüne sahiptir ve hastaliksız sağ kalım oranları zayıftır (Jacobsen vd., 2004; Anderson, 2002).

Meme kanserinde PR-A ve PR-B ayrıca estradiol tarafından düzenlenir (Vienonen vd., 2002).

Lydon vd. (1999) tarafından yapılan çalışmalarda bir kanserojen tarafından indüklenen meme tümörlerinin başlatılması için hücre içi sinyal yollarının zorunlu aracılığı olarak PR'lerin önemli bir rolünün olduğu belirtilmiştir.

Östradiol ve progesteronun normal memenin ve ER α ve PR izoformlarının ifade düzeylerinin kontrol edildiği mekanizmaların etkilerine aracılık eden faktörlerin açıklanması, meme kanseri önleme ve meme kanseri riskinin önceden tahmin edilmesinde yeni hedeflerin belirlenebileceği düşünülmektedir (Anderson, 2002).

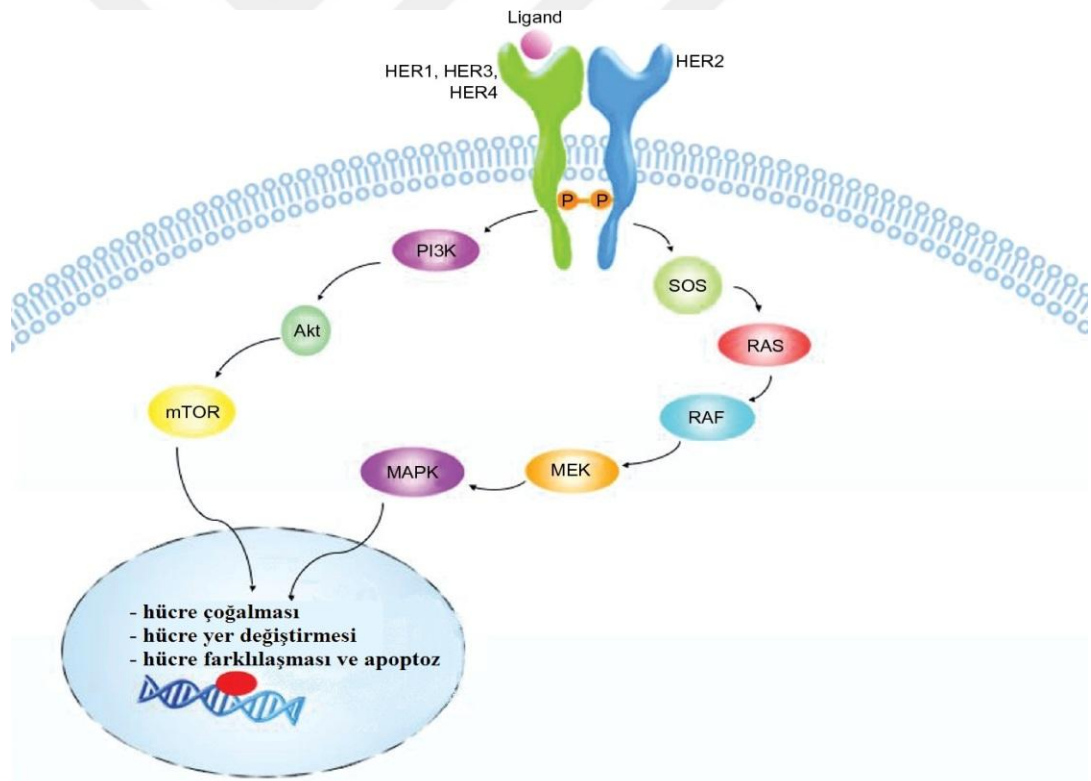
2.6.3. HER2

HER2 yolunun aktivasyonuna neden olan ERBB2, meme kanserlerinin yaklaşık % 13-15'ini oluşturmaktadır (Harbeck vd., 2019).

HER2, epidermal büyüme faktörü reseptörü HER1 ile HER3 ve HER4, insan epidermal büyüme faktörü ailesinin bir üyesidir. Bu proteinler, bir transmembran alanı, hücre dışı bir ligand bağlama alanı ve bir tirozin kinaz hücre içi katalitik alanı içerir. Ligand bağlanmasının ardından dimerizasyon yoluyla gerçekleşen HER2 aktivasyonunda HER2 için özel bir ligand tanımlanmamıştır (Harbeck vd., 2019).

HER2 sinyali, RAS yolu ve protein kinaz B (AKT) - fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) – mitojenle etkinleştirilen protein kinaz (MAPK) yolu gibi farklı yollar vasıtasıyla hücre sağkalımı, proliferasyon, metastaz ve yapışmayı aktive etmektedir (Harbeck vd., 2019).

HER2'yi hedef almanın, proteinin aşırı ifadesi veya gen amplifikasyonu ile tanımlanan HER2-pozitif meme kanserlerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (Harbeck vd., 2019).



Şekil 2.4. HER2 Yolağı

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörünün (Her1/3/4) hücre dışı alanına ligand bağlanması, aktif HER2 heterodimerlerinin oluşumunu stabilize eder. Fosforilasyon, mitojenle aktifleştirilen protein kinazı (MAPK) ve fosfatidilinositol-3-kinaz (Pi3K) -Akt

yollarını aktive eden adaptör veya efektör proteinler (SOS ve Pi3K) için bağlanma yerleri oluşturur. Bu yolaklar, hücre proliferasyonu, yer değiştirmesi, farklılaşması ve apoptozu yönlendiren genlerin transkripsiyonunda azalma yönünde sonuçlanır (Ottini vd., 2010).

2.7. Meme Kanserinde Tedavi Yöntemleri

2.7.1. Meme kanserinde radyoterapi

Yüksek doz röntgen ışını (X ışını) kullanılarak uygulanan radyoterapi, nüksü engellemek ve varlığını koruyabilen kanser hücrelerini öldürmek amacıyla kullanılmaktadır. Genellikle cerrahiden 1 ay sonra radyoterapiye başlanır. Radyoterapi 3-6 hafta boyunca sürerek, her hafta 3-5 seans uygulanır. Her radyoterapi seansı bir kaç dakika sürmektedir (Turkcerrahi, 2020).

Meme kanserinde uygulanan radyoterapi çeşitleri;

Göğüs Duvarı Radyoterapisi: Mastektomi sonrası yapılan uygulamadır

Meme Radyoterapisi: Lumpektomi ardından kalan memeye uygulanır.

Breast Boost: Lumpektomi sonrası ek olarak yapılan radyasyon uygulanmasıdır.

Lenf Nodlarına Yönelik Radyoterapi: Aksilla da meydana gelen lenf nodu metastazı için uygulanan radyoterapidir. Bazen supraklaviküler ve internal mammarian lenf nodlarına da radyoterapi uygulanabilmektedir.

Meme kanseri radyoterapi teknikleri;

- *3-boyutlu konformal radyoterapi,* yönteminde hastanın ışınlanması istenilen bölgeler (akciğer, kalp) ve ışınlanması istenmeyen bölgeler tespit edilip ona göre uygun doz dağılımı yapılarak radyoterapi uygulanmaktadır.
- *Yoğunluk ayarlı (IMRT)/görüntü kılavuzluğunda (IGRT) radyoterapi,* konformal tedaviye göre daha karışık ve uzundur. IMRT’de hedeflenen bölge dışında ki bölgeler daha az zarar görmektedir.

- *Breast Brachytherapy (Meme Brakiterapisi, internal radiation)*, konformal ve IMRT gibi yöntemler “external beam radyoterapi” yani dış ışın olarak adlandırılmaktadır ve radyasyon vücudun dışındaki bir makineden gelmektedir. Brakiterapide ise tümöre veya tümör bölgesine uygun ekipmanla yerleştirilen radyoaktif kaynak, riskli alanlara belirlenen sürede yüksek doz ışın verilmesi işlemidir. Meme kanserinde brakiterapi, meme koruyucu cerrahi sonrasında lumpektomi bölgesine uygulanabilmektedir.

Radyoterapinin meme cildinde kızarıklık, kararma, memede ödem ve en önemlisi lenfödem gibi yan etkileri bulunmaktadır (Turkcerrahi, 2020).

2.7.2. Meme kanserinde kemoterapi

Kemoterapi, kanser hücrelerinin varlığına son vermek veya bu hücrelerin gelişimini kontrol altına almak için anti-kanser ilaçlar kullanılarak gerçekleştirilen tedavidir. Meme kanserinde kemoterapi ilaçları sadece memede ki değil tüm vücuttaki kanser hücrelerini öldürmek için kullanıldığından bu ilaçlara sitotoksik ilaçlar da denilmektedir (HSGM, 2017).

Adjuvan Kemoterapi: Meme cerrahisi sonrası uygulanmaktadır. Geride kalan veya vücutta yayılım göstermiş ve görüntüleme teknikleriyle bile tespit edilemeyen kanser hücrelerini yok etmek için kullanılmaktadır. Nüks ve metastazı önlemeye yöneliktir.

Neoadjuvan Kemoterapi: Meme cerrahisinden önce uygulanmaktadır. Neoadjuvan kemoterapi özellikle lokal ileri meme kanserlerinde uygulanır. Tümörün küçülmesi sağlanır ve cerrahiyi kolaylaştırır. Kullanılan kemoterapatikler tümörün küçülmesini sağlamazsa, başka kemoterapatiklere geçilir.

Kemoterapide kullanılan ilaçlar etkiledikleri DNA ve RNA üzerinden protein sentezini inhibe ederler. Küratif tedavi, hastalığı iyileştirmek üzerine yapılan; palyatif tedavi ise hastalığın kötüleşmesini önlemeye yönelik olan kanser kemoterapisinde ki klinik uygulamalardır.

Antineoplastik ilaçlar, çoğunlukla nükleotit sentezini engelleyerek hücre çoğalmasını inhibe eder böylece daha çok hızlı proliferasyon yapan hücreleri etkilerler, bu nedenle sadece malign hücreler etkilenmez, bunun yanında (Bakırel ve Alkan, 2020);

- gonadlar
- gastrointestinal kanal 8 epitel tabakasının idamesi
- kemik iliği (lökosit, eritrosit oluşumu)
- deri (özellikle saç folikülleri) gibi dokular en fazla etkilenen bölgelerdir.

Antineoplastik ilaçların sınıflandırılması;

- Antimetabolitler
- Alkilleyici ajanlar
- Antitümör antibiyotikler
- Hormon ve hormon antagonistleri
- Vinka alkaloidleri
- Monoklonal antikorları

Antimetabolitler; antimetabolitlerin birçoğu yüksek mitotik aktiviteye sahip tümörlere etki etmektedir. Özellikle S fazında etkili olan bu terapötikler DNA'da çift ve tek zincir kırıkları oluşturarak veya prematür zincir sonlanmasına neden olarak replikasyon enzimlerinin üretimini repress eder.

- Gemcitabin
- Fluorourasil
- Pemetrekset
- Metotreksat

Alkilleyici ajanların etki mekanizmaları; nükleik asitleri alkilleyerek, nükleik asitin reduplikasyonunu önleyip hücre bölünmesini inhibe eder.

- İfosfamid (Holoxan)
- Karboplatin
- Oksaliplatin

- Sisplatin
- Siklofosfamid (Endoxan)

Antitümör antibiyotiklerinin etki mekanizmaları; çeşitli mikroorganizma kültürlerinden elde edilen antibiyotiklerdir. Radyasyonun doku toksisitesini artırdıkları için radyoterapi ile aynı anda kullanılması önerilmemektedir.

- Bleomisin
- Mitomisin-C
- Doksorubisin
- Epirubisin

Vinka alkaloidlerin etki mekanizmaları; bitkilerden elde edilen alkaloidler, hücrenin mitoz evresi metafazını engeller ve hücre ölümüne sebep olurlar. Ek olarak RNA sentezini de engellemektedirler.

- Etoposid
- Vinkristin
- İrinotekan
- Paklitaksel
- Dosataksel

Hormon antagonistlerinin etki mekanizmaları; tümörlerin bazıları, hormona duyarlı veya hormona bağımlıdır bu yüzden tedavide zıt yönde etki eden hormonlar ve hormon antagonistleri kullanılmaktadır.

- Tamoksifen
- Anastrozol
- Flutamid

Monoklonal antikörlerinin etki mekanizmaları; kanser immün terapide kullanılan monoklonal antikörler, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi kanser progresyonunu destekleyen büyüme faktörlerini veya CD20 (Cluster of

Differentiation Antigen 20) ve CD52 (Cluster of Differentiation 52) gibi kanser hücrelerinde spesifik olarak üretilen farklılaşma antijenlerini hedef alır.

- Bevacizumab (Altuzan)
- Setuksimab (Erbix)
- Rituksimab
- Herseptin

2.7.3. Meme kanserinde hedefe yönelik tedaviler

Hedefe yönelik tedavi, kanser hücrelerinin büyümesine ve hayatta kalmasına dahil olan spesifik genleri ve proteinleri hedeflemek üzere kullanılan bir kanser tedavisidir (Cancer.net, 2020).

Geleneksel sitotoksik kemoterapiler genellikle hücre bölünmesine müdahale ederek vücutta hızla bölünen hücreleri öldürür. Hedefe yönelik tedavi de, kanserin gelişmesine ve hayatta kalmasına yardımcı olan doku ortamını etkileyebilir veya kan damarı hücreleri gibi kanser büyümesi ile ilgili hücreleri hedefleyebilir. Hedefe yönelik tedavilerin temel amacı kanser hücrelerinde daha hassas ve potansiyel olarak daha az yan etki ile savaşmaktır (Abramson, 2016).

Meme kanserlerinde yaklaşık % 20'lik orana ve kanser hücrelerinin yüzeylerinde HER2 veya HER2/neu olarak bilinen bir proteine sahip olan HER2 pozitif meme kanserleri, hücreleri büyümeye tetiklediği için daha agresif gelişim göstererek yayılma eğilimindedirler. Ancak bu proteini hedef alarak blokaj etkisi sağlayan bir takım ilaçlar geliştirilmiştir (Turkcerrahi, 2020).

Hedeflenen kanser ajanları genel olarak monoklonal antikorlar veya küçük moleküller olarak sınıflandırılmaktadır.

Terapötik monoklonal antikorlar, hücre yüzeyinde bulunan, transmembran reseptörleri veya hücre dışı büyüme faktörleri gibi spesifik antijenleri hedefler. Bazı durumlarda, monoklonal antikorlar, bu sitotoksik ajanların amaçlanan kanser hücresi hedefine spesifik olarak verilmesini sağlamak için radyo-izotoplara veya toksinlere konjüge edilirler (Abramson, 2016).

Küçük moleküller, hücre içindeki hedeflerle etkileşime girmek için hücre zarına nüfuz ederler. Küçük moleküller genellikle hedef proteinin enzimatik aktivitesine müdahale edecek şekilde tasarlanmışlardır (Abramson, 2016).

Biyoterapi veya biyolojik terapi olarak da bilinen immünoterapi, bağışıklık sisteminin etkinleştirilmesiyle, vücutta meydana gelen kanser gibi hastalıklarla savaşması için uygulanan bir tedavi yöntemidir. Kanser hücrelerinde yüksek oranda spesifik olarak ifade edilen reseptörler ile monoklonal antikolar terapötik olarak kullanılan immunolojik ajanlardır (Şakalar vd., 2013). Tümör yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak blokaj sağlayan antikolar, etkili ilaçlar olarak kullanılabilirler (Panowski vd., 2014).

Kanser immün terapide kullanılan monoklonal antikolar, EGFR, HER2, VEGF gibi kanser gelişimine yardımcı olan büyüme faktörlerini veya CD20 ve CD52 gibi kanser hücrelerinin spesifik farklılaşma antijenlerini hedef almaktadır. Bu yöntemde ki hedef, bağışıklık sisteminin spesifik hücre reseptörlerini bloke ederek tümör büyümesinin engellenmesi için uyarmaktır (Reff vd., 1994).

Monoklonal antikolar, kanser hücrelerinin çoğalması ve anjiyogenez reseptör sinyalizasyonunun inhibe edilmesi gibi anti-kanser etkileri sağlarlar. Meme, akciğer kanseri, kolorektal kanser, renal hücreli kanser, çeşitli lenfoma, melanoma ve lösemi tedavisinde kullanılmaktadır.

Hormonoterapi, hastaya uygulanan ek hormon tedavisi olarak çağrıştırılıyor olsa da aslında meme kanserindeki hormonoterapi, östrojen üretimini azaltıcı ya da östrojen hormonunun kanser hücrelerine bağlanmasını engelleyici tedavilerdir ve bu tedavilere anti-hormonal tedavi denilmektedir.

Reseptör, hücre membranı ya da hücrenin organelinde bulunan antikor, antijen, hormon gibi moleküllerin bağlandığı proteinlere denir. Östrojen ve progesteron reseptörüne sahip meme kanseri hücreleri ise östrojen varlığında daha hızlı büyümektedirler. Bir hücrede, hormonun bağlanabileceği reseptör yok ise hormonun o hücreye bir etkisi de olmayacaktır.

Hormonoterapi, vücuttaki tüm meme kanseri hücrelerini etkilediği için kemoterapi gibi sistemik bir tedavidir. Bu tedavi yöntemi hormon reseptör pozitif meme kanserlerine sahip hastalar için önerilirken hormon reseptörü negatif olan hastalara faydası olmayacağı için önerilmemektedir. Meme kanserinde hormonoterapi, cerrahiden önce, cerrahiden sonra, kanser nüks ve metastazlarında uygulanır.

Hormonoterapide kullanılan ilaç çeşitleri;

- Östrojen engelleyiciler
 - Fulvestrant
 - Tamoksifen
- Östrojeni azaltanlar
 - Aromataz inhibitörleri
 - Exemestane
 - Letrozole Anastrazol
- Nadir uygulanan hormonoterapiler
 - Androjenler
 - Megestrol acetate

2.7.4. Hipertemi

Hipertermi, vücut sıcaklığının normalden daha fazla olması durumudur. Fakat aynı zamanda bu durum tıbbi amaçlarla vücudun sıcaklığının dikkatlice kontrol edilerek artırılmasıyla olan ısı tedavisi anlamına da gelir. Hücreler optimum sıcaklığın üzerindeki şartlarda farklı biyokimyasal yönlendirmelerle apoptotik sürece girebilmektedirler. Yüksek sıcaklık, kanser hücrelerine, radyoterapi veya kemoterapi etkilerine benzer etkiler yaratmaktadır. Hipertemi, kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelerde zarar verebileceğinden çok dikkatli bir şekilde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi tedavi yöntemleriyle kombine edilerek uygulanmaktadır.

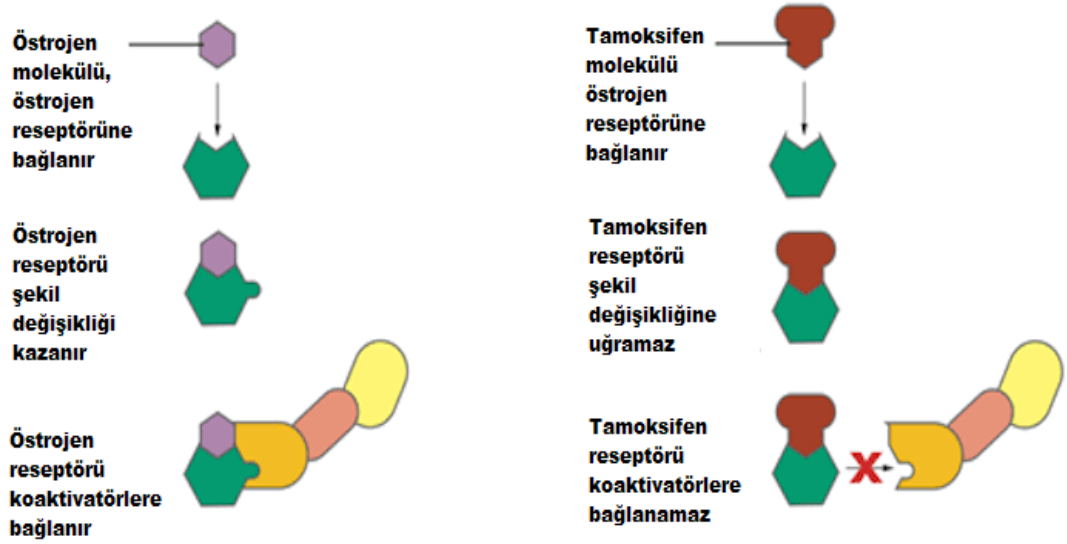
2.8. Tamoksifen

Tamoksifen (TAM), hormona duyarlı meme kanserinin tüm aşamalarının önlenmesinde ve tedavisinde kullanılan, steroid olmayan bir antiöstrojen ilaçtır. Östrojen reseptörü pozitif meme kanseri, tüm meme kanseri hastalarının % 70'inden fazlasını temsil eder (Ibrahim vd., 2019).

Tamoksifen, menopoz öncesi ve sonrası kadınlarda ER+ meme kanserinin tedavisinde ve önlenmesinde temel dayanaktır (Subramani vd., 2014). Meme kanseri nüksünü %50, yıllık ölüm oranını %31 azaltır. Bu başarıya rağmen, tümörlerin %20-30'unun yan etkilerine ek olarak 3-5 yıl alındıktan sonra TAM tedavisine direnç geliştirmektedir (Zhang ve Mei Hong, 2014).

TAM, östrojene bağımlı ve/veya östrojenden bağımsız davranışların aracılık ettiği anti-proliferatif bir etkiye sahiptir (Liang vd., 2017). TAM, anti-proliferatif etkisini, östrojen reseptörüne rekabetçi bir şekilde bağlanarak uygular ve böylece östrojenin mitojenik etkisini bloke eder (Aesoy vd., 2008).

Meme kanseri hücre yüzeyindeki östrojen reseptörlerini engelleyecek şekilde tasarlanan bir ilaçtır Tamoksifen. Bir büyüme faktörü olan östrojen hormonu, hücre yüzeyinde bulunan ve yine kendi adı ile anılan östrojen reseptörüne bağlanarak normal meme hücrelerinin büyümesini sağlar. Meme kanseri durumunda ise östrojen reseptörleri kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalması için çalışmaktadır. Meme kanseri türlerinin büyük kısmında tümör hücreleri, zarlarındaki östrojen reseptörü sayısını belirgin bir şekilde artırarak büyümek için östrojene bağımlı hale geldikleri belirlenmiştir. Tamoksifen, östrojenin reseptörüne bağlanmasını engeller ve meme kanseri hücrelerinin büyümesini durdurur.



Şekil 2.5. Tamoksifen – Kanser ilişkisi

Ayrıca, protein hücrelerinin apoptozunu, protein kinaz C, transforme edici büyüme faktörü- β (TGF-transform) ve $p53$ 'ün regülasyonu gibi sinyalleşme proteinlerinin modülasyonunu da içeren çeşitli mekanizmalarla indükler (Lagadec vd., 2008).

Ek olarak TAM tarafından oksidatif stresin artması, hücre ölümüne yol açan bir ön koşul olarak önerilmiştir ve antioksidan aktivitede ki azalma, hücreleri ROT kaynaklı hücre ölümüne duyarlı hale getirmektedir (Hwang vd., 2010; Bruning vd., 2010). Üstelik, LDH'nin sızıntısı, bilinen bir nekrotik hücre ölümü ya da TAM ile tedavi edilen meme kanseri hücrelerinin hücre zarına verilen hasarın bir göstergesidir (Darakhshan vd., 2013).

VEGF ve MMP'ler, anjiyogenez ve metastazlar için malign tümörlerde kritik belirteçlerdir (Carmeliet, 2005). Benzer şekilde, Hesselbarth ve arkadaşları meme kanseri hücrelerinin TAM ile tedavisinin, glikoz alımını azalttığını ve C57BL/6NTac farelerinde glise edilmiş hemoglobin HbA1c'de önemli bir artışa neden olduğunu bildirmiştir. TAM'ın azalmış VEGF salınımı ile anjiyogenik ve metastatik potansiyeli azalttığı gösterilmiştir (Johnson vd., 2017).

Bununla birlikte TAM, insan meme kanserinde MMP-2/MMP-9 aktivitesini ve endostatin seviyelerini önemli ölçüde arttırdığını, ve bu, TAM'ın meme kanserinin terapötik etkisinde bir anti-anjiyogenik fragman oluşumu ile bağlantılı MMP

modülasyonunun olası bir rolünü ortaya koyduğu söylenmiştir (Garvin vd., 2006; Nilsson vd., 2007).

Tamoksifen, hormona duyarlı meme kanseri tedavisinde belirlenmiş ve daha yeni anti-neoplastik ajanların kullanılmasına rağmen, ABD'de meme kanseri riski yüksek olan kadınlarda profilaktik olarak kullanılmak üzere lisanslanmıştır (Cuzick vd., 2003). İngiltere'de bu rol artmış ve çalışmalar 10 yıla kadar tedavinin kesilmesinden sonra bile östrojen reseptörü pozitif meme kanseri insidansında bir azalma olduğunu göstermiştir (Cuzick vd., 2007; Powles vd., 2007).

Tamoksifen, seçici bir östrojen reseptörü modülatörüdür (SERM) ve ER'ler yoluyla memede bir anti-östrojen olarak, rahimde bir pro-östrojen olarak etki etmektedir (Singh vd., 2008).

Memedeki östrojen antagonizması muhtemelen Tamoksifen'in koaktivatör bağlanmasını inhibe etme ve ligand bağlama alanına ko-baskılayıcı bağlanmayı destekleme ve böylece ER'yi bu dokudaki aktif bir baskılayıcıya dönüştürme yeteneğinden kaynaklanır. ER'ye bağlanmasında, Tamoksifen görünüşte sarmalın konumunu etkiler, böylece eş-düzenleyici bağlanmasını ve ER transkripsiyonel aktivasyonunu da etkilemektedir (Vaglio vd., 2006; Singh vd., 2007).

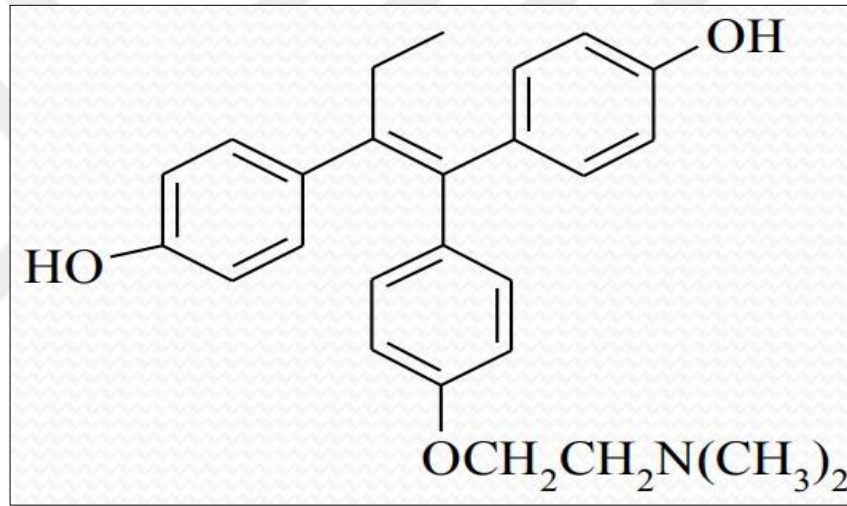
İlginçtir, klinik çalışmalarda Tamoksifen, *ER* gen ifadesi olmayan tümörlerde % 10 ila % 15'lik bir yanıt oranı göstermiştir (Osborne, 1980; 1998). Ayrıca, noninvaziv bir meme karsinomu formu olan duktal karsinomunun (DCIS) eksizyonundan sonra adjuvan Tamoksifen tedavisinin, *ER* gen ifadesi olmayan lezyonlarda bile tekrarlayan riski azalttığı gösterilmiştir (Theriault vd., 2013). Bu klinik bulgular Tamoksifen'in ER'den bağımsız bazı antikanser özelliklerine sahip olduğunu düşündürmektedir. Gerçekten de Blackwell ve arkadaşları (2000) Tamoksifen'in ER-negatif fibrosarkom modelinde anjiyogenezi inhibe edebildiğini bulmuşlardır.

Liu ve arkadaşları, Tamoksifen'in ER-negatif meme kanseri hücreleri üzerinde anti-kanser etkisini anlamak için beş farklı ER-negatif insan meme kanseri hücre dizisi üzerinde yaptıkları bir çalışmada; MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-453 ve SK-BR3 hücrelerinde doza ve zamana bağlı bir şekilde apoptozun indüklendiği

gözlemlenirken, HCC-1937 hücre hattında belirgin bir apoptotik etki gözlenmemiştir (Liu vd., 2014).

Meme kanseri nedeniyle tedavi gören kadınlarda, Tamoksifen'in ayrıca kolesterol düşürücü etkisi de olduğu bulunmuştur (Chang vd., 1996).

Tamoksifen, bir protein kinaz C antagonisti olarak görev yapabilir (Robertson vd., 1986). Tamoksifen'in protein kinaz C üzerindeki etkilerine ek olarak, nöroprotektif bir işlev ve güçlü antioksidan kapasite dahil olmak üzere çoklu metabolik etkilere sahiptir (O'Neill, 2004; Bascunan-Castillo, 2004). Tamoksifenin ayrıca dopamin salınımını uyardığı da gösterilmiştir (Chaurasia vd., 1998).



Şekil 2.6. Tamoksifen'in moleküler yapısı

SERM Tamoksifen, başlangıçta bir kontraseptif olarak geliştirilmiştir. Ancak daha sonra klasik erken çalışmalarda meme kanseri hastalarına fayda sağladığı gözlemlenmiştir (Jordan, 2008). Ve daha yakın zamanda, kadınlarda kemoprevensiyon, osteoporozun önlenmesi ve miyokard enfarktüsünün azaltılması gibi diğer avantajlı etkilerin ortaya çıktığı bulunmuştur (Jordan, 2007).

Aslında, bu SERM, hem yüksek risk altındakilerde profilaktik hem de yerleşik hastalıkta yeni terapötik stratejilerde olduğu gibi, çeşitli malignitelerde, nörodejeneratif patolojilerde ve immün aracılı hastalıklarda henüz bilinmeyen yararlılara sahip olabilir (Singh vd., 2008).

Patentli olmayan ilaç Tamoksifen, bilinen bir yan etki profili ile ucuz ve iyi tolere edilme konusunda yeni ilaçlara kıyasla önemli bir avantaj sağlamaktadır. Tamoksifen şu anda yeni ajanlara kıyasla daha büyük bir etkinliğe sahip gibi görünmekte ve farklı hedef dokularda istenen etkileri indükleyebilmektedir (Singh vd., 2008).

Gelecekteki klinik çalışmalar hem kadınlarda hem de erkeklerde SERM'ler için yeni roller ve etkenler yaratmaya çalışabilir.

Artan farmasötik finansal yüklerle birlikte, bu tür jenerik ilaçların geniş kullanımı daha fazla araştırma yapılmasını sağlayabilir ve çok fonksiyonlu SERM'ler 21. yüzyılın aspirinleri olabilirler (Singh vd., 2008).

2.9. Deinoksantin

Karotenoidler en yaygın doğal pigmentlerden biri olarak bilinmektedir ve doğada 600'den fazla farklı karotenoid bulunmaktadır (Choi vd., 2014).

Astaksantin, likopen ve β -karoten gibi bazı doğal karotenoidler gıda renklendirici olarak uzun yıllar boyunca kullanılmasına rağmen, son zamanlarda antioksidan aktivitesinin keşfi ile epitel kanseri ve kronik hastalıkları önleme potansiyelinin araştırılmasında yoğun bir çalışma alanı olmuştur (Sharoni vd., 2002; Rao ve Rao, 2007). Karotenoidler bir çok bakteride bulunur ve hem fotosentetik hem de fotosentetik olmayan türlerde çok çeşitli filumlarda yer almaktadır (Choi vd., 2014).

Deinococcus radiodurans, γ -ışını, ultraviyole radyasyonu, oksidanlar ve kurumaya karşı yüksek dirençleri ile iyi bilinen, kırmızı pigmentli bir bakteri türüdür (Choi vd., 2014).

Pigmentasyona, singlet oksijen ve hidroksil radikali gibi özellikle tehlikeli aktif oksijen formlarını β -karoten ve α -tokoferolden çok daha başarılı bir şekilde yakalama yeteneğine sahip bir karotenoid olan deinoksantin üretiminden kaynaklanır (Deshevaya vd., 2020).

D. radiodurans da ki ROT temizleme sistemi, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimler ve Mn (II), pirolokinolinkinon ve karotenoidler dahil olmak üzere enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşur (Sun vd., 2009).

D. radiodurans da enzimatik olmayan antioksidanlarının arasında karotenoidler ROT'un, özellikle singlet oksijenin etkili temizleyicileridir (Choi vd., 2014).

Malign melanom için güncel tedaviler arasında cerrahi, radyasyon tedavisi, kemoterapi veya bunların bir kombinasyonu bulunur. Ancak tüm bu tedaviler genellikle zararlı yan etkilere sahiptir. Bu nedenle, daha iyi etkinlik ve daha az toksik yan etkiye sahip anti-kanser tedavilerinin tanımlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Walt vd., 2016; Tan vd., 2006). Betlem ve arkadaşları, böyle bir etkinin karotenoidler tarafından gösterileceğini keşfetmiştir. Karotenoidler singlet oksijen etkisizleştirici ve antioksidan olarak oldukça etkilidir. Çevre kirleticileri, sigara, karsinojenler gibi dış etkenler aracılığıyla oluşabilen singlet oksijen (O_2), süperoksit anyonu (O_2^-), peroksil radikali (ROO^\cdot), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksi radikali (OH^\cdot) gibi çeşitli reaktif oksijen türleri (ROT) ve serbest radikaller vücutta normal metabolizma sırasında oluşabilmektedir. Bu radikaller oksidatif stres oluşturarak DNA, karbonhidrat, protein ve lipit gibi biyolojik açıdan önemli materyallere zarar verebilmekte aynı zamanda kalp damar hastalıkları, kanser ve sinir hastalıkları gibi birçok dejeneratif hastalığın oluşmasında da önemli rol oynamaktadır.

Deinococcus radiodurans, iyonlaştırıcı radyasyona ve oksidatif strese maruz bırakıldığında reaktif oksijen türlerine dirençli olarak bilinen bir bakteridir. Bu bakterinin antioksidan etkisi, ondan ekstrakte edilen karotenoidlerle oldukça ilişkilidir (Tian ve Hua, 2010).

Ekstrakte edilen karotenoidler arasında, deinoksanthinin DNA üzerinde çok güçlü bir koruyucu ve onarıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (Ji, 2010). Bu kimyasalın yapısı birkaç konjüge çift bağa ve ayrıca 1c pozisyonunda bir hidroksil grubuna sahiptir. Deinoksanthinin üstün antioksidan etkisi belirtilen benzersiz kimyasal yapı ile ilişkilendirilebilir (Tian ve Hua, 2010; Xu, 2007).

Deinococcus radiodurans, kırmızı pigmentli, non-patojen, spor oluşturmeyen, ikili ya da dördü hücre kümeleri şeklinde bulunan bir bakteridir. Hücreler $32^\circ C$ de zengin TGY (% 0.1 glukoz , % 0.3 maya özütü, %0.5 tripton) besi ortamında optimum ürerler. *D. radiodurans* reaktif oksijen türlerine (ROT), iyonlaştırıcı ve UV-C radyasyonlarına

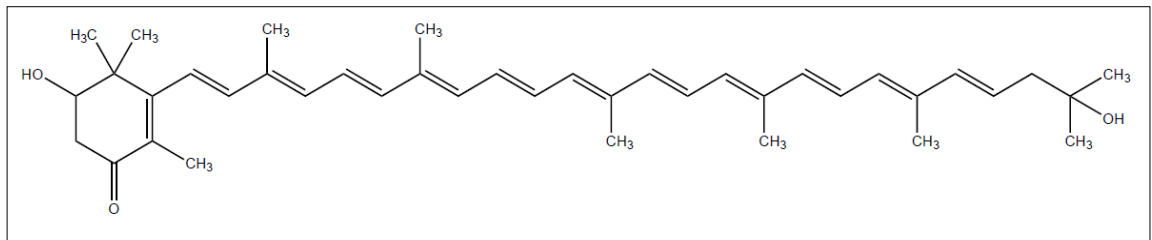
oldukça direnç göstermektedirler (Zhou vd., 2015; Choi vd., 2012; Krinsky vd., 2005; Cheng vd., 2013).

D. radiodurans gram pozitifdir fakat gram negatif organizmalardakine benzeyen kompleks bir hücre zarına sahiptir. *D. radiodurans* ince bir peptidoglikan tabakası ve dış membrana sahiptir ve birkaç proteinin düzenli sıralanmasıyla meydana gelen bir yüzey tabakası (S layer) tarafından çevrelenmektedir. Farci ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, deinoxantin S layer tabakasında bulunan DR-2577 proteinine non-kovalent bağlarla bağlı olduğunu ve böylelikle deinoxantin bakteriyi UV-C ye karşı korumasının en dış kısımdan başladığı ispatlanmıştır.

D. radiodurans, benzersiz bir ketokarotenoid olan deinoxantini sentezler (Lemee vd., 1997; Ji vd., 2010). Deinoxantin, hem karotenlerden (likopen ve β -karoten) hem de ksantofillerden (zeaksantin ve lutein) daha yüksek antioksidan etkiye sahiptir ve bu yüzden daha güçlü ROT temizleme kabiliyeti gösterir (Tian vd., 2007; Apel vd., 2004).

Lutein, likopen, β -karoten ve fucoksantin gibi bazı karotenoidler hayvanlarda karsinogenezi baskılamada oldukça etkilidir ve çeşitli kanser hücre dizilerinin apoptozunu indükleyebilir (Tanaka vd., 2012). Ayrıca, epidemiyolojik çalışmalar karotenoidlerin alınmasının prostat kanseri riskini azalttığını göstermektedir.

Deinoxantin, lutein, likopen veya β -karotenden daha verimli bir H_2O_2 ve singlet oksijen tutucu olduğu için DNA hasarına karşı koruma sağlar (Sun vd., 2009; Tian vd., 2007). Bu nedenle, deinoxantin kanser hücreleri üzerindeki etkisini araştırmak ilginç olacaktır.



Şekil 2.7. Deinoxantin moleküler yapısı (Betlem vd., 2012)

Kanser, hücre büyümesi ve ölümü arasındaki dengesizlik olarak düşünülebilir. Azalan hücre ölümü, anti-apoptotik genlerin aşırı ifadesinden ve apoptoz genlerinin ifadesinin inhibisyonundan kaynaklanmaktadır.

BAX ve *BCL2*'nin, apoptozda, dengesiz gen ifadesi, anjiyogenik ajanların varlığı ile birlikte, vücuttaki homeostazın azalmasını şiddetlendirecek olan önemli proteinler olarak tanımlanmıştır (Yang vd., 2000; Lowe vd., 2000). Dahası, *BAX* ve *BCL2* geninde hasar ve *BCL2* dahil olmak üzere anti-apoptotik genlerin aşırı ifadesi, melanoma, meme, prostat ve CLL dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde ve kanser tedavisine dirençte gözlenmiştir (Yang vd., 2000; Dimitrakakis vd., 2002; Emi vd., 2005).

Birçok çalışmada, kanser hücrelerini seçici bir şekilde ortadan kaldırmak için, ortak kemoterapötik ajanlarla birlikte güçlü antioksidanların kullanılması önerilmektedir.

Ayrıca daha önceki çalışmalarda deinoxantin tarafından kanser hücrelerinin apoptozunun indüksiyonu araştırılmış ve oksitleyici ajanlar ile apoptotik ve canlılık etkileri, morfolojik değişiklikler ve DNA fragmentasyonu ölçülmüştür (Ji, 2010; Cheng vd., 2014; Farci vd., 2016).

Çalışmaların sonuçları, deinoxantin, kanser hücrelerinde apoptoza karşı bilinen bir gen olan *BCL2* ifadesi ile birlikte enzim Caspase 3'ü teşvik eden aktivite seviyesini azalttığını ve *BAX* gen ifadesi olan apoptotik gen ifadesini arttırdığını göstermiştir (Ji, 2010; Dimitrakakis vd., 2002).

Deinoxantin antioksidan etkiye sahip olmasının yanı sıra belirli koşullarda pro-oksidatif etki de gösterebilmektedir. Pro-oksidant, ya ROT üreterek ya da antioksidan sistemleri inhibe ederek oksidatif strese yol açan herhangi bir endobiyotik ya da ksenobiyotik anlamına gelir. Oksidatif stres ise apoptozis aracısı için önemli bir mekanizmadır ve birçok çalışma, apoptozisin indüksiyonu sırasında oksidatif mekanizmaların rolünü göstermiştir. Bu çalışmalarda, deinoxantin pro-oksidant aktivitesine bağlı olarak hücre içi ROT artışına ve çeşitli kanser hatlarında apoptozisi indüklediği belirlenmiştir (Muller vd., 2002; Nara vd., 2005; Choi vd., 2012; Özcan vd., 2015; Rahal vd., 2014).

Nara ve arkadaşlarının prostat kanser hücreleri üzerine yaptığı bir çalışmada, 15 tür karotenoidin üç prostat kanseri hücre hattı (PC-3, DU145 ve LNCaP) üzerine etkileri incelenmiştir. Prostat kanser hücreleri 20 µmol/L karotenoid içeren besiyerleri ile 72 saat kültüre edilmiştir. Fukoksantin ve neoksantin prostat kanser hücre canlılığını önemli ölçüde düşürdüğü gözlemlenmiştir. Fitofluen, beta-karoten ve likopenin de hücre canlılığını düşürdüğünü fakat fitoen, kantaksantin, beta-kriptoksantin ve zeaksantin prostat kanser hücrelerinin canlılığını etkilemediği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak farklı bir ksantin türü olan fukoksantin ve neoksantin prostat kanseri hücrelerinde pro-oksidatif etki göstererek apoptozisi indüklediği gösterilmiş olup bu ksantin türlerinin anti-karsinojenik etkileri tanımlanmıştır.

Choi ve arkadaşlarının HepG2 (insan hepatoma), HT-29 (kolon kanseri) ve PC-3 (prostat kanseri) hücre hatları üzerinde yaptığı çalışmada deinoksantin bu hücrelerde hücre içi ROT düzeyini artırmasıyla üç kanser hücre hattında apoptozisi indüklediği ve deinoksantin konsantrasyonunun artırılmasıyla kanserli hücre canlılığının azaldığı görülmüştür.

Çeşitli kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda deinoksantin kanserli hücreleri apoptoza götürdüğü ve kanserli hücrelerin çoğalmasını engellediği gözlemlenmiştir. Kanserli hücreler üzerine yapılan bu çalışmalar bize deinoksantin kanserli hücrelerde apoptoz indükleyicisi ve kemopreventif bir ajan olacağını göstermektedir. Yapacağımız proje kapsamında diğer kanser türlerinden farklı olarak yüksek kalitede saflaştırılacak deinoksantin meme kanseri hücreleri üzerindeki etkileri araştırılacaktır.

Bu çalışmadan elde edilecek olan ve kanser hücrelerine yönelik apoptozu tetikleyen deinoksantin ileri ki çalışmalarda kanser tedavileri için değerlendirilme potansiyeli yüksektir.

2.10. Kombinasyonel İlaç Çalışmaları

Terapötik ajan geliştirme araştırmalarında, membran reseptörlerinin belirlenmesi ve bunlara afinitesi yüksek ligandların oluşturulması en önemli nihai amaç olarak belirlenmiştir. Moleküler biyoloji ve genetik bilimlerdeki ilerlemeler ilaç geliştirmede

önemli yenilikleri beraberinde getirmiştir. Bu alanların biyoinformatik bilimi ile ortak çalışmaları sonucu birçok hastalığın genetik sebeplerinin araştırılmasıyla yeni terapötik hedeflerin keşfedilmesinde önemli bir adım olmuştur (Tutun ve Baydan, 2019).

Çoklu ilaç kombinasyonları, çoklu yolları/hedefleri engelleyerek terapötik başarı şansını en üst düzeye çıkarmak için önemli bir yaklaşımdır. İlaç kombinasyonlarını incelemek için analitik yöntemler gittikçe daha fazla ilgi görmektedir çünkü biyomedikal araştırmalardaki büyük ilerlemeler test için çok sayıda potansiyel ajan sağlamıştır. Çoklu ilaç kombinasyonları üzerindeki klinik öncesi deney, hastalığın karmaşık doğasını, gelişme süresini ve maliyeti azaltma ihtiyacı nedeniyle (özellikle kanser) ilaç gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Huang vd., 2018).

Kombinasyon tedavisi birden fazla kullanılan ilaç veya yöntemdir. Tipik bir terim olarak, bir hastalığı tedavi etmek için birden fazla tedavinin kullanılmasını ifade eder ve çoğu zaman tüm tedaviler farmasötiktir. 'Farmasötik' kombinasyon tedavisi, ayrı ilaçların reçete edilmesi/uygulanması veya mümkün olduğunda, birden fazla aktif bileşen içeren dozaj formları ile gerçekleştirilebilmektedir. Kombinasyon tedavisi ile tedavi edilen durumlar arasında tüberküloz, cüzzam, kanser, sıtma ve HIV/AIDS bulunur. Kombinasyon tedavilerinin önemli bir yararı, bir patojen veya tümörün aynı anda birden fazla ilaca karşı dirence sahip olma olasılığı daha düşük olduğundan ilaç direnci gelişimini azaltmalarıdır.

Kombinasyon tedavisi kısa vade de monoterapiden daha pahalı görünebilir, ancak uygun şekilde kullanıldığında önemli tasarruflar sağlar. Örneğin bunlar; monoterapiden daha az yan etki, direncin yavaş gelişmesi, tedavilerde başarısızlık oranının daha düşük olması ve yeni ilaçların geliştirilmesi için daha az maddi kaynaklara yer verilebilmesi gibi.

Kombinasyon tedavisi son yıllarda onkolojide de ivme kazanmıştır, çeşitli çalışmalarda monoterapilere kıyasla ilaç kombinasyonları ile daha yüksek yanıt oranları alan FDA, son zamanlarda monoterapilere üstün güvenlik ve etkinlik gösteren terapötik kombinasyon rejimlerini onaylamıştır (Janku vd., 2014; Musgrove vd., 2011).

Klinik onkologlar, birden fazla farklı anti-kanser ilacı ile tedavi edilen kanserlerin, hiç maruz kalmadıkları diğer birçok sitotoksik ajana karşı çapraz direnç geliştirme eğiliminde olduğunu ve bu tümörlerin kemoterapi ile kürlenme olasılığını etkili bir şekilde ortadan kaldırdığını gözlemleyen ilk kişilerdir (Ambudkar vd., 1999).

Metastatik kanserlerin etkili tedavisi genellikle toksik kemoterapi kullanımını gerektirmektedir. Çoğu durumda, tek ajanlarda direncin sıklıkla görülmesinden dolayı birden fazla ilaç kullanılmaktadır. Bu nedenle, farklı hedeflere ve kimyasal yapılara sahip farklı ilaçlara (çoklu ilaç direnci) eş zamanlı direnç kazandıran mekanizmaların açıklanması, son 35 yıl içinde kanser biyologlarının ana hedeflerinden biri olmuştur (Szakács vd., 2006).

Anti-kanser ilaçları çeşitli nedenlerle kanser hücrelerini öldürmede başarısız olabilmektedir. İlaçlar genellikle sistematik olarak verilir ve bu nedenle emilim, metabolizma ve hedef dokularda tek tek hastalara özgü olabilecek uygulamalar için değişikliklere tabi tutulur. Tümörler, vücudun, ilaçların kolayca nüfuz etmediği kısımlarda bulunabilir, artan doku hidrostatik basıncı veya değişen vasküler tümör nedeniyle yerel ortamlar tarafından korunabilir (Szakács vd., 2006).

Mikroorganizmalarda ki antibiyotik direncinin araştırılmasına benzer şekilde, kanserdeki ilaç direnci üzerine yapılan araştırmalar, kanser hücresinin spesifik doğası ve genetiğinin arka planı veya toksik kemoterapiyi takip eden genetik değişiklikler nedeniyle hücresel dirence odaklanmıştır. Yakın zamana kadar, çoklu ilaç direnci mekanizmalarını (MDR) tanımlamak için birincil yöntem, sitotoksik ilaçların varlığında hayatta kalan kanser hücrelerini seçmek ve saf hücreler üzerinde ilaç direnci sağlayan değişmiş genleri tanımlamak için hücresel ve moleküler biyoloji teknikleri kullanılmıştır (Szakács vd., 2006).

Birçok ilaç kanser tedavisinde potansiyelleri açısından araştırılarak hücresel yollar ve hücresel hedefler üzerinde ki etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır. Klinik çalışmalarda, kanserli hücrelerde yüksek dozaj, yan etkiler ve çoklu ilaç direnci nedeni ile bazı umut verici ilaçlar olumsuz sonuçlar gösterme eğiliminde olabilmektedirler. Bu nedenle, farklı ilaçların kombinasyonları, dozu azaltma ve verimliliği artırma potansiyeli ile incelenmektedir. Kanser tedavisinde potansiyelleri nedeniyle hem in vitro hem de in

vivo çok sayıda tekli ve çoklu ilaç tedavisi araştırılmaktadır. Her ne kadar yapılan çalışmalar bu tedavilerin kanser hücreleri üzerindeki ana etkilerini göstermiş olsa da, daha fazla bilgi gerekmektedir. Bu, tedavinin hücresel yollar üzerindeki etkisini, apoptoz ve otofaji gibi hücresel süreçleri içerir (Al-Attar ve Madihally, 2020).

Birçok durumdan çoklu ilaç direncinin (MDR), kanser hücrelerinde, belirli proteinlerin ya da mutant proteinlerin birçok farklı sitotoksik ajan varlığında hayatta kalmasına izin veren veya mutant proteinlere neden olan kalıtsal değişikliklerin sonucu olduğu düşünülmektedir. Sitotoksik ilaçlara direnç sağlayan bu genetik değişiklikler, hücre döngüsü dinamiklerini, hücrelerin apoptoza duyarlılığını, ilaçların alımını ve akışını, hücresel ilaç metabolizmasını, ilaçların hücre içi bölümlenmesini veya ilaca bağlı hasarın onarımını etkileyebilir (Ambudkar vd., 1999).

Geçtiğimiz on yıl, terapötik fırsatların optimize edilmiş kombinasyonlarını belirleme şansını arttıran iki/üç ilaç kombinasyon çalışmaları için uygun tasarım ve analiz yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli ilerlemeler kaydetmiştir (Tan vd., 2003, 2009; Kong ve Lee, 2006; Fang vd., 2008, 2017).

Bazı kanserler hakkında yakın tarihli bir çalışmada, Martin Nowak, Bert Vogelstein ve meslektaşları, çoğu klinik durumda, hedeflenen ilaçlara karşı direncin evriminden kaçınmak için kombinasyon terapilerine ihtiyaç olduğunu göstermiştir. Ayrıca, birden fazla hedefli ilacın eşzamanlı olarak uygulanmasının, tek bir mutasyonun her iki ilaca çapraz direnç göstermediği durumlarda nüks olasılığını en aza indirdiğini bulmuşlardır (Bozic vd., 2013).

Çoklu ilaç direnci ile karşılaşılması, sağlık hizmetlerinin iyileştirilmesi için ciddi bir engeldir. Çoklu ilaç direnci en sık, insanlarda antibiyotikler, antimalaryaller, herbisitler ve kanser kemoterapötikleri de dahil olmak üzere geniş bir yelpazede kimyasal olarak farklı, sitotoksik moleküller pompalayan aktif taşıyıcılardan kaynaklanmaktadır (Higgins, 2007).

Bireysel ilaçların toplam etkilerinden beklenenden daha etkili olan sinerjistik ilaç kombinasyonları, iyileştirilmiş terapötik indeks için potansiyel yaratmaktadır. Belirli kanser türlerinde ilaç direncinin üstesinden gelmek, kombinasyon tedavilerini

geliştirmek için çeşitli sistem biyolojisi yöntemleri kullanılmaktadır (Korkut vd., 2015; Lee vd., 2012). Son hassas tıp yaklaşımları, ilaç kombinasyonlarını kullanarak bireysel tümörlerde bulunan çoklu biyobelirteçleri hedeflemeye odaklanmıştır (NCI, 2016). Bununla birlikte, piyasada 300 FDA onaylı kanser ilacı ile yaklaşık 45.000 olası ikili ilaç kombinasyonu ve yaklaşık 4,5 milyon l ilaç kombinasyonu arasından seçim yapılabilir (Culjat, 2017). Bu karmaşıklık, onkolojide kombinasyon tedavisinin büyümesinin önündeki temel engellerden biridir.

Ulusal Kanser Enstitüsü yakın zamanda kombinasyon tedavisini onkolojide en yüksek araştırma önceliği olarak vurgulamıştır (NCI, 2017).



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan aletler ve cihazlar

Real-time PCR cihazı	: Qiagen Rotor Gene 6flex
PCR cihazı	: Bio-Rad C1000 Touch
ELISA	: Epoch Biotek
Mikroskop	: Nikon Eclipse Ti2-U Inverted
Kabin	: Bil-ser B2 Class II
CO ₂ inkübatörü	: Nüve EC 160
Santrifüj	: Hanil, Smart R17
Şarjlı otomatik pipet	: Isolab
Otomatik pipet	: Eppendorf Research Plus
Vorteks	: Heidolph Reaxtop
Buzdolabı	: Arçelik
Derin dondurucu (-80 °C)	: Haer Medical
Kar makinesi	: Scotsman AF-20
Su banyosu	: Memmert
Saf su cihazı	: Nüve
Hassas terazi	: Shimadzu ATX224

3.1.2. Hücre Hattı

MDA-MB-453 hücre hattı ATCC'den ticari olarak satın alınarak temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Dulbeco's Modified Eagle's Medium	: Biological Industries
Fetal Bovine Serum	: Biological Industries
L-Glutamin	: Biological Industries
Penisilin-Streptomisin	: Biological industries
Tripsin-EDTA	: Biological Industries

Cell Proliferation Kit (XTT)	: Biological Industries
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	: Biowest
RNA izolasyon Kiti	: Axygen Axyprep Total RNA Kit
RT-qPCR Kit	: Qiagen SYBR Green PCR Master Mix
cDNA sentez kiti	: Thermofisher High-Capacity cDNA Kit
Bcl2 ELISA kit	Cusabio
HER2 ELISA kit	: Cusabio
Bax ELISA kit	: Cusabio
Caspase-3 ELISA kit	: Cusabio
Aquaguard-1	: Biological Industries
Aquaguard-2	: Biological Industries
Tamoksifen	Sigma-Aldrich
Lizis tamponu	: 150mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH: 7.4, 1 mM PMSF, 0.5% sodium deoksikolat, % 5 gliserol, 1 mM EDTA, % 1 Triton X-100

3.2. Yöntem

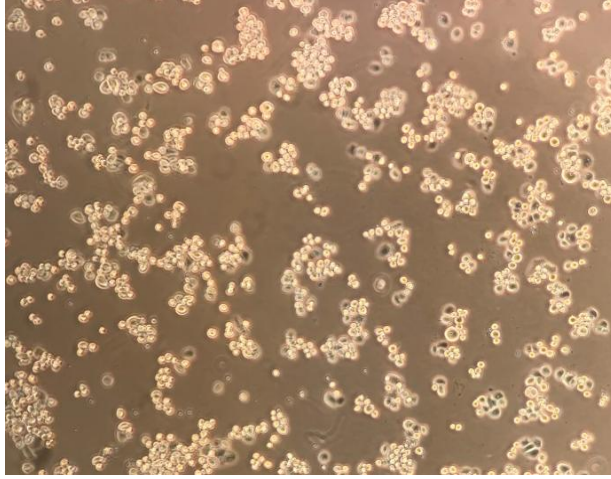
3.2.1. Hücre kültürasyonu

3.2.1.1. Hücre kültürü koşulları

MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattı; %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren DMEM'de kültüre edilmiştir. İnkübasyon, 37°C ve % 5 CO₂ steril hava içeren inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

Karbon dioksit inkübatörünün alt kısmında bulunan haznede otoklavlanmış saf su içerisine %1 oranında Aquaguard-1 karışımı eklenerek inkübasyon ortamının steril ve % 95 nem oranında sabit tutulması sağlanmıştır.

Laminar kabin içerisinde yürütülen hücre kültürü çalışmaları her kullanım öncesi ve sonrasında UV ışınları ile steril hale getirilip, %70'lik etanol ile silinerek çalışmalar yürütülmüştür.



Şekil 3.1. MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattı mikroskopik görüntüsü

3.2.1.2. Hücre kültürünün pasajlanması

İnkübasyon süresince her gün kültür ortamında ki hücre gelişimi takip edilmiş, besiyeri 2 gün arayla değiştirilmiştir. Besiyeri değişiminde, hücelere zarar vermemek için T-flask eğilerek besiyerinin otomatik pipet ile çekilmesinin ardından 37°C’de, 4-6 mL (75 cm²’lik T-flask için) DPBS ile yavaşça yıkanmıştır. Bu işlemin ardından DPBS ortamdaki uzaklaştırılarak %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren DMEM’den 10 mL eklenerek besiyeri değişimi sağlanmıştır. Yıkama işlemi hücrelerin T-flask yüzeyinin yaklaşık % 90’ını kaplayıncaya kadar tekrarlanmıştır. MDA-MB-453 hücre hattının 75 cm²’lik T-flaskın yüzeyinin yaklaşık % 90’lık kısmını doldurma süresi 7-10 gün arasında değişmektedir.

Invert mikroskop ile incelenen hücreler yeterli doluluğa ulaştığında hücrelerin pasajlama işlemi için steril hale getirilen kabin içerisinde T-flask içindeki besiyeri uzaklaştırılarak hücreler 37°C’de 4 mL DPBS ile yıkanıp ölü hücrelerden arınması sağlanmıştır. Hücreleri TC-treated yüzeyden ayırmak için 8 mL % 0,25 Tripsin-% 0,02 EDTA solüsyonu eklenerek inkübatörde yaklaşık 7 dakika inkübe edilmiştir. Belirtilen süre zarfında hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı invert mikroskopta kontrol edilerek, tamamı yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerlerine tripsinin etkisini nötralize edebilmek için 32 mL %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren DMEM besiyeri eklenilmiştir. Daha sonra kültür 50 mL’lik steril falkon tüplere aktararak 800 xg’de 5 dk boyunca santrifüj edilip süpernetant atılmıştır. Hücre peleti üzerine 12 mL %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren DMEM

eklenerek otomatik pipet yardımıyla hücreler tamamen homojen hale gelinceye kadar pipetaj yapılmıştır. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak 2 veya 3'e 75'lik T-flasklara pasajlanmıştır. İnoküle edilen hücrelerin besiyerleri %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren DMEM ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Pasajlanan hücre kültürleri tekrar aynı koşullarda karbondioksit inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.2. Steril kabinde hücrelerin pasajlanması

3.2.1.3. Hücre kültürünün stoklanması

Pasajlanarak çoğaltılan MDA-MB-453 ilk kültivasyonunun ve sonrasındaki devam eden çalışmalarda düzenli olarak ihtiyaten dondurularak sıvı azot tankında stoklanmıştır.

Hücre dondurma işleminde, T-flasklara hücre pasajlamadaki basamaklar uygulanmıştır. Hücrelerin 800 xg'de 5 dk santrifüj edilmesinin ardından süpernetant kısmı atılmıştır. Her bir cryo tüp için aseptik koşullarda 900 µl FBS üzerine 100 µl DMSO karışımı hazırlanmıştır. Hücre dondurma süspansiyonu aseptik koşullarda hücre pelletinin üzerine eklenilmiştir. Pipetaj yapılarak homojenize edilen hücreler 2 mL'lik cryo tüpler için alikütlere ayrıldıktan sonra hızlı bir şekilde sıvı azot tankına yerleştirilmiştir.

3.2.1.4. Dondurulan hücrelerin çözülmesi

Tez çalışmamız için ihtiyaç duyulması halinde kullanılmak üzere daha önceden stoklanan hücreler çözülerek deneylere devam edilmiştir. Dondurulmuş hücreler

37°C’de su banyosunda birkaç saniye inkübe edilerek tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Aseptik koşullarda falkon tüpe alınan 30 mL 37°C’ye ısıtılmış DMEM içerisine çözünen hücreler ilave ederek hücreler üzerindeki DMSO’nun toksik etkisi nötralize edilmiştir. Bu işlemin ardından hücreler 800 xg’de 5 dk santrifüj edilerek hücrelerin üzerindeki süpernetant uzaklaştırılmıştır. Hücre peletine 10 mL %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren DMEM eklenerek pipetajlamanın ardından 75’lik T-flaska aktarılmıştır. Hazırlanan hücre kültürleri tekrar aynı koşullarda karbondioksit inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.1.5. Hücre sayımı

İnkübasyona bırakılan hücreler yeterli yoğunluğa ulaşmasının ardından besiyeri uzaklaştırılarak hücreler 4 mL 37°C’de DPBS ile yıkanmıştır. Hücreleri TC-treated yüzeyden ayırmak için 8 mL % 0,25 Tripsin-% 0,02 EDTA solüsyonu ile muamele edilmiştir. Yüzeyden ayrılan hücre süspansiyonuna 37°C’ye ısıtılmış DMEM eklenmesinin ardından steril falkon tüplere aktararak 800 xg’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernetant uzaklaştırılmış ve pelet üzerine 5 mL DMEM eklenerek pipetajla homojenize edilmiştir. Ardından hücre süspansiyonundan 10 µl thoma lamına aktararak hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

Hücre sayısı, DMEM hacmi ve thoma lamının içerisinde olan sıvı hacminin 1 ml’nin 4’te 1’i olmasından dolayı 10^4 ile çarpılarak hesaplanmıştır.

3.2.2. Sitotoksite çalışmaları

3.2.2.1. Uygulanacak kimyasalların hazırlanması

Tamoksifen’den 10 mg tartılarak steril eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Tartılan Tamoksifen’in üzerine 700 µL DMSO eklenerek vorteks yardımıyla çözünmesi sağlandıktan sonra aseptik koşullarda 2 mL DMEM eklenerek maddenin stok çözeltisi hazır hale getirilmiştir. Kullanım sırasında taze olarak hazırlanan stoklar deney sürecine kadar -20 °C’de ışıktan korunarak saklanmıştır.

Deinoksantin, Seda KILINÇ’ın Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi ve Marmara Üniversitesi ortaklığında yüksek lisans tez çalışmalarında üretilerek saflaştırılmış

stoğundan tedarik edilmiştir. Deinoksantin stoğundan 2 mg tartılıp aseptik koşullarda steril eppendorf içerisinde üzerine 140 µL DMSO ilave edilerek pipetaj ile homojenize edilmiştir. Ardından üzerine 200 µL DMEM eklenerek maddenin 200 µM stok çözeltisi hazır hale getirilmiştir. Kullanım sırasında taze olarak hazırlanan stoklar deney sürecine kadar -20 °C’de ışıktan korunarak saklanmıştır.

3.2.2.2. Hücre canlılık testi

Hücre ekimi 96 kuyucuklu TC-treated platelerin her bir kuyucuğuna 200 µl %1 L- glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren DMEM içerisinde 5×10^4 hücre olacak şekilde inokülasyon yapılarak 24 saat 37°C’de % 5 CO₂ ve % 95 nem oranında inkübe edilmiştir. Zaman ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etkilerini belirlemek için deinoksantin ve Tamoksifen’in kombine ve ayrı ayrı olmak üzere konsantrasyonlarının belirlenmesi çalışması yapılmıştır.

Tablo 3.1. Uygulanan kimyasallar ve konsantrasyonları

Madde	Tamoksifen (µM)	Deinoksantin (µM)	T (µM)+D (µM)
	270	200	270+200
	135	100	135+100
	67,5	50	67,5+50
Konsantrasyonlar	33,75	25	33,75+25
	16,87	12,5	16,87+12,5
	8,43	6,25	8,43+6,25
	4,21	3,125	4,21+3,125

24 saat inkübasyon sonrasında platelerdeki besiyeri aseptik koşullarda ortamdan uzaklaştırılmıştır. Tamoksifen, deinoksantin ve kombinasyonları azalan konsantrasyonlarda uygulanarak gruplandırılmıştır. Her bir grup için 24 ve 48 saatlik ilaç konsantrasyonları uygulanmıştır. Her deneme 4 tekrarlı olarak yapılmış olup kontrol grubu 12 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

Belirlenen süreler sonunda protokole uygun olacak şekilde XTT uygulaması yapılarak CompuSyn programı yardımıyla CI (Combinational Index) değerleri belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Steril kabin de hücre ekimi çalışmaları

Kombinasyon indeksi değerleri (CI)	Hücreye Etkisi
CI = 1,1 – 1,2	Hafif Antagonistik etki
CI = 1,2 – 1,45	Orta Antagonistik etki
CI = 1,45 – 3,3	Antagonistik etki
CI = 3,3 - 10	Güçlü Antagonistik etki
CI > 10	Çok güçlü Antagonistik etki
CI = 0,9 – 1,1	Aditif etki
CI = 0,85 – 0,9	Hafif sinerjik etki
CI = 0,7 – 0,85	Orta sinerjik etki
CI= 0,3 – 0,7	sinerjik etki
CI = 0,1- 0,3	Güçlü sinerjik etki
CI < 0,1	Çok güçlü sinerjik etki

Şekil 3.4. Kombinasyon indeksi değerlendirilmesi

3.2.3. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Hücreleri TC-treated yüzeyden ayırmak için 4 mL % 0,25 Tripsin-% 0,02 EDTA solüsyonu ile muamele edilmiştir. Aseptik koşullarda steril falkon tüplere alınan hücreler 4°C’de DPBS ile 3 defa yıkanarak 800 xg’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. En son yıkamadan sonra süpernetant kısmı atılan pellet üzerine RNA kompozisyonunun

sabit kalması için hızlı bir şekilde RNAlater Reagent (Thermo Fisher) solüsyonu ilave edilmiş ve pipetajlanarak homojen hale getirilen hücre süspansiyonu oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakılmıştır.

Bu aşamanın ardında 800 xg'de 5 dakika santrifüj edilen hücrelerin supernatant kısmı atılarak Axyprep Multisource Total RNA Miniprep Kit (Axygen®) protokolü uygulanarak total RNA saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Hücre parçalama ve RNA saflaştırma basamakları aşağıda verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

- Hücrelerin üzerine 200 µL R1 buffer eklenmiştir.
- 8-10 defa 21 Gauge'luk steril şırınga ile çek-bırak yapılmıştır.
- Üzerine 75 µL R2 buffer eklenerek, 20 saniye vortekslendi. 12000 xg'de, 24 °C'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Supernatant yeni 1,5 mL'lik RNaz-DNaz'dan arındırılmış steril mikrotüplere aktararak üzerine 125 µL izopropanol eklenerek 5 saniye vortekslenmiştir.
- Spin kolonu 2 ml'lik mikrotüpe takılarak örnek kolona aktarılmıştır.
- 6000 xg'de 4 °C'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Alt kısımdaki sıvı (filtrat) atılarak spin kolonu tekrar mikrotüpe yerleştirilmiştir.
- Spin kolona 500 µL Buffer W1A eklenerek 12000 xg'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Filtrat atılarak mikrotüpe tekrar yerleştirildikten sonra 700 µL Buffer W2 eklendi ve 12000 xg'de 4 °C'de 1dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 kere tekrar edilmiştir.
- Filtrat atılarak tüpe tekrar yerleştirilip, yıkama solüsyonunu uzaklaştırmak için boş halde 12000 xg'de 4°C'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Kolon 1,5 ml'lik RNaz-DNaz'dan arındırılmış steril yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- Kolona Buffer TE'den 100 µL eklenerek 24 °C'de 1 dk inkübe edilmiştir. 12000 xg'de 1 dk santrifüj edilerek alt kısımda toplanan saflaştırılmış RNA saflık-konsantrasyon tayini yapılmasının ardından cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

RNA saflaştırma işleminin ardından cDNA sentez kit protokolüne göre cDNA sentezi gerçekleştirilerek cDNA'lar RT-qPCR çalışmasında kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

3.2.4. RNA ve cDNA konsantrasyonu ve saflığının tespiti

RNA ve DNA'nın saflığını ve konsantrasyonunu belirlemek için BIOTEK marka ELISA cihazı kullanılmıştır. 260 nm, 280 nm, 320 nm dalga boylarında köre karşı bütün numunelerin absorbans değerleri belirlenmiştir.

$$\text{RNA miktarı (ng/}\mu\text{l)} = (\text{OD}_{260}) \times \text{seyreltme faktörü} \times 40$$

$$\text{DNA miktarı (ng/}\mu\text{l)} = (\text{OD}_{260}) \times \text{seyreltme faktörü} \times 50$$

260 nm dalga boyundaki absorbans değeri RNA molekülünden, 280 nm'de ki absorbans değeri proteinlerden ve 320 nm'de ki absorbans değeri partikül varlığından dolayı olduğu bilgisiyle konsantrasyon ve saflık değerlendirilmiştir.

Aşağıda verilen skalalar yardımı ile RNA ve DNA'nın saflıkları değerlendirilmiştir.

$$\text{RNA; } \text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} \geq 2.0$$

$$\text{DNA; } \text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8$$

3.2.5. Gen ifade düzeylerinin belirlenmesi

Çalışmada en düşük CI değerinde MDA-MB-453 hücre hattının *BAX*, *BCL2*, *HER2* ve *Caspase-3* genlerinin ifade düzeyleri belirlenmiştir. Referans geni olarak *ACTB* (beta-aktin) geni kullanılmıştır.

Hesaplanan CI değerlerinde en iyi agonistik etkinin 24. saat inkübasyonu süresi ve 4,21 μM Tamoksifen ve 3,125 μM deinoxantin kombinasyonu olduğu belirlenmiştir. Bu parametreler uygulanan MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattı kültive edilerek RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Deney setinde 4 farklı grubun her biri 4 defa tekrarlı, aseptik koşullarda TC-treated petrilere 2×10^6 tane hücre olacak şekilde inokülasyon yapılmıştır. Daha önce belirtilen inkübasyon şartlarında hücrelerin yüzeye tutunmasının ardından belirlenen

konsantrasyonlarda ki ilaçlar ayrı ayrı ve kombinasyon şekilde uygulanarak tekrar 24 saat daha önce belirtilmiş koşullarda inkübe edilmiştir.

Tablo 3.2. RNA saflaştırma için deney seti kodları

Petri Kodu	Tamoksifen	Deinoksantin
Kontrol	-	-
2	4,21 µM	-
3	-	3,125 µM
4	4,21 µM	3,125 µM

En düşük CI değeri bulunan, 24. saat inkübasyonu, 4,21 µM Tamoksifen ve 3,125 µM deinoksantin kombinasyonunda MDA-MB-453 hücre hattından saflaştırılmış RNA'dan sentezlenmiş cDNA'lar kullanılmıştır.

NCBI Primer-BLAST programından faydalanarak tasarlanan primerler, Metabion şirketine Tablo 3.4' de belirtilen sekanslara göre sentezlettirilmiştir.

Tablo 3.3. Primer dizileri

Gen	Primer dizisi
<i>BAX</i>	F: 5-AGCAGATCATGAAGACAGGG R: 5-GAAGTTGCCGTCAGAAAACA
<i>BCL2</i>	F: 5-TATCTGGGCCACAAGTGAAG R: 5-ATTCGACGTTTTGCCTGAAG
<i>HER2</i>	F: 5-GTGAAGCTGAGATTCCCCTC R: 5-GCAGCTTCATGTCTGTGC
<i>Caspase-3</i>	F: 5-GCGCTCTGGTTTTTCGTTAAT R: 5-ACCCATCTCAGGATAATCCATTT
<i>ACTB</i>	F: 5-CACCATGGATGATGATATCGC R: 5-GAATCCTTCTGACCCATGCC

Tablo 3.5' de ki sıcaklık siklusu protokolüne göre Qiagen SYBR Green Master Mix kiti kullanılarak RT-qPCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.4. RT-qPCR sıcaklık siklusu

Döngü Adı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	10 dk.	1
Denatürasyon	95 °C	30 sn.	
Bağlanma	57 °C	30 sn.	45
Uzama (Fluoresans tayin)	72 °C	45 sn.	
Bekleme	4 °C	∞	1

3.2.6. Protein ekstraksiyonu

Çalışmada en düşük CI değerinde MDA-MB-453 hücre hattının BAX, BCL2, HER2 ve Caspase-3 proteinlerinin miktarları belirlenmiştir. Deney setinde 4 farklı grubun her biri 4 defa tekrarlı, aseptik koşullarda TC-treated petrilere 2×10^6 tane hücre olacak şekilde inokülasyon yapılmıştır. 24 saat, daha önce belirtilen inkübasyon şartlarında hücrelerin yüzeye tutunmasının ardından belirlenen konsantrasyonlarda ki ilaçlar ayrı ayrı ve kombinasyon şeklinde uygulanarak tekrar daha önce belirtilen koşullarda 24 saat inkübe edilmiştir.

Tablo 3 5. Protein ekstraksiyonu için deney seti kodları.

Petri Kodu	Tamoksifen	Deinoksantin
Kontrol	-	-
2	4,21 μ M	-
3	-	3,125 μ M
4	4,21 μ M	3,125 μ M

24 saatlik süre sonunda ilaç uygulanan petrilereki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Petrilere 4°C’de DPBS eklenerek hücreler 3 kez yıkandıktan sonra üzerlerine 4 mL lizis tamponu (150mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH: 7.4, 1 mM PMSF, 0.5% sodium deoksikolat, % 5 gliserol, 1 mM EDTA, % 1 Triton X-100) eklenip 10 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra hücre kazıyıcı yardımı ile yüzeyden kazınıp aseptik koşullarda falkon tüplere aktarılmıştır. Falkon tüp içerisinde bulunan hücreler buz üzerinde 8-10 defa 21 Gauge’luk steril şırınga ile çek-bırak yapılarak lizis işlemi tamamlanmıştır. +4°C, 2000

xg'de 10 dakika boyunca santrifüj edilen örneklerin süpernetant kısmı ayrı steril eppendorf tüplerine alınarak -80°C'de stoklanmıştır.

3.2.7. İstatistiksel hesaplamalar

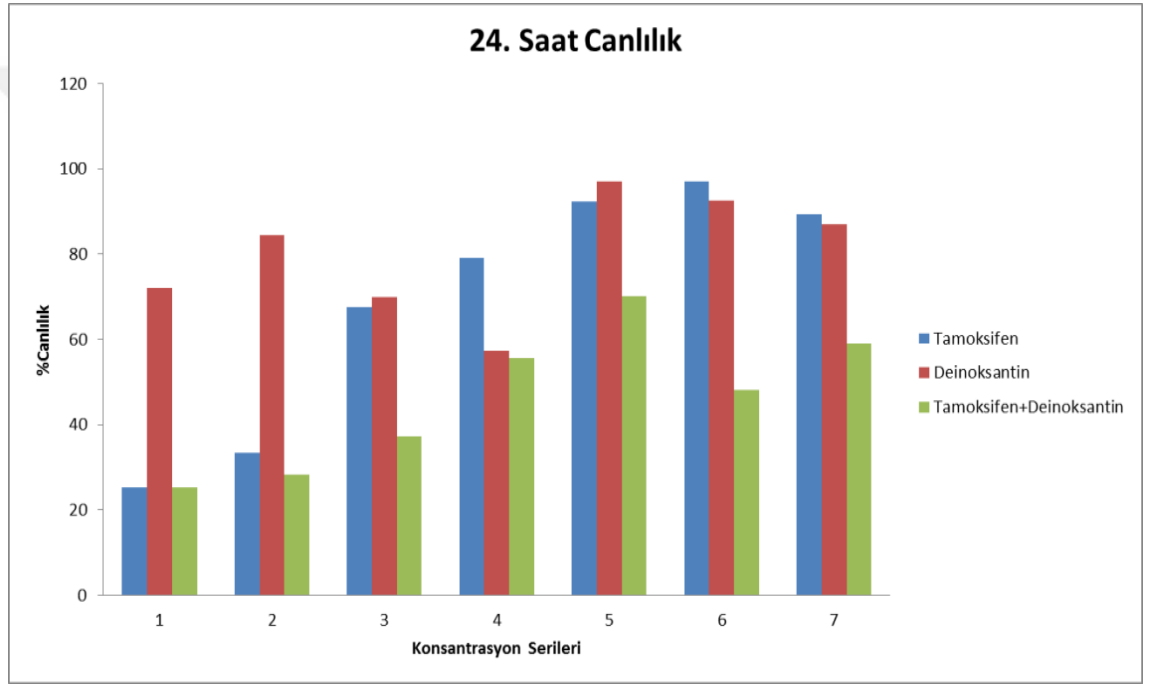
Livak ve Schmittgen tarafından geliştirilen birincil normalizasyonu $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile gen ifade düzeyleri belirlenmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001). İkincil normalizasyon *ACTB*, referans geni olarak kullanılarak *BAX*, *BCL2*, *HER2* ve *Caspase-3* genlerinin ifade düzeylerinin karşılaştırılması ile yapılmıştır. İstatistiksel analiz SPSS 17.0 programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçların anlamlılık yüzdesi $p < 0.05$ dir.



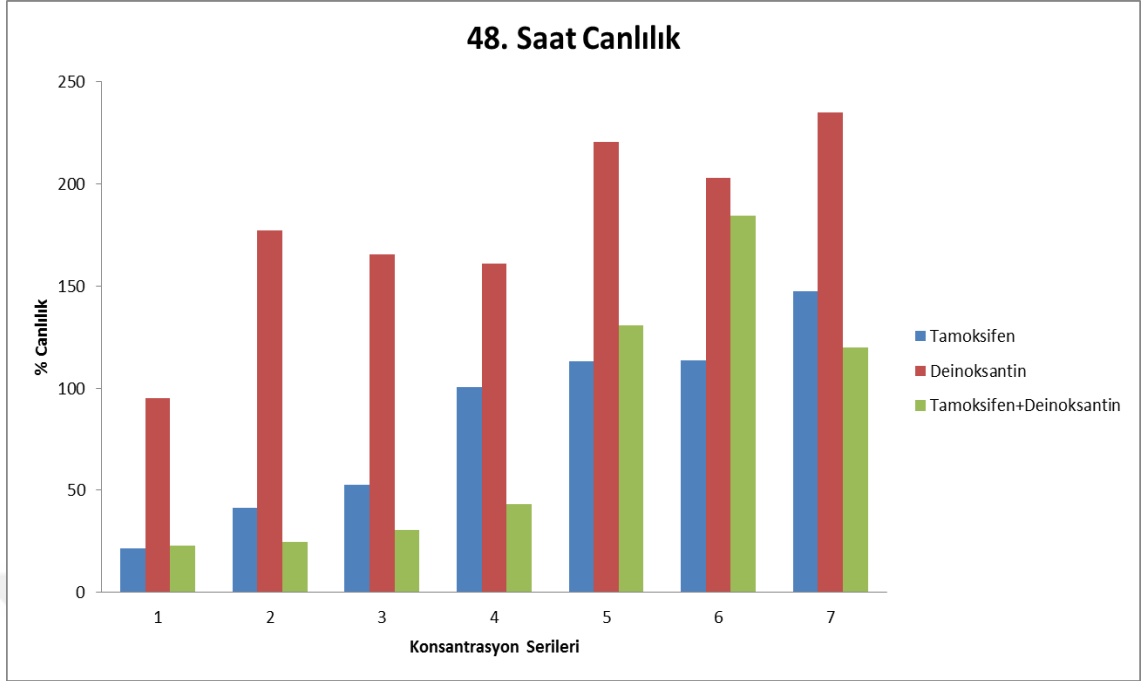
4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılık Testi

Tamoksifen, deinoksantin ayrı ayrı ve her iki bileşenin kombinasyonlarının belirlenen konsantrasyonları uygulanan MDA-MB-453 hücreleri üzerinde, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde XTT çalışması yapılmıştır. 450 nm’de elde edilen absorbans verileri ile “hücre canlılık yüzdeleri” hesaplanmış ve bu hesaplamalar neticesinde Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterilen grafiklerdeki bulgular elde edilmiştir.



Şekil 4.1. 24. saat MDA-MB-453 üzerine Tamoksifen, Deinoksantin ve T+D'nin anti-kanser aktivitesi



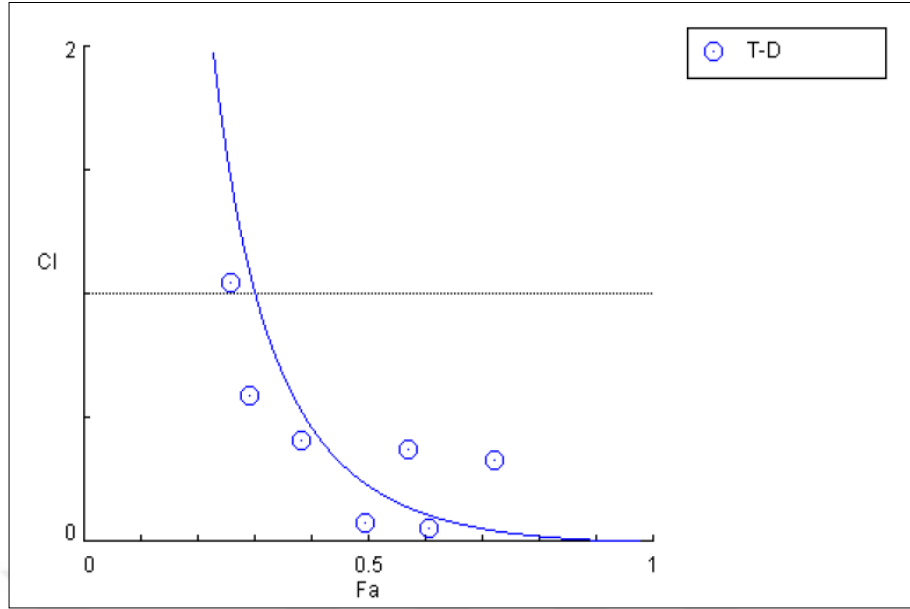
Şekil 4.2. 48. saat MDA-MB-453 üzerine Tamoksifen, Deinoksantin ve T+D'nin anti-kanser aktivitesi

4.2. Kombinasyonel Etki Değeri

Tamoksifen, deinoksantin ve kombinasyonları uygulanan MDA-MB-453 hücre hattında 24. ve 48. saatler de ölçülen absorbans değerlerinden faydalanarak CompuSyn programı aracılığıyla kombinasyon etki değeri (CI) hesaplanmıştır.

Tablo 4.1. 24. saat MDA-MB-453 üzerine Tamoksifen, Deinoksantin ve T+D'nin uygulaması sonucu hesaplanan CI değerleri

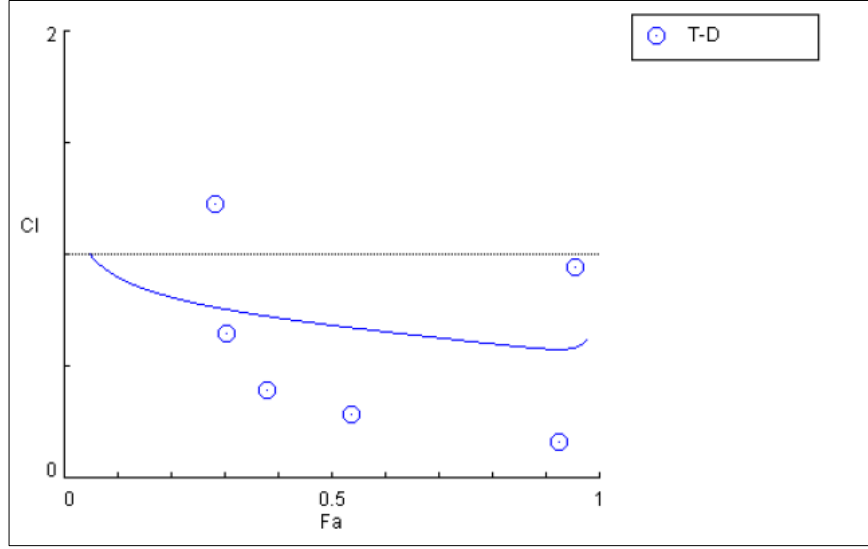
T+D (μ M)	CI	Etki
270+200	1,048	Orta Antagonistik
135+100	0,589	Sinerjik
67,5+50	0,407	Sinerjik
33,75+25	0,373	Sinerjik
16,87+12,5	0,327	Sinerjik
8,43+6,25	0,072	Çok güçlü sinerjik
4,21+3,125	0,052	Çok güçlü sinerjik



Şekil 4.3. 24. saat MDA-MB-453 üzerine Tamoksifen, Deinoksantin ve T+D'nin oluşturduğu CI grafiği

Tablo 4.2. 48. saat MDA-MB-453 üzerine Tamoksifen, Deinoksantin ve T+D'nin uygulaması sonucu hesaplanan CI değerleri

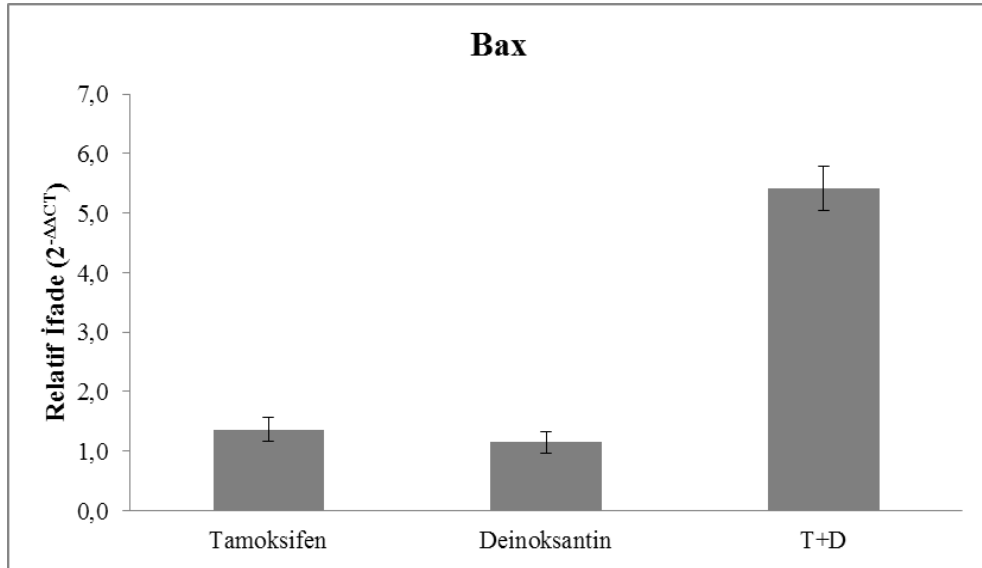
T+D (μM)	CI	Etki
270+200	1,228	Orta Antagonistik
135+100	0,652	Sinerjik
67,5+50	0,394	Sinerjik
33,75+25	0,286	Güçlü sinerjik
16,87+12,5	0,943	Aditif
8,43+6,25	9,033	Güçlü Antagonistik
4,21+3,125	0,159	Güçlü sinerjik



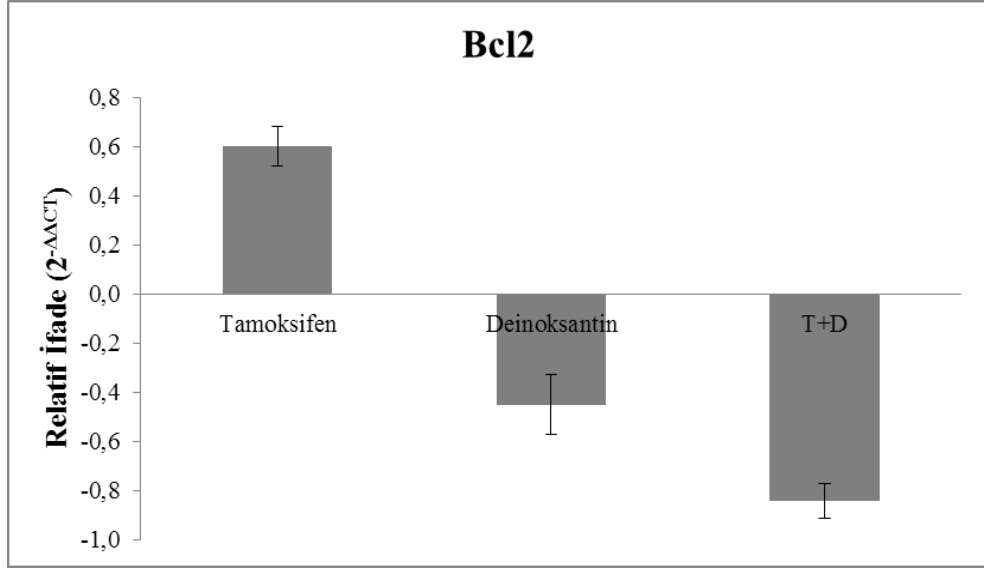
Şekil 4.4. 48. saat MDA-MB-453 üzerine Tamoksifen, Deinoksantin ve T+D'nin oluşturduğu CI grafiği

4.3. Gen İfade Düzeyleri

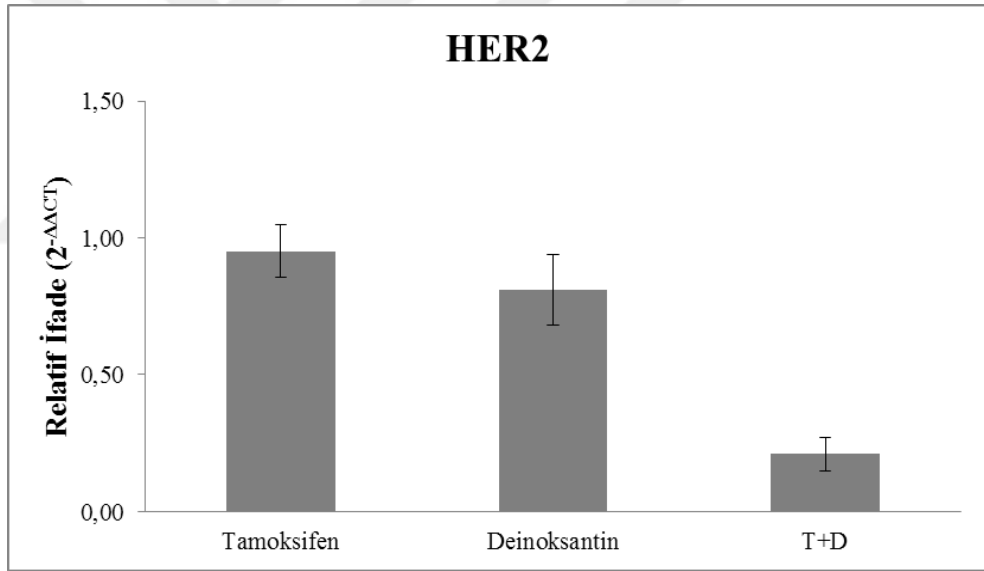
Çalışmada en düşük CI değerinde MDA-MB-453 hücre hattının *BAX*, *BCL2*, *HER2* ve *Caspase-3* genlerinin ifade düzeyleri belirlenmiştir. Referans geni olarak *ACTB* (beta-aktin) geni kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların grafikleri Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verildiği şekildedir.



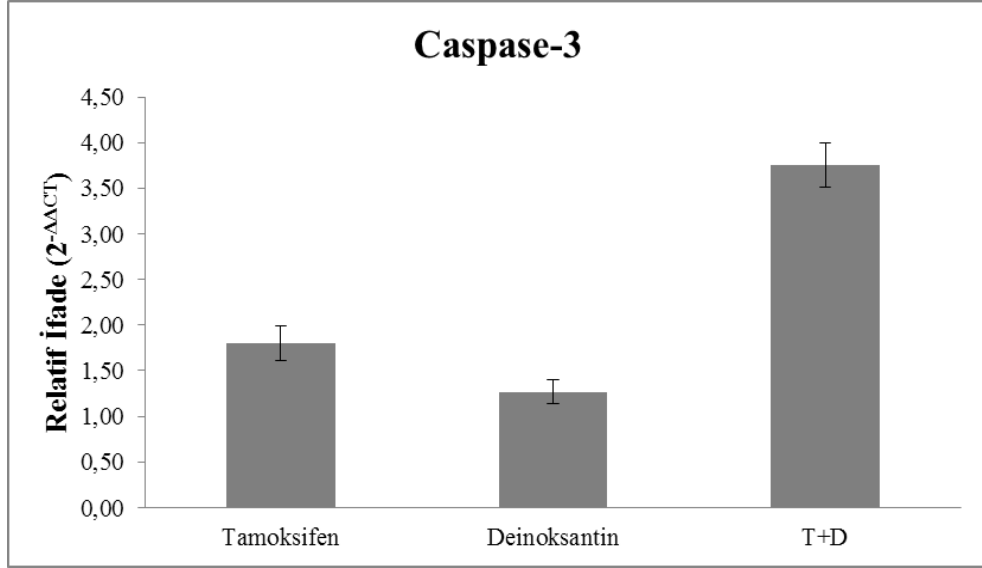
Şekil 4.5. Tamoksifen, Deinoksantin ve kombinasyonlarının *BAX* geni ifade düzeyine etkisi



Şekil 4.6. Tamoksifen, Deinoksantin ve kombinasyonlarının *BCL2* geni ifade düzeyine etkisi



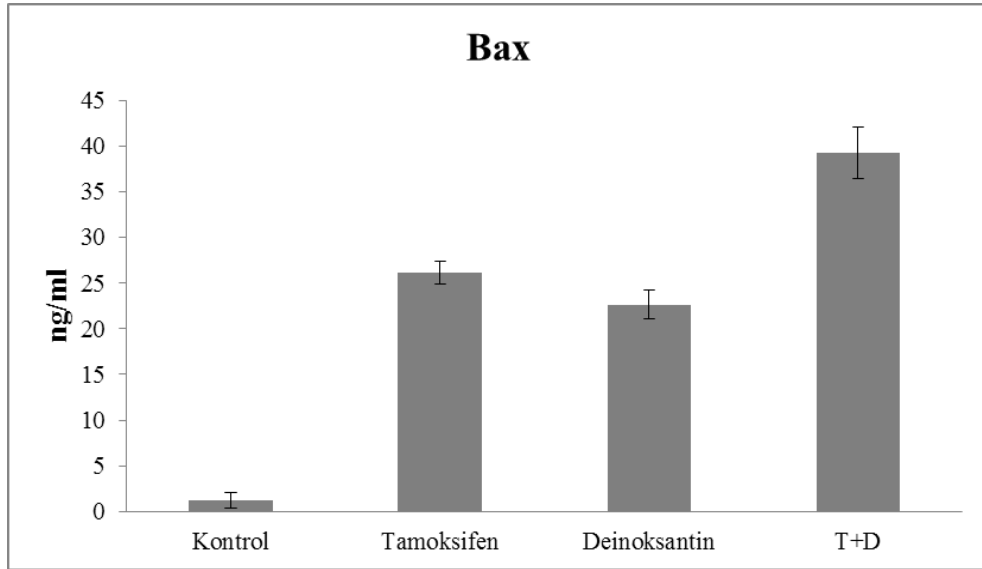
Şekil 4.7. Tamoksifen, Deinoksantin ve kombinasyonlarının *HER2* geni ifade düzeyine etkisi



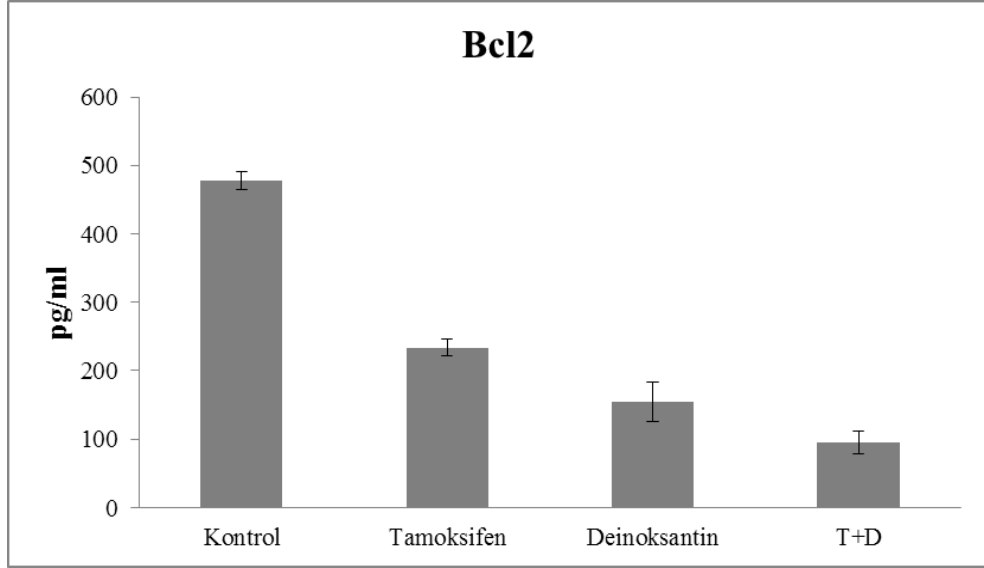
Şekil 4.8. Tamoksifen, Deinoksantin ve kombinasyonlarının *Caspase-3* geni ifade düzeyine etkisi

4.4. Protein Seviyeleri

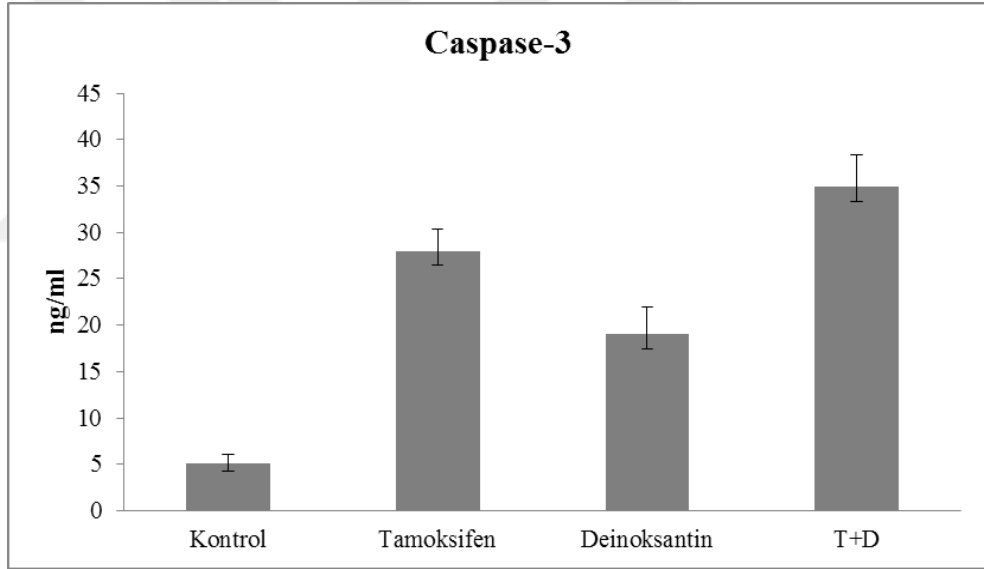
Çalışmada en düşük CI değerinde MDA-MB-453 hücre hattının BAX, Bcl2, HER2 ve Caspase-3 protein miktar düzeylerine etkisi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların grafikleri Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12’de verildiği şekildedir.



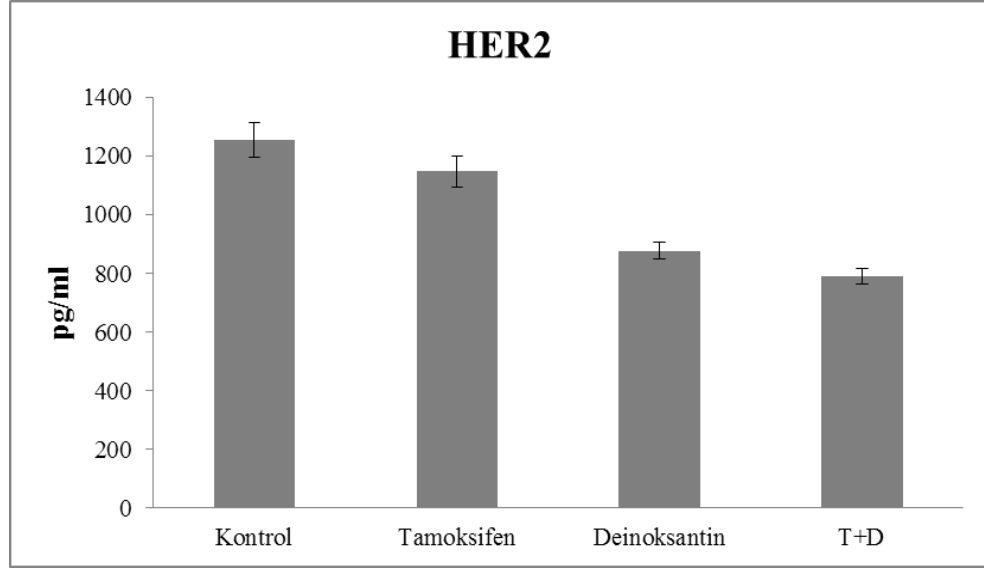
Şekil 4.9. Tamoksifen, Deinoksantin ve kombinasyonlarının BAX proteini miktarı üzerine etkisi



Şekil 4.10. Tamoksifen, Deinoksantin ve kombinasyonlarının BCL-2 proteini miktarı üzerine etkisi



Şekil 4.11. Tamoksifen, Deinoksantin ve kombinasyonlarının Caspase-3 proteini miktarı üzerine etkisi



Şekil 4.12. Tamoksifen, Deinoksantin ve kombinasyonlarının HER2 proteini miktarı üzerine etkisi

Tablo 4.3. BAX, BCL2, HER2 ve Caspase-3 protein seviyeleri

	BAX (ng/ml)	BCL2 (pg/ml)	HER2 (pg/ml)	CASP-3 (ng/ml)
Kontrol	1,25	478	1255	5,16
Tamoksifen (4,21µM)	26	234	1146	28
Deinoksantin (3,125 µM)	23	154	875	19
Tamoksifen+Deinoksantin (4,21µM+3,125µM)	39	95	789	35

4. SONUÇ ve TARTIŞMA

Meme kanseri, batı dünyasındaki kadınlarda en sık görülen kanserdir. Meme kanseri olan tüm hastalarda ER, PR ve HER2 statüsünün belirlenmesi zorunludur. Bu belirteçler, uluslararası kılavuzlar tarafından, invaziv meme kanseri tedavisine karar verilmesinde vazgeçilmez olan öngörücü faktörler olarak kabul edilmektedir (Harbeck vd., 2019).

Meme kanseri östrojene bağımlı olduğundan, ooferektomi, hipofizektomi veya adrenaletomi ile östrojen sekresyonunu azaltmak kanserin gerilemesine neden olabilir. Bu cerrahi prosedürlere duyulan ihtiyaç, östrojenin östrojen reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek bir antiöstrojen görevi gören tamoksifenin tedavi de kullanılmasıyla azaltılmıştır. Tamoksifen, Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi tarafından 1977 yılında ileri meme kanseri olan kadınların tedavisi için ve birkaç yıl sonra primer meme kanserinin adjuvan tedavisi için onaylandı (Jordan, 1994).

MDA-MB-453 hücre hattı, östrojen reseptörü- α , progesteron reseptörü ve HER-2/neu protein üretimi açısından androjen reseptörü pozitif ve üçlü negatiftir (Vranic vd., 2011).

Seçici bir östrojen antagonisti olan Tamoksifen'in ER-negatif meme kanseri hücrelerinde önemli kanser hücresi apoptozunu indüklediğini bulan Liu ve arkadaşları; ER-negatif meme kanseri hücrelerinde Tamoksifen kaynaklı apoptozda CIP2A / PP2A / p-Akt sinyal yolunun rolünü doğrulamışlardır. Bu veriler doğrultusunda Tamoksifen'in "ER-dışı" etkisi de açıkça gösterilmiştir (Liu vd., 2011).

Östrojen reseptörü (ER) pozitif meme kanseri olan hastaların oranı 1996'da % 49.6'dan 2010'da % 70.0'e yükselmiştir (Ko vd., 2012).

Hormon reseptörü pozitif meme kanseri olan hastalarda ana tedavi, kanser başlangıcının ortaya çıkmasından itibaren yapılan önleyici tedavidir. Tamoksifen etki mekanizmasında ER'ye yarışmalı bir bağlanma durumu sergilemektedir. Tamoksifen, östrojen ile ilişkili gen ifade düzeyini inhibe eder ve hücre döngüsünün G1 fazını bloke eder (Osborne, 1998).

Güçlü ve seçici östrojen modülatörü olan Tamoksifen, premenopozal hastalarda en çok kullanılan hormon ilacıdır (Giuliano, 2009). Ayrıca Tamoksifen'in mortaliteyi azalttığı bildirilmiştir (Vogel vd., 2006).

Yapılan bazı çalışmalarda erken meme kanseri tedavisi için rastgele bir Tamoksifen denemesi yapılmış ve 5 yıl boyunca Tamoksifen kullanan ER pozitif meme kanseri olan kadınlarda nüks oranının %50 ve ölüm oranının %28 azaldığı gözlemlenmiştir (EBCTCG, 1998):

Ibrahim ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir çalışma da Tamoksifen ve Simvastatin'in ilaç etkileşimi, apoptotik sinyal başlatıcıları *BAX/BCL-2* oranını ve *CASP-3* aktivitesini artırarak T47D meme kanseri hücre hattında sinerjistik etki oluştuğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattı üzerinde tek başına uygulanan Tamoksifenin *BAX* ve *CASP-3* genlerinin ifade düzeyinde çok yüksek bir etkiye sahip olmadığı fakat deinoxantin ile beraber verildiğinde *BAX* ve *CASP-3* genlerinin ifade düzeylerinde anlamlı bir artışa sebep olduğu gözlenmiştir.

Tamoksifen veya 5 yıl süren bir aromataz inhibitörü gibi anti-östrojen tedavisi, meme kanseri tekrarını azaltmakta ve genel sağ kalımı arttırmaktadır. Böylece, Tamoksifen, meme kanseri olan premenopozal hastalar için evrensel tedavi standardı haline gelmiştir (Burstein vd., 2014).

Lutein, likopen, β -karoten ve fucoksantin gibi bazı karotenoidler hayvanlarda karsinogenezi baskılamada oldukça etkilidir ve çeşitli kanser hücre dizilerinin apoptozunu indükleyebilir (Tanaka vd., 2012).

Bakteriye karakteristik kırmızı rengini veren *D. radiodurans* tarafından sentezlenen eşsiz bir karotenoid olan deinoxantin, hem karotenlerden hem de ksantofillerden daha güçlü bir ROT temizleyicidir (Lemee vd., 1997; Tian vd., 2007; 2009).

Yürütülen farklı çalışmalarda, deinoxantin, kanser hücrelerinde *BCL2* ve *Caspase-3* genlerinin ifade düzeylerini azalttığı aynı zamanda *BAX* geninin ifade düzeyini artırdığı bildirilmiştir (Ji, 2010; Dimitrakakis vd., 2002).

Yong-Ji ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada, apoptozisin deinoksantin tarafından uyarılması araştırılmıştır. Bu çalışmada HepG2, PC-3 ve HT-29 hücrelerinde; hücre canlılığı, morfolojik değişiklikler ve bir DNA fragmentasyon analizi yapılarak apoptotik etkiler belirlenmiştir. Deinoksantin tedavisi, test edilen tüm hücrelerde ROT'ta bir artışa neden olmuş ve deinoksantin'in olası oksidan aktivitesini ortaya koymuştur.

MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattı üzerinde yürütülen çalışmamızda deinoksantin tek başına kullanıldığında *BAX* ve *CASP-3* genlerinin ifade düzeyini çok yüksek oranda uyardığı, *BCL-2* ve *HER2* üzerinde ise tek başına çok az etki etkisi görülmüştür. Tek başına intrinsek apoptotik bir uyarıcı olarak yüksek etkiye sahip olmadığı düşünülmektedir.

Yürütülen tez çalışması kapsamında MDA-MB-453 hücre hattı üzerine 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde; Tamoksifen, deinoksantin ve her ikisinin kombinasyonlarının belirlenen konsantrasyonlarda uygulanması ile yapılan XTT çalışmasının sonuçlarına göre; 24. saatin 4, 6, ve 7. konsantrasyonları dışında Tamoksifen'in deinoksantinden daha fazla anti-kanser etkiye sahip olduğu, bütün konsantrasyonlarda ise beraber uyguladıklarında ayrı ayrı uygulanmalarından daha iyi anti-kanser etki gösterdikleri belirlenmiştir. 48. saatte ise 24. saate kıyasla Tamoksifen, deinoksantin veya her ikisinin daha uzun zaman zarfı içerisinde bulduklarında yarı ömrülerini yitirdikleri veya moleküler yapılarının bozulması gibi ihtimallerden kaynaklanan sebeplerden canlılık oranlarında dalgalanmalar görüldüğü gözlemlenmiştir.

İlerleyen çalışmalarda farmokokinetik çalışmalarla deinoksantin'in yarı ömrünün hesaplanması, biyo yararlanım süresinin belirlenmesi gerçekleştirilecektir.

Sinerjik etkinin en yüksek olduğu konsantrasyonu ve zamanı bulmak için hesaplanan CI değerlerini belirleme aşamasında; 24. saat inkübasyonunda diğer kombinasyonlara kıyasla en iyi sinerjik etkinin 4,21 µM Tamoksifen + 3,125 µM deinoksantin kombinasyonunun etkili olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.1.). En düşük olarak tespit edilen 0,052 CI değeri ile RT-qPCR ve ELISA çalışmaları yapılmıştır.

4,21 μ M Tamoksifen + 3,125 μ M deinoksantin kombinasyonunun uygulandığı bütün örneklerde ki RT-qPCR sonuçlarına göre; *BAX* ve *CASP-3* genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesinde, ilaçların ayrı ayrı uygulanmasına göre kombinasyon şekilde uygulanması çok daha iyi sonuçların elde edildiği gözlemlenmiştir. *BCL2* ve *HER2* genlerinin ifade düzeylerini belirlemede ise uygulanan ilaçların kombinasyonunun, tek tek ilaç uygulamasından daha etkin olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Gen ifade analizleri sonuçlarına ek olarak yapılan ELISA çalışmaları da RT-qPCR sonuçlarını destekleyecek şekilde olmuştur. *BAX* ve Caspase-3 protein seviyelerinde 4,21 μ M Tamoksifen + 3,125 μ M deinoksantin kombinasyonu, *BAX* proteininde; kontrole göre 31 kat ve ayrı ayrı ilaç uygulamalarına göre sırasıyla 1,5;1,7 kat daha artmış; Caspase-3 proteininde, kontrole göre yaklaşık 7 kat ve ayrı ayrı ilaç uygulamalarına göre sırasıyla 1,25;1,8 kat daha arttığı görülmüştür. *BCL2* ifade düzeyinde 4,21 μ M Tamoksifen + 3,125 μ M deinoksantin kombinasyonu kontrole göre 5 kat ve ayrı ayrı ilaçların uygulamalarına göre sırasıyla yaklaşık 2,5;1,5 kat daha azalmış; *HER2*'nin ifade düzeyinde ise 4,21 μ M Tamoksifen + 3,125 μ M deinoksantin kombinasyonu kontrole göre 1,6 kat ve ayrı ayrı ilaçların uygulamalarına göre 1,4;1,1 kat daha azaldığı tespit edilmiştir. Bu neticeler doğrultusunda kanser üzerinde etkinliği bilinen Tamoksifen'in deinoksantin ile kombinasyonunun anti-kanser aktivitesini daha da artırdığını ve hormon reseptörüne duyarlı meme kanseri tedavilerinde yardımcı kür olarak yüksek potansiyel vaad eden bir madde olarak kullanılabilceği düşünülmektedir.

İlerleyen çalışmalarda protein seviyelerinin Western-Blot ile belirlenmesi, deinoksantinın östrojen reseptörü üzerinde ki etkinliğinin in silico ve in vitro olarak araştırılması çalışmalarının yapılması ön görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbas, H., Hassin, A., Baidaa, M., and Alsafy. (2016) "Diagnosis of Malignant Melanoma of Skin Cancer Types", *International Journal of Interactive Multimedia and Artificial Intelligence*. 4:44-49.
- Abramson, R. (2016), "Overview of targeted therapies for cancer", *My cancer genome*
- Acar, T., Acar, N., Sezgin, G., Gokova, M. B., Kucukzeybek, B. B., and Hacıyanlı, M. (2018), "Treatment choice in metaplastic breast cancer: A report of 5 cases", *Northern clinics of Istanbul* 5.4 : 365.
- Aesoy, R., Sanchez, B. C., Norum, J. H., Lewensohn, R., Viktorsson, K., and Linderholm, B. (2008), "An autocrine VEGF/VEGFR2 and p38 signaling loop confers resistance to 4-hydroxytamoxifen in MCF-7 breast cancer cells", *Molecular Cancer Research* 6.10: 1630-1638.
- Akagi, T., Kinoshita, T., Shien, T., Hojo, T., Akashi-Tanaka, S., and Murata, Y. (2009), "Clinical and pathological features of intracystic papillary carcinoma of the breast", *Surg Today*, 39: 5-8. (PMID: 19132460)
- Anderson E., (2002), "The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis", *Breast Cancer Res* 4, 197-201
- Apel, K., and Hirt, H., (2004) "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction", *Annual Review of Plant Biology*, 55 (1): 373-399.
- Bascunan-Castillo, E. C., Erickson, R. P., Howison, C. M., Hunter, R. J., Heidenreich, R. H., Hicks, C., and Gillies, R. J. (2004), "Tamoxifen and vitamin E treatments delay symptoms in the mouse model of Niemann-Pick" *C. Journal of Applied Genetics*, 45: 461-67
- Bekele, R. T., Venkatraman, G., Liu, R. Z., Tang, X., Mi, S., Benesch, M. G., and Brindley, D. N. (2016), "Oxidative stress contributes to the tamoxifen-induced killing of breast cancer cells: implications for tamoxifen therapy and resistance", *Scientific reports* 6.1: 1-17.
- Berry, D. A., Cirrincione, C., Henderson, I. C., Citron, M. L., Budman, D. R., Goldstein, L. J., and Hudis, C. (2006), "Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer" *Jama* 295.14: 1658-1667.
- Betlem, P., Bovens, P., Dings, T., and Vriend, S., (2012) "A Search for Carotenoids in *Rubrobacter radiotolerans*", *Radboud Honours Academy FNWI*.
- Blackwell, K. L., Haroon, Z. A., Shan, S., Saito, W., Broadwater, G., Greenberg, C. S. and Dewhirst, M. W. (2000). "Tamoxifen inhibits angiogenesis in estrogen receptor-negative animal models." *Clinical cancer research*, 6(11), 4359-4364.

- Borovskaya TÜİK., (2011) “Türkiye İstatistik Yıllığı”, *Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)*,
- Breastcancer.org, “Genetics: Breast Cancer Risk Factors”, <https://www.breastcancer.org/risk/factors/genetics>, Son erişim tarihi: 2020
- Brüning, A., Friese, K., Burges, A., and Mylonas, I. (2010), “Tamoxifen enhances the cytotoxic effects of nelfinavir in breast cancer cells” *Breast Cancer Research* 12.4: R45.
- Carmeliet, Peter. (2005), “Angiogenesis in life, disease and medicine” *Nature* 438.7070: 932-936.
- Centers for Disease Control and Prevention, (2018), “What is Skin Cancer”, https://www.cdc.gov/cancer/skin/basic_info/what-is-skin-cancer.html. Son erişim tarihi: 07.06.2018.
- Chan, C. M., Martin, L. A., Johnston, S. R., Ali, S. and Dowsett, M. (2002), “Molecular changes associated with the acquisition of oestrogen hypersensitivity in MCF-7 breast cancer cells on long-term oestrogen deprivation”, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 8, 333–341
- Chang, J., Powles, T. J., Ashley, S. E., Gregory, R. K., Tidy, V. A., Treleaven, J. G., and Singh, R. (1996), “The effect of tamoxifen and hormone replacement therapy on serum cholesterol, bone mineral density and coagulation factors in healthy postmenopausal women participating in a randomised, controlled tamoxifen prevention study” *Ann Oncol*, 7: 671–75
- Chaurasia CS, Chen CE, Rubin J, and Dewey SL: (1998), “Effects of tamoxifen on striatal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in freely moving male rats: an in-vivo microdialysis investigation” *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50: 1377–85
- Cheng, J., Zhang, Z., Zheng, Z., Lv, G., Wang, L., Tian, B., and Hua, Y. (2014). “Antioxidative and Hepatoprotective Activities of Deinoxanthin-Rich Extract from *Deinococcus radiodurans* R1 against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Mice. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 13 (4): 573-580
- Choi, Y., Hur, J., Lim, S., Jo, M., and Kim, D., (2014), “Induction of Apoptosis by Deinoxanthin in Human Cancer Cells”, *Anticancer Research* 34:1829-1836
- Clark, G. M., McGuire, W. L., Hubay, C. A., Pearson, H. and Marshall, J. R. (1983) *N. Engl. J. Med.* 309, 1343-1347.
- Clarke C. L. and R. L., (1990), “Sutherland: Progestin regulation of cellular proliferation”, *Endocrinology* 11, 266-301
- Cox, M. and Battista J. (2005). “*Deinococcus radiodurans*- The Consummate Survivor”, *Nature Publishing Group*, 3: 882-892

- Culjat, M. “By the Numbers: Combination Therapy in Oncology”, CureMatch Blog, <https://www.curematch.com/blog-posts/numbers-combination-therapy-oncology/> Son erişim tarihi:11.05.2017
- Cuzick, J., Forbes, J. F., Sestak, I., Cawthorn, S., Hamed, H., Holli, K., and Howell, A. (2007), “Long-term results of tamoxifen prophylaxis for breast cancer- 96-month follow-up of the randomized IBISI trial”, *Journal of the National Cancer Institute*, 99: 272–82
- Cuzick, J., Powles, T., Veronesi, U., Forbes, J., Edwards, R., Ashley, S., and Boyle, P. (2003), “Overview of the main outcomes in breast cancer prevention trials” *Lancet*, 36: 296–300
- Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S. A., Jordan, V. C., Katzenellenbogen, J. A., Korach, K. S., and Gustafsson, J. Å. (2006), “International union of pharmacology. LXIV. Estrogen receptors”, *Pharmacological reviews* 58.4: 773-781.
- Darakhshan, S., Bidmeshkipour, A., Khazaei, M., Rabzia, A., and Ghanbari, A. (2013), “Synergistic effects of tamoxifen and tranilast on VEGF and MMP-9 regulation in cultured human breast cancer cells”, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14.11: 6869-6874.
- Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J, and Peto R., (2011), “Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials”, *Lancet*. 378 (9793): 771–84.
- Dowsett, M., Houghton, J., Iden, C., Salter, J., Farndon, J., A'hern, R., and Baum, M. (2006),”Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status” *Annals of Oncology* 17.5: 818-826.
- Early Breast Cancer Trialists’ Collaborative Group (EBCTCG), (2005), “Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials” *Lancet* 365: 1687–717
- Early Breast Cancer Trialists’ Collaborative Group, (2011), “Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials” *Lancet* 378(9793):771–78
- Falcone T, and Hurd WW., (2013), “Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide”, *Springer Science & Business Media*. pp. 39–. ISBN 978-1-4614-6837-0.
- Farci, D., Esposito, F., Alaoui, S. and Piano D. (2016), “The S-layer protein DR_2577 Binds Deinoxanthin and under Desiccation Conditions Protects against UV-Radiation in *Deinococcus radiodurans*” *Frontiers in Microbiology*

- Foukakis T, and Bergh J. (2019), “Prognostic and predictive factors in early, non-metastatic breast cancer”, In: UpToDate. Burstein HJ, Vora SR (eds.). **Waltham, MA: UpToDate**
- Garvin, S., Nilsson, U. W., Huss, F. R., Kratz, G., and Dabrosin, C. (2006), “Estradiol increases VEGF in human breast studied by whole-tissue culture”, *Cell and tissue research* 325.2: 245-251.
- Gültekin, M. and Boztaş G., (2014), “Türkiye kanser istatistikleri” **Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu** 43
- Haque, R., Ahmed, S. A., Inzhakova, G., Shi, J., Avila, C., Polikoff, J., and Press, M. F. (2012) “Impact of breast cancer subtypes and treatment on survival: an analysis spanning two decades”, *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 21.10: 1848-1855.
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., and Cardoso, F. (2019). “Breast cancer”, *Nature Reviews Disease Primers*,5(1), [66].
- Hart, C. D., Migliaccio, I., Malorni, L., Guarducci, C., Biganzoli, L., and Di Leo, A. (2015), “Challenges in the management of advanced, ER-positive, HER2-negative breast cancer”, *Nature reviews Clinical oncology* 12.9: 541.
- Hesselbarth, N., Pettinelli, C., Gericke, M., Berger, C., Kunath, A., Stumvoll, M., and Klötting, N. (2015), “Tamoxifen affects glucose and lipid metabolism parameters, causes browning of subcutaneous adipose tissue and transient body composition changes in C57BL/6NTac mice”, *Biochemical and biophysical research communications* 464.3: 724-729.
- Hortobagyi, G. N., de la Garza Salazar, J., Pritchard, K., Amadori, D., Haidinger, R., Hudis, C. A., and O'Shaughnessy, J. A. (2005), “The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival” *Clinical breast cancer* 6.5: 391-401.
- Horwitz, K. B., McGuire, W. L., Pearson, O. H. and Segaloff, A. (1975) *Science* 189, 726-727.
- Huggins, C. and Scott, W. W. (1945) *Annals of Surgery*. 122, 1031-1041.
- Huggins, C., Moon, R. C. and Morii, S. (1962) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48, 379-386.
- Hwang, J. J., Kim, H. N., Kim, J., Cho, D. H., Kim, M. J., Kim, Y. S., and Koh, J. Y. (2010), “Zinc (II) ion mediates tamoxifen-induced autophagy and cell death in MCF-7 breast cancer cell line” *Biometals* 23.6: 997-1013.
- Ibrahim, A. B., Zaki, H. F., Ibrahim, W. W., Omran, M. M., and Shouman, S. A. (2019), “Evaluation of tamoxifen and simvastatin as the combination therapy

- for the treatment of hormonal dependent breast cancer cells” *Toxicology Reports* 6: 1114-1126.
- J. William, T. Berger, and D. Elston, Andrews (2015) “Diseases of the skin: clinical dermatology”, *Elsevier Health Sciences*
- Jacobsen B. M., S. A. Schittone, J. K. Richer and K. B. Horwitz., (2004), “Progesterone independent effects of human progesterone receptors (PR) in estrogen receptor positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology”, *Molecular Endocrinology* 24, 574-586
- Janku, Filip; Hong, David S.; Fu, Siqing; Piha-Paul, Sarina A.; Naing, Aung; Falchook, Gerald S.; Tsimberidou, Apostolia M.; Stepanek, Vanda M.; Moulder, Stacy L. (2014-01-30). “Assessing PIK3CA and PTEN in early-phase trials with PI3K/AKT/mTOR inhibitors”. *Cell Reports*. 6 (2): 377–387.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., and Thun, M. J. (2007), “Cancer statistics, 2007”, *CA: a cancer journal for clinicians*, 57.1: 43-66.
- Ji, H., (2010) “Insight into the Strong Antioxidant Activity of Deinoxanthin, a Unique Carotenoid in *Deinococcus radiodurans*“, *International Journal of Molecular Sciences* 11:4506-4510
- Johnson, K. E., Forward, J. A., Tippy, M. D., Ceglowski, J. R., El-Husayni, S., Kulenthirarajan, R., and Battinelli, E. M. (2017), “Tamoxifen directly inhibits platelet angiogenic potential and platelet-mediated metastasis”, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 37.4: 664-674.
- Jordan VC, (2008), “The 38th David A. Karnofsky lecture: the paradoxical actions of estrogen in breast cancer-survival or death?”, *Journal of Clinical Oncology*, 26: 3073–82
- Jordan VC., (1994), “The development of tamoxifen for breast cancer therapy. In: Jordan VC, ed. Long-term tamoxifen treatment for breast cancer”, **Madison: University of Wisconsin Press**, 3-26.
- Jordan VC., (2007), “Chemoprevention of breast cancer with selective oestrogenreceptor modulators”, *Nature Reviews Cancer*, 7: 46–53
- Kaufman, D. W., Shapiro, S., Slone, D., Rosenberg, L., Miettinen, O. S., Stolley, P. D., Knapp, R. C., Leavitt, T., Jr., Watring, W. G., Rosenshein, N. B., Lewis, J. L., Jr., Schottenfeld, D. and Engle, R. L., Jr. (1980) *New England Journal of Medicine*. 303, 1045-1047.
- Kim, J. I. And Cox, M. M. (2002), “The RecA proteins of *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli* promote DNA strand exchange via inverse pathways”, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 7917–7921.
- Krinsky NI, and Johnson EJ, (2005), “Carotenoid actions and their relation to health and disease” *Molecular Aspects of Medicine* ; 26: 459-516

- Kuchenbaecker, K. B., Hopper, J. L., Barnes, D. R., Phillips, K. A., Mooij, T. M., Roos-Blom, M. J., and Goldgar, D. E. (2017), “BRCA1 ve BRCA2 mutasyon taşıyıcıları için meme, yumurtalık ve karşı meme kanseri riskleri”, **JAMA**, 317 (23): 2402-2416.
- Kuchenbaecker, K. B., Hopper, J. L., Barnes, D. R., Phillips, K. A., Mooij, T. M., Roos-Blom, M. J., and Goldgar, D. E. (2017)., “Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers” **Jama** 317.23: 2402-2416.
- Lagadec, C., Adriaenssens, E., Toillon, R. A., Chopin, V., Romon, R., Van Coppenolle, F., and Le Bourhis, X. (2008), “Tamoxifen and TRAIL synergistically induce apoptosis in breast cancer cells” **Oncogene** 27.10: 1472-1477.
- Lemee, L., Peuchant, E and Clerc, M. (1996), “Deinoxanthin: A new Carotenoid Isolated from *Deinococcus radiurans*”, **Elsevier Science** 53:919-926
- Liang, Z., Li, W., Liu, J., Li, J., He, F., Jiang, Y., and Ren, Y.. (2017), “Simvastatin suppresses the DNA replication licensing factor MCM7 and inhibits the growth of tamoxifen-resistant breast cancer cells”, **Scientific reports** 7.1: 1-11.
- Liu, C. Y., Hung, M. H., Wang, D. S., Chu, P. Y., Su, J. C., Teng, T. H., and Tseng, L. M. (2014). “Tamoxifen induces apoptosis through cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A–dependent phospho-Akt inactivation in estrogen receptor–negative human breast cancer cells.” **Breast cancer research**, 16(5), 431.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L. and Darnell, J., (2004) “Molecular Cell Biology”, **W.H Freeman and Company, New York, 5th Edition**, 935-941 p.
- López-Ozuna, V. M., Hachim, I. Y., Hachim, M. Y., Lebrun, J. J., and Ali, S. (2016), “Prolactin pro-differentiation pathway in triple negative breast cancer: impact on prognosis and potential therapy”, **Scientific reports** 6.1: 1-13.
- Lydon J. P., F. J. Demayo., C. R. Funck., S. K. Mani., A. R. Hughes., Jr. C. A. Montgomery., G. Shymala., O. M. Conneely and B. W. O’Malley, (1995), “Mice lacking progesterone receptor exhibit pleotropic reproductive abnormalities”, **Genes and Development** 9, 2266-2278
- Lydon J. P., G. Ge., F. S. Kittrell., D. Medina and B. W. O’Malley, (1999), “Murine mammary gland carcinogenesis is critically dependent on progesterone receptor function”, **Cancer Research** 59, 4276-4284
- McGuire A, Lowery AJ, Kell MR, Kerin MJ, and Sweeney KJ., (2017), “Locoregional recurrence following breast cancer surgery in the trastuzumab era: a systematic review by subtype”, **Annals of Surgical Oncology** 24(11):3124-3132
- Merey, S. (2002), “Breast Cancer Screening Behavior in Women”, **University of Istanbul, Istanbul** (2002).

- Metzger-Filho, O., Sun, Z., Viale, G., Price, K. N., Crivellari, D., Snyder, R. D., and Cardoso, F. (2013), "Patterns of recurrence and outcome according to breast cancer subtypes in lymph node-negative disease: results from International Breast Cancer Study Group Trials VIII and IX", *Journal of clinical oncology* 31.25: 3083.
- Mork CN, Faller DV, and Spanjaard RA., (2007) "Loss of putative tumor suppressor EI24/PIG8 confers resistance to etoposide", *FEBS Letters*, 581:5440-4.
- Muller, K., Carpenter, KLH., Challis, IR., Skepper, JN., and Arends, MJ. (2002), "Carotenoids induce apoptosis in the T-lymphoblast cell line Jurkat E6.1", *Free Radical Research* 36: 791-802.
- Musgrove, Elizabeth A.; Caldon, C. Elizabeth; Barraclough, Jane; Stone, Andrew; Sutherland, Robert L. (2011). "Cyclin D as a therapeutic target in cancer". *Nature Reviews*.
- Muthukkumar, S., Nair, P., Sells, S., Maddiwar, N., and Jacob, R., (1995), "Role of EGR-1 in Thapsigargin-Inducible Apoptosis in the Melanoma Cell Line A375-C6", *Molecular and Cellular Biology*, 15: 6262–6272
- Nara, E., Terasaki, M., and Nagao, A., (2005), "Characterization of Apoptosis Induced by Fucoxanthin in Human Promyelocytic Leukemia Cells", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69 (1), 224–227.
- Narumi, I., Satoh, K., Cui, S., Funayama, T., Kitayama, S., and Watanabe, H., (2004), "PprA: a novel protein from *Deinococcus radiodurans* that stimulates DNA ligation" *Molecular Microbiology* 54(1), 278–285.
- National Cancer Institute "Drug Combinations to Overcome Treatment Resistance", Son erişim tarihi:03.10.2017
- National Cancer Institute, "Combination Therapies for Cancer-Annual Plan", Son erişim tarihi: 03.10.2017.
- National Canser Institue, "BRCA Mutations: Cancer Risk and Genetic Testing", <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics/brca-fact-sheet#what-are-brca1-and-brca2> , Son erişim tarihi: 30.01.2018
- National Canser Institue, "BRCA Mutations: Cancer Risk and Genetic Testing", <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics/brca-fact-sheet#what-are-brca1-and-brca2>, Son erişim tarihi: 30.01.2018
- Ng Yee, C., Yen, H., Hsiao, H., and Su, S. (2018), "Phytochemicals in Skin Cancer Precention and Treatment: An Uptaked Rewiew", *International Journal of Molecular Sciences* 19:941.
- Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., and Van Loo, P. (2016), "Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences". *Nature* 534.7605: 47-54.

- Nilsson, Ulrika W., Stina Garvin, and Charlotta Dabrosin, (2007), “MMP-2 and MMP-9 activity is regulated by estradiol and tamoxifen in cultured human breast cancer cells”, *Breast cancer research and treatment* 102.3: 253-261.
- O’Neill K, Chen S, and Diaz Brinton R, (2004), “Impact of the selective estrogen receptor modulator, tamoxifen, on neural outgrowth and survival following toxic insults associated with aging and Alzheimer’s disease”, *Experimental Neurology*; 188: 268–78
- Oh, Do-Youn, and Yung-Jue Bang, (2019), “HER2-targeted therapies—a role beyond breast cancer” *Nature Reviews Clinical Oncology*, 1-16.
- Osborne, C. K. (1998). “Tamoxifen in the treatment of breast cancer.” *New England Journal of Medicine*, 339(22), 1609-1618.
- Osborne, C. K., Yochmowitz, M. G., Knight III, W. A. and McGuire, W. L. (1980). “The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer.” *Cancer*, 46(S12), 2884-2888.
- Osborne, C. Kent, and Rachel Schiff, (2011), “Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer”, *Annual review of medicine* 62: 233-247.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., and Yönden, Z., (2015). Review Article: Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *Journal of Clinical and Experimental Investigations* 6: 331-336
- Özdoğan, M. “Meme Kanseri Belirtileri, Evreleri ve Tedavisi”, <https://www.drozdogan.com/meme-kanseri-belirtileri-evreleri-ve-tedavisi/> , Son erişim tarihi: 06.02.2020
- Powles, T. J., Ashley, S., Tidy, A., Smith, I. E., and Dowsett, M. (2007), “Twenty year follow-up of the Royal Marsden randomized, double blinded tamoxifen breast cancer prevention trial”, *Journal National Cancer Institute*, 99: 283–90
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., and Tiwari, R., (2014), “Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. Biomed Research International”, *Volume 2014*, Article ID 761264, 19 pages.
- Rao AV and Rao LG, (2007), “Carotenoids and human health”, *Pharmacol Res* 55: 207-216.
- Ravdin, P. M., Cronin, K. A., Howlader, N., Berg, C. D., Chlebowski, R. T., Feuer, E. J., and Berry, D. A. (2007), “The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States” *New England Journal of Medicine* 356.16: 1670-1674.
- Ren, J.-X., Gong, Y., Ling, H., Hu, X. and Shao, Z.-M. (2019), “Racial/ethnic differences in the outcomes of patients with metastatic breast cancer: contributions of demographic, socioeconomic, tumor and metastatic characteristics”, *Breast Cancer Research Treat*, 173, 225–237

- Riley, P. A., (1994), "Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation", *International Journal of Radiation Biology*, 65 (1): 27-33
- Robertson, D. W., Katzenellenbogen, J. A., Long, D. J., Rorke, E. A., and Katzenellenbogen, B. S., (1982), "Tamoxifen antiestrogens. A comparison of the activity, pharmacokinetics, and metabolic activation of the cis and trans isomers of tamoxifen", *Journal of Steroid Biochemistry*, 16: 1-13
- Romond, E. H., Perez, E. A., Bryant, J., Suman, V. J., Geyer Jr, C. E., Davidson, N. E., and Swain, S. M. (2005), "Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer" *New England Journal of Medicine* 353.16: 1673-1684.
- Schuessler, H., and Schilling, K., (1984), "Oxygen effect in the radiolysis of proteins. Part 2. Bovine serum albumin", *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 45(3): 267-281.
- Sharoni. Y., Danilenko, M., Walfisch, S., Amir, H., Nahum, A., Ben- Doe, A., Hirsch, K., Khanin, M., Steiner, M., Agemy, L., Zango, G., and Levy, J. (2002), "Role of gene regulation in the cancer activity of carotenoids", *Pure and Applied Chemistry* 74: 1469-1477.
- Singh, M. N., Stringfellow, H. F., Paraskevaidis, E., Martin-Hirsch, P. L., and Martin, F. L. (2007), "Tamoxifen: Important considerations of a multi-functional compound with organ-specific properties", *Cancer Treatment Reviews*, 2007; 33: 91-100
- Singh, Maneesh N., Pierre L. Martin-Hirsch, and Francis L. Martin. "The multiple applications of tamoxifen: an example pointing to SERM modulation being the aspirin of the 21st century." *Medical Science Monitor* 14.9 (2008): RA144-RA148.
- Singletery, S. Eva, and James L. Connolly. "Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual." *CA: a cancer journal for clinicians*, 56.1 (2006): 37-47.
- Subramani, T., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Ho, C. L., Omar, A. R., Aziz, S. A., and Alitheen, N. B. "Vitamin C suppresses cell death in MCF- 7 human breast cancer cells induced by tamoxifen." *Journal of cellular and molecular medicine* 18.2 (2014): 305-313.
- Sun, Z., Shen, S., and Tian, B., (2009). "Functional analysis of c- carotene ketolase involved in the carotenoid biosynthesis of *Deinococcus radiodurans*." *FEMS Microbiology Letters* 301 (2009) 21-27.
- Tan, G., Gyllenhaal, C., and Soejarto, D. (2006). "Biodiversity as a source of anticancer drugs." *Current Drug Targets*, 7(3), 265-277.

- Theriault RL, Carlson RW, Allred C, Anderson BO, Burstein HJ, Edge SB, Farrar WB, Forero A, Giordano SH, Goldstein LJ, Gradishar WJ, Hayes DF, Hudis CA, Isakoff SJ, Ljung BME, Mankoff DA, Marcom PK, Mayer IA, McCormick B, Pierce LJ, Reed EC, Schwartzberg LS, Smith ML, Soliman H, Somlo G, Ward JH, Wolff AC, Zellars R, Shead DA, Kumar R: “Breast cancer, version 3.2013.” *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 11(7), 753-761.
- Tian, B., Sun, Z., Xu, Z., Shen, S., Wang, H., and Hua, Y. (2018). “Carotenoid 3,4 - desaturase is involved in carotenoid biosynthesis in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*.” *Microbiology*, 154(12), 3697-3706.
- Tian, B., Xu, Z., Sun, Z., Lin, J., and Hua, Y., (2007). “Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(6), 902-911.
- Tian, B., Sun, Z., Xu, Z., Shen, S., Wang, H., and Hua, Y., (2008). “Carotenoid 39,49 desaturase is involved in carotenoid biosynthesis in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*.” *Microbiology*, 154(12), 3697–3706.
- Tsai T., Vu, C, and Henson DE. (2015). Cutaneous, ocular and visceral melanoma in African Americans and Caucasians. *Melanoma Research*, 2005;15:213-217.
- Turkcerrahi, “Meme Kanseri Tipleri (Çeşitleri)”, <https://www.turkcerrahi.com/makaleler/meme/meme-kanseri/tipleri-cesitleri/>, 2020
- Turkcerrahi, “Meme Kanserinde Radyoterapi”, <https://www.turkcerrahi.com/makaleler/meme/meme-kanseri/radyoterapi/>, 2020
- Türkiye Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (2017). Türkiye Kanser İstatistikleri. ANKARA. pp.12.
- Vaglio A, Salvarani C, and Buzio C: “Retroperitoneal fibrosis.” *The Lancet*, 2006; 367: 241–51
- Vetoshkina TV, Dubskaya TY, Fomina TI, Ermolaeva LA, and Goldberg VE., (2007) “Toxic effect of vepesid on morphology and function of the rat liver”, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 143: 21-3.
- Vienonen A., H. Syvala., S. Miettinen., P. Tuohimaa and T. Ylikomi, (2002), “Expression of progesterone receptor isoforms A and B is differentially regulated by estrogen in different breast cancer cell lines.” *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 80, 307-313
- Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, and Kennecke H. (2010), Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *Journal of Clinical Oncology*. 28(10):1684-91.

- Vranic, S., Gatalica, Z., and Wang, Z. Y. (2011). Update on the molecular profile of the MDA-MB-453 cell line as a model for apocrine breast carcinoma studies. *Oncology letters*, 2(6), 1131-1137.
- Walt, N., Zakeri, Z., and Cronje, M., (2016), “The Induction of Apoptosis in A375 Malignant Melanoma Cells by *Sutherlandia frutescens*.” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Welch, HG., Woloshin, S. and Schwartz, LM (2005). “Skin biopsy rates and incidence of melanoma: population based ecological study.” *BMJ*, 331(7515),481.
- WHO, World Health Organization. World Cancer Report, (2008)
- Xu, Z., Tian B., Sun, Z., Lin, J. and Hua Y., (2007). “Identification and functional analysis of a phytoene desaturase gene from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*.” *Microbiology*, 153, 1642–1652.
- Zhang, M. H., Man, H. T., Zhao, X. D., Dong, N., and Ma, S. L. “Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials.” *Biomedical reports* 2(1), 41-52.
- Zhou, Z., Zhang, W., Su, S., Chen, M., Lu, W., and Xu, Y. (2015) “CYP287A1 is a carotenoid 2- β -hydroxylase required for deinoxanthin biosynthesis in *Deinococcus radiodurans* R1” *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(24), 10539–10546.

ÖZGEÇMİŞ

Nihan Günay, 1993 yılında Erzincan'da doğmuştur. Erzincan Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Fen Bilimleri Öğretmenliği bölümünde 2015 yılında lisans öğrenimini tamamlamıştır. 2017 yılında başladığı Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında ki yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.

