

**T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GAMBOJİK ASİT VE TRASTUZUMAB'IN MDA-MB-453 MEME
KANSERİ HÜCRE HATTINDA BAZI ENZİMLER ÜZERİNE
SİNERJİK ETKİLERİ**

Abdullah ALPKAN

Danışman: Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN
2019
Her Hakkı Saklıdır.**

Kabul ve Onay Sayfası

Prof. Dr. Murat ÇANKAYA danışmanlığında, Abdullah ALPKAN tarafından hazırlanan bu çalışma 05/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

İmza:

Üye : Prof. Dr. Deniz EKİNCİ

İmza:

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KUZUCU

İmza:

Yukarıdaki sonuç Enstitü Yönetim Kurulunun 12/07/2019 tarih ve 27/9..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa Fatih ERTUGAY
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etięe Uygunluk Sayfası

“Gambojik Asit ve Trastuzumab’ın MDA-MB-453 Meme Kanseri Hücre Hattında Bazı Enzimler Üzerine Sinerjik Etkileri” 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 gerektiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim.
05/07/2019

Abdullah ALPKAN



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GAMBOJİK ASİT VE TRASTUZUMAB'IN MDA-MB-453 MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA BAZI ENZİMLER ÜZERİNE SİNERJİK ETKİLERİ

Abdullah ALPKAN

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

Meme kanseri kadınlar arasında en fazla görülen ve ölüme sonuçlanan kanserdir. Meme kanserinde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, terapötik protein ve immünoterapi tedavileri kullanılmaktadır. Tedavide kullanılan kemoterapötik ajanların en önemli etki mekanizmaları apoptozdur.

Meme kanserinin %20-25'i aşırı HER2/neu reseptörünün ekspresyonu ile ilişkilendirilmektedir. HER2 aşırı ekspresyonunu durmak ve tümör oluşumunu engelleyecek monoklonal antikörlerin kullanılması tedavi seçenekleri arasında yer almaktadır.

Trastuzumab HER2 reseptörüne bağlanarak antikanser etki gösteren monoklonal bir antikördür. Trastuzumab'ın antikanser ilaçları ve antikanser etki gösteren birçok ajanla kombinasyon tedavilerinde sağ kalımda olumlu sonuçlar alınmıştır.

Gambojik asit *Garcinia hanburyi* bitkisinden saflaştırılan ksanfön türevi bir bileşiktir. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarla gambojik asidin hücre döngüsünü durdurma ve apoptoz indüksiyonu yoluyla tümör gelişimini inhibe edici etki gösterdiği kanıtlanmıştır.

Bu çalışma kapsamında HER2/neu ekspresyonu yüksek olan MDA-MB-453 meme karsinomu hücre hattında trastuzumab ve gambojik asit'in ayrı ayrı ve kombinasyonlarının bazı antioksidanlar üzerine sinerjistik toksisite etkilerinin araştırılması planlanmaktadır.

2019, 64 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Enzimler, Gambojik asit, Trastuzumab.

ABSTRACT

Master Thesis

SYNERGISTIC EFFECTS OF GAMBOGIC ACID AND TRASTUZUMAB ON SOME ENZYMES IN MDA-MB453 BREAST CANCER CELLS

Abdullah ALPKAN

Erzincan Binali Yıldırım University
Institute of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

Breast cancer is the most common and fatal cancer among women. Surgery, chemotherapy, radiotherapy, therapeutic protein and immunotherapy treatments are used in breast cancer. The most important mechanism of action of chemotherapeutic agents used in treatment is apoptosis.

20-25% of breast cancer is associated with the expression of excessive HER2 / neu receptor. Stopping HER2 overexpression and using monoclonal antibodies to prevent tumor formation are among the treatment options.

Trastuzumab is a monoclonal antibody that binds to the HER2 receptor and has anticancer effect. Trastuzumab's anticancer drugs and combination therapy with many anticancer agents have yielded positive results in disease-free and overall survival.

Gambogic acid is a xyfon-derived compound purified from *Garcinia hanburyi*. In vivo and in vitro studies have shown that gambogic acid has an inhibitory effect on tumor growth by inhibiting cell cycle and induction of apoptosis.

The aim of this study is to investigate the synergistic toxicity effects of individual and combinations of trastuzumab and gambogic acid on some antioxidants in MDA-MB-453 breast carcinoma cell line with high HER2 / neu expression.

2019, 64 Pages

Keywords: Enzymes, Gambogic acid, Trastuzumab.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, tecrübe ve yardımıyla her zaman bana destek olan, yanında çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum bölüm başkanımız ve aynı zaman da tez danışmanım olan Sayın Prof. Dr. Murat ÇANKAYA'ya,

Her zaman bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve üzerimde çok emeği olan Sayın Dr. Öğretim Üyesi Aykut ÖZGÜR hocama, laboratuvar çalışmalarında bilgisinden yararlandığım Sayın Dr. Öğretim Üyesi Sayın Ahmet ALTAY'a, Sayın Dr. Öğretim Üyesi Mehmet KUZUCU'ya ve laboratuvarda birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Ahmet ÇETİN'e, Seda KILIÇ'a, Nihan GÜNAY'a ve Uğur DURMUŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamda beni gambojik asit ve trastuzumab'ın MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattında bazı enzimler üzerine sinerjik etkileri adlı ve FYL-2018-571 numaralı projemle destekleyen Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi BAP birimi yetkililerine ve Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi personeline en derin şükranlarımı sunarım.

Beni yetiştiren, bugünlere ulaşmamda en çok emeği olan ve her zaman desteklerini esirgemeyen annem Rahime ALPKAN'a ve babam Hacı ALPKAN'a, kardeşlerime ve bütün ALPKAN ailesine teşekkür ederim.

Abdullah ALPKAN

Temmuz, 2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ.....	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1.Kanser.....	3
2.2. Kanser Hücrelerinin Ortak Özellikleri	8
2.3. Meme Kanseri	8
2.3.1. Meme kanseri istatistikleri.....	8
2.3.2. Meme anatomisi.....	10
2.3.3 Meme kanseri risk faktörleri.....	10
2.3.4. Histopatolojik sınıflandırma	11
2.3.5. Moleküller sınıflandırma	14
2.3.6. Meme kanseri evreleri	16
2.3.7. Tedavi yöntemleri.....	17
2.4. Trastuzumab	20
2.5. Gambojik Asit	22
2.6. Enzimler	23
2.7. Antioksidanlar	25
2.7.1. Katalaz	26
2.7.2. Glutasyon peroksidaz	27
2.7.3. Karbonik anhidraz	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	28
3.1. Kullanılan Cihazlar.....	28
3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	28
3.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltilerin Hazırlanması.....	29
3.4. Hücre Kültürü.....	30
3.4.1. Besiyerlerinin hazırlanması ve inkübasyon koşulları.....	31

3.4.2. Hücre hatlarının pasajlanması.....	31
3.4.3. Hücrelerin dondurulması	32
3.4.4. Dondurulan hücrelerin çözündürülmesi	32
3.4.5. Hücre sayımı	33
3.4.6. Hücre ekimi	34
3.4.7. Hücre parçalama	36
3.4.8. Uygulanacak ilaçların hazırlanması.....	36
3.5. Protein Tayini	37
3.5.1. Bradford yöntemi ile protein tayini	37
3.5.2. Katalaz enzimi aktivite tayini	37
3.5.3. Glutasyon peroksidaz enzimi aktivite tayini	38
3.5.4. Karbonik anhidraz aktivite tayini	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	41
4.1. Sinerjik Etki Değerleri.....	42
4.1. Enzimlerin Aktivite Değerleri	52
5. SONUÇLAR.....	55
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	65

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. 2018’de Dünyadaki kanser insidansı.....	5
Şekil 2.2. 2008’de Dünyadaki kanser ölüm oranları.....	5
Şekil 2.3. Dünya Sağlık Örgütü 2018-2040 yılları arasında yaşa Standardize Edilmiş Kanser İstatistiği.....	6
Şekil 2.4. Sağlık Bakanlığı yaşa standardize edilmiş 2009-2014 yılları arasındaki kanser hızı istatistikleri.....	7
Şekil 2.5. Dünya Sağlık Örgütü 2018 yaşa standardize edilmiş Türkiye’de en fazla görülen 10 kanser türü.....	7
Şekil 2.6. 2018 Yılında standardize edilmiş bölgesel meme kanseri insidansı ve ölüm oranları.....	9
Şekil 2.7. Gambojik asitin kimyasal yapısı.....	22
Şekil 2.8. Katalaz enzimi tepkime şeması.....	26
Şekil 2.9. Glutatyon peroksidaz enzimi tepkime şeması.....	27
Şekil 2.10. Karbonik anhidraz enzimi tepkime şeması.....	27
Şekil 3.1.Thoma lamının sayım yapılan yüzeyi.....	34
Şekil 3.2. Karbonik anhidrazın p-nitrofenilastatın p-nitrofenole dönüşümünü sağlayan enzimatik reaksiyonu.....	39
Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile total protein tayini standart grafiği.....	41
Şekil 4.2. 12. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen % canlılık oranları.....	42
Şekil 4.3. 12. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen doz-effect curve eğrisi.....	43
Şekil 4.4. 12. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen median-effect plot eğrisi	43
Şekil 4.5. 12. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Combination Index plot eğrisi.....	44
Şekil 4.6. 12. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Logarithmic Combination Index plot eğrisi.....	44
Şekil 4.7. 24. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen % canlılık oranları.....	45

Şekil 4.8. 24. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen doz-effect curve eğrisi.....	46
Şekil 4.9. 24. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen median-effect Plot eğrisi	46
Şekil 4.10. 24. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Combinastion Index Plot eğrisi.....	47
Şekil 4.11. 24. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Logarithmic Combination Index Plot eğrisi.....	47
Şekil 4.12. 48. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen % canlılık oranları.....	48
Şekil 4.13. 48. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Dose effect cure eğrisi.....	48
Şekil 4.14. 48. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen median-effect plot eğrisi.....	49
Şekil 4.15. 48. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Combination Index Plot eğrisi.....	49
Şekil 4.16. 48. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Logarithmic Combination Index Plot eğrisi.....	50
Şekil 4.17. 72. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen % canlılık oranları.....	50
Şekil 4.18. 72. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Dose effect cure eğrisi.....	51
Şekil 4.19. 72. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen medain effect plot eğrisi.....	51
Şekil 4.20. 72. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Combiantion Index plot eğrisi.....	52
Şekil 4.21. 72. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Logarithmic Combiantion Index plot eğrisi.....	52

Şekil 4.22. Katalaz enziminin 24, 48, ve 72.saatteki aktivite grafiği.....	53
Şekil 4.23. Glutasyon peroksidaz enziminin 24, 48, ve 72.saatteki aktivite grafiği.....	54
Şekil 4.24. Karbonik anhidraz enziminin 24, 48, ve 72.saatteki aktivite grafiği.....	54



TABLULAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1. Kombinasyon çalışmalarında kullanılan maddelerin sinerjistik-aditif-antagonistik sitotoksik etkilerini belirlemede kullanılan Kombinasyon İndeksi (CI) değerleri.....	35
Tablo 3.2. Katalaz enziminin aktivite tayini için kullanılan çözeltiler ve miktarları.....	37
Tablo 3.3. Glutasyon peroksidaz enziminin aktivite tayini için kullanılan çözeltiler ve miktarları.....	38
Tablo 3.4. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi tayini için kullanılan çözeltiler ve miktarları.....	39
Tablo 4.1. 12.saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında okunan CI değerleri.....	42
Tablo 4.2. 24. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında okunan CI değerleri.....	45
Tablo 4.3. 48. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında okunan CI değerleri.....	48
Tablo 4.4. 72. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında okunan CI değerleri.....	50
Tablo 4.5. Katalaz enziminin 24, 48, ve 72.saat madde uygulanan hücre hattında okunan spektrofotometrik değerleri.....	53
Tablo 4.6. Glutasyon peroksidaz enziminin 24, 48, ve 72.saat madde uygulanan hücre hattında okunan spektrofotometrik değerleri.....	53
Tablo 4.7. Karbonik anhidraz enziminin 24, 48, ve 72.saat madde uygulanan hücre hattında okunan spektrofotometrik değerleri.....	54

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

<i>g</i>	Gram
<i>CI</i>	Kombinasyon İndeksi
<i>L</i>	Litre
<i>mg</i>	Miligram
<i>mL</i>	Mililitre
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
<i>nm</i>	Nanomolar
<i>pH</i>	H ⁺ iyon konsantrasyonunun eksi logaritması
<i>rpm</i>	Dakikadaki devir sayısı
<i>xg</i>	Yerçekimi ivmesi
%	Yüzde

Kısaltmalar

ACS	Amerikan Kanser Topluluğu
BRCA 1 /2	Meme kanseri geni 1/2
CK5/6	Sitokeratin 5/6
DMSO	Dimetilsülfoksit
ER +/-	Östrojen reseptörü Pozitif/ Negatif
HER+/-	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2+/-
IARC	Uluslararası Kanser Ajansı
NCI	Ulusal Kanser Enstitüsü
PR+/-	Progesteron Hormonu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Akciğer kanserinden sonra dünyada en fazla insidans ve mortaliteye sahip kanser türü kadınlarda görülen meme kanseridir. Meme kanseri birçok ülkede en sık görülen kanser türüdür (185 ülkenin 154'ünde). Birçok ülke için de (100'den fazla) kanserden ölümlerin önde gelen nedenidir (Torre vd., 2016). Yılda yaklaşık 1.38 milyon yeni meme kanseri vakası teşhis edilmekte olup sadece Birleşik Krallıkta her yıl elli bin kadına ve 400 erkeğe meme kanser teşhisi konulmaktadır. Dünyada bu kanser türünden dolayı yılda 458.000 kadın ölümü meydana gelmektedir (Eccles vd., 2013). Meme kanserinin gelişmesinde birçok faktörün etkisi vardır (Koyunolğu vd., 2013). Bu faktörlerin en önemlilerinden bir tanesi kötü prognozlu ilişkili olan HER2 veya (Eccles vd., 2013) HER2/neu reseptörünün (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2) aşırı üretilmesidir. Bu neden kanser oluşumlarının %20'sini meydana getirmektedir (Vega-Rubín-de-Celis vd., 2018). Heterojen bir yapıda olan meme kanseri farklı alt tiplere sahip olduğu için etiyolojisinin anlaşılması önem arz etmektedir. Bu heterojenliğin çözülmesi ile birlikte hedefe yönelik geliştirilen terapötik ajanlar olumlu sonuçlar vermeye başlamıştır. Hedefe yönelik terapötik ajanların verimliliğini artırmak için tümör hücrelerine özgü moleküller yolakların anlaşılması önemlidir (Polyak, 2007).

Bu amaçla geliştirilen monoklonal antikolar spesifik olarak kanser hücrelerini hedeflemekte ve güçlü bir anti-kanser potansiyeli göstermektedir (Wu vd., 2018). Bugüne kadar metastatik meme kanseri hastalarının tedavisinde kullanılmak amaçlı HER2-'yi hedef alan trastuzumab, pertuzumab, lapatinip ve ado-trastuzumab emtansin olmak üzere dört terapötik ajan onaylanmıştır (Figueroa-Magalhaes vd., 2014). Trastuzumab (Herceptin®) HER2'yi engellemek için geliştirilen bir monoklonal antikordur. Trastuzumab'ın haftalık veya üç haftada bir tek başına veya kemoterapi kombinasyonu ile yapılan tedavilerde HER2-pozitif metastatik meme kanserinde iyileştirici etkisi gösterdiği (Piccart-Gebhart vd., 2005b) ve erken evre meme kanseri hastalarının sağ kalım süresini uzattığı yapılan çalışmalarla ispatlanmıştır (Krishteleit vd., 2016).

Gambojik asit *Garcinia hanburyi* bitkisinden saflaştırılan halkalı ksanton (xanthone) türevi bir bileşiktir. Yapılan çalışmalar sonucunda *G. hanburyi*'den izole edilen

ksanfonların hücre döngüsünü durdurma, apoptoz indüksiyonunu sağlama, telomeraz inhibisyonu ve anti-anjiyogenes gibi sitotoksik etkiler göstermeleri nedeni ile birçok çalışmada araştırma konusu olmuştur. Garcinia hanburiye'den saflaştırılan en önemli ksanfonlardan biri olan Gambojik asit uygulaması ile yapılan tedaviler neticesinde gambojik asidin hücre döngüsünü durdurmak, kanser hücrelerinde apoptoz indüksiyon yoluyla hücre büyümesini inhibe etmek gibi etkileri olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Gambojik asit ile Docetaxel (Doc), 5-florourasil (5-FU) ve oksaliptatin (Oksa) gibi kemateratöpik ajanların kombinasyonu oluşturularak BGC-823 ve MKN-28 mide kanseri hücre hatlarında yapılan uygulamalarda bu hücre hatlarına karşı sitotoksik aktiviteler üzerinde sinerjik etkileri olduğu tespit edilmiştir (Jia vd., 2015). Yapılan detaylı literatür taraması sonucunda meme kanser hücrelerinde Trastuzumab ve Gambojik asit kombinasyonu ile oluşturulmuş herhangi bir çalışmanın literatürde yer almadığı tespit edilmiştir.

Çalışmadaki amacımız; in vitro olarak yapılan testler sonucunda meme kanseri hücre hattında yapılan çalışmalarla etkinliği gözlemlenmiş fakat klinik çalışmalarda ciddi yan etkileri tam olarak saptanamamış olan Gambojik asidin HER2 pozitif MDA-MB453 meme kanseri hücre hattında sitotoksik etkisini araştırmak ve trastuzumab ile kombinasyonu neticesinde bazı enzimler üzerinde etkilerinin olup olmadığını araştırmaktır.

2.KAYNAK ÖZETLERİ

2.1.Kanser

Kanser, gelir seviyesine bakılmaksızın tüm ülkelerde dünya çapında önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Dünya nüfusu artıkça, yaşlandıkça ve kanser oluşumunu tetikleyecek yaşam biçimi davranışlar insanlar tarafından benimsedikçe kanser vakalarının ve kanserden ölümlerin hızla artması beklenmektedir. Bu, özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde, ulaştırma ve işçilikle mekanizasyon, kadınların rollerinde kültürel değişimler ve uluslararası piyasalara daha fazla maruz kalma ve erişime neden olan ekonomik geçişe uğradıkları için önemlidir. Sonuç olarak yaşam tarzındaki risk faktörlerinin çoğu, tütün kullanımı, fiziksel hareketsizlik, aşırı kilo ve üreme düzensizlikleri vb. etkenler, yüksek, orta ve düşük gelirli ülkelerin çoğunda giderek yaygınlaşmaktadır (Torre vd., 2016).

Dünya çapında 2008 yılında yaklaşık 12.7 milyon kanser vakasının yaşandığı ve 7.6 milyon kanserden ölümün gerçekleştiği, gerçekleşen vakaların % 56'sını ve ölümlerin % 64'ünün gelişmekte olan ülkelerde gerçekleşmiştir (Jemal vd., 2011)

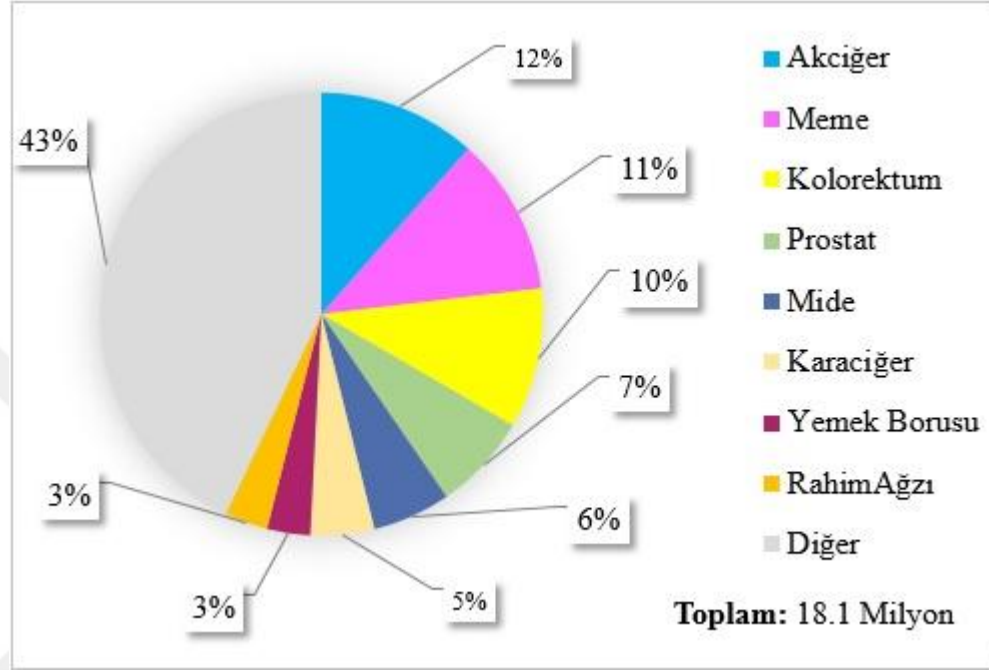
2012 yılında küresel çapta 14.1 milyon kişiye kanser teşhisi konulmuştur (bu vakaların 7.4 milyonu erkeklerde geriye kalan 6.7 milyonu kadınlarda görülmüştür). Aynı yılın verilerine göre en çok tanı alan kanser türü akciğer kanseri olup tüm vakaların % 13'ünü (1.8 milyon) oluşturur iken akciğer kanserinden sonra meme kanseri ikinci (1.7 milyon) ve üçüncü olarak kolon kanseri (1.4 milyon) en çok tanı yapılan kanser türleridir. Hem kadınlarda hem de erkekler de görülen tüm kanser vakaları için yaşa göre standardize edilmiş ortalama oran 2012'de 100.000 kişide 182'dir. Her cinsiyet için veriler ayrı ayrı ele alındığında bu durum erkekler için 100.000 kişide 205 iken, kadınlar için 100.000 kişide 165'tir (melanom dışı cilt kanseri hariç). Bazı ülkelerde ise bu ortalama oran değeri (Danimarka, Fransa, Avustralya, Belçika, Norveç, ABD, İrlanda, Güney Kore ve Hollanda) 100.000 kişide 300'den daha fazla tespit edilmiştir. Bu ülkelerdeki oranların yüksek olmasının sebebi kanser vakalarının daha iyi belirlenebilmesi, genetik olarak kansere daha fazla yatkınlık gösterebilecek yüksek bir nüfusa sahip olmak ve kanser oluşumunu tetikleyecek yaşam tarzı gibi etkenler söz konusu olabilir (Theodoratou vd., 2017). Ölümle ilişkilendirilen kaynaklar arasında önemli bir yer teşkil eden kanser vaka

sayısının 2025 yılında artan yeni vakalarla vaka sayısının 19.3 milyona ulaşması beklenmektedir. Meydana gelebilecek ölümlerin ve vakaların yarısından fazlasının ise orta ve düşük gelirli ülkelerde artarak yaşanması öngörülmektedir (Block vd., 2015) . Kanser vakalarındaki artışla birlikte 2012 yılında yapılan çalışma verileri neticesinde 2035 yılına kadar vaka sayısının ise 24 milyona yükselmesi beklenilmektedir. Kanser gelişmiş bir dünya sorunu olarak kabul edilmekle birlikte aslında tüm kanserlerin % 57'si (melanom dışı cilt kanseri hariç) daha az gelişmiş ülkelerde görülür (Theodoratou vd., 2017).

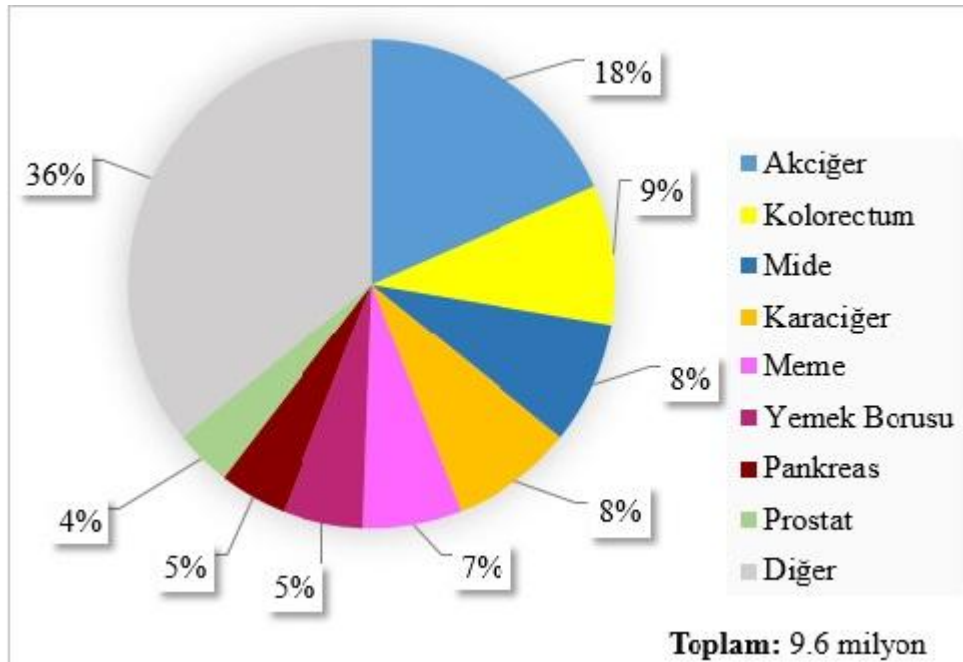
Kanser ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda 2018 için yaklaşık 18.1 milyon yeni kanser vakasının yaşanacağı (melanom dışı cilt kanseri hariç 9.5 milyon) ve 9.6 milyon kanserden ölümün (melanom dışı cilt kanseri hariç 9.5 milyon) gerçekleşeceği tahmini yapılmıştır. Her iki cinsiyeti de içeren bu istatistiksel verilere göre her iki cinsiyette de en çok tanı alan (toplam vakaların % 11.6'sı) ve en çok ölümlle sonuçlanan (toplam kanser ölümlerinin % 18.4) kanser türü akciğer kanseridir. Bunu takiben ölüm oranları en yüksek kanser türleri, kadınlarda görülen meme kanseri (% 11.6), kolon kanseri (% 9.2), mide kanseri (% 8.2), karaciğer kanseri (% 8.2) ve prostat kanseri (% 7.1) olarak sıralanmıştır. Her iki cinsiyet ayrı ayrı incelendiğinde ise erkeklerde en çok tanı alan ve en çok ölümlle sonuçlanana akciğer kanseri iken akciğer kanserini sırasıyla prostat, kolokteral (en sık görülen prostat ve kolorektal), karaciğer ve mide kanseri (ölüm oranları en yüksek olanlar karaciğer ve mide) takip etmektedir. Kadınları baz aldığımızda ise en sık teşhis edilen ve en çok ölümlle sonuçlanan kanser türü meme kanseridir. Meme kanserini takiben kadınlarda sırasıyla en sık görülen kanser türleri kolorektal ve akciğer kanseri olup ölümlle sonuçlanma oranları ise bu durumun tersidir. Hem teşhis hem de ölümlle sonuçlanma sıralamasında rahim ağzı kanseri dördüncü sıradadır (Bray vd., 2018).

Kanser ile ilgili istatistiksel verileri içeren sitelerin tamamındaki oranlar incelendiğinde ülke bazında en sık teşhis edilen kanser çeşitliliğinin maskelendiği görülmektedir. Ülkeler tek tek incelendiğinde en sık teşhis edilen kanserde, özellikle erkekler arasında önemli bir farklılık söz konusudur. GLOBOCAN 2012 verilerinde prostat kanseri 87 ülkede en sık teşhis edilen kanser türü olarak tespit edilmiştir. Özellikle de Kuzey ve Güney Amerika, Kuzey, Batı ve Güney Avrupa ile Okyanusya gibi bölgelerde

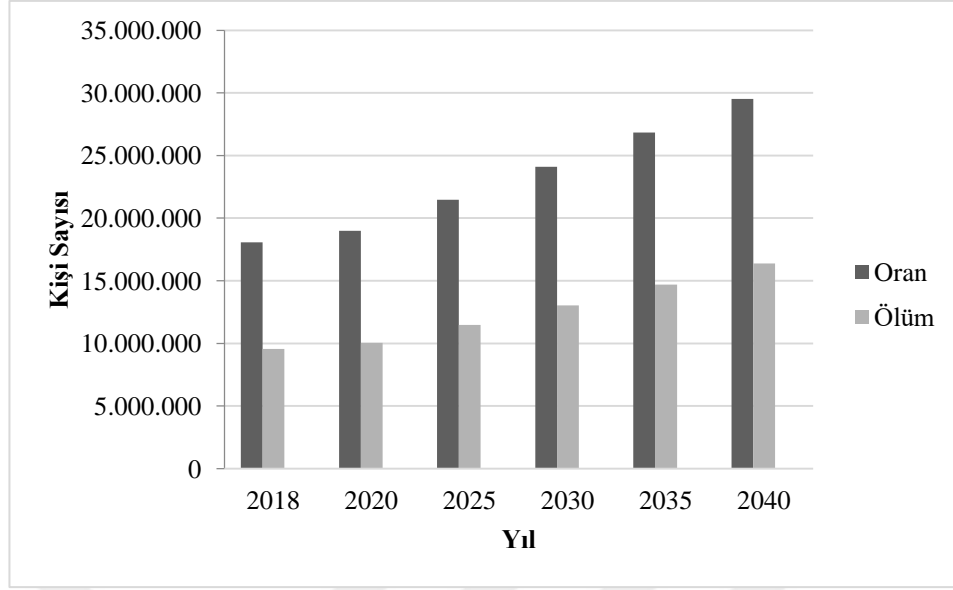
erkeklerde en sık görülen kanser türü prostat kanseridir. Doğu Avrupa’da erkekler arasında en sık teşhis edilen kanser ise akciğer kanseridir. Kuzey Amerika, Avrupa ve Okyanusya bölgelerinde meme kanseri kadınlarda en çok kanser türüdür (Torre vd., 2016).



Şekil 2.1. 2018’de Dünyadaki kanser oranları (Bray vd., 2018)



Şekil 2.2. 2018’de Dünyadaki kanser ölüm oranları (Bray vd., 2018)

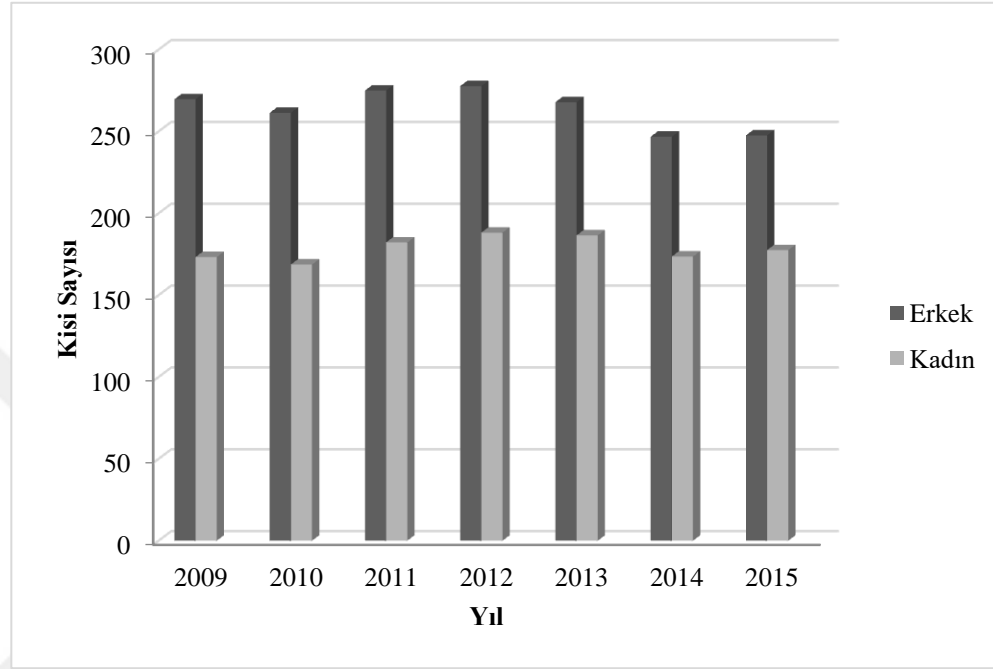


Şekil 2.3. Dünya Sağlık Örgütü 2018-2040 yılları arasında yaşa standardize edilmiş kanser istatistiği (Her iki cinsiyet için) (WHO,2018)

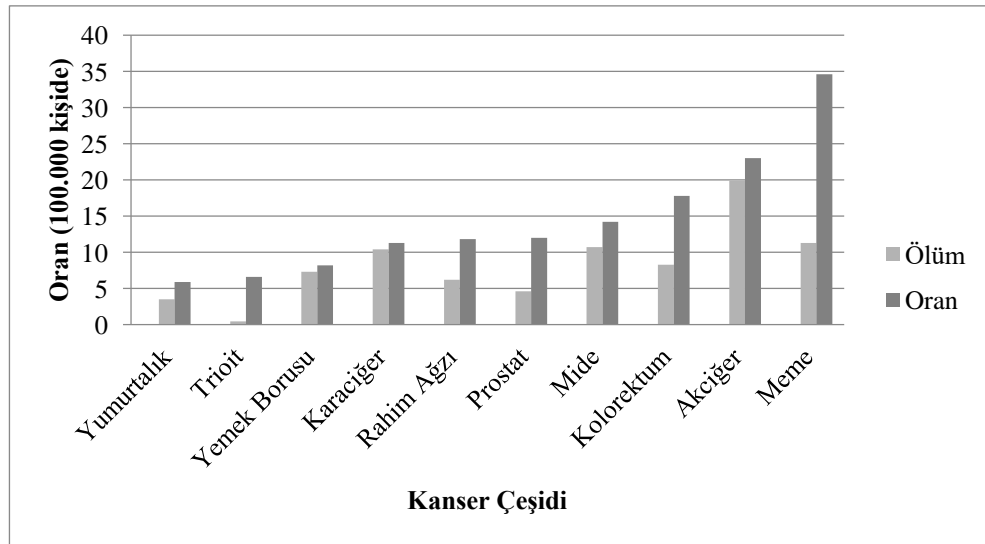
Nüfus artışı, yaşlanma, teknolojik araçlara ve çevresel karsinojenlere maruz kalma oranlarındaki artışla birlikte Dünyada olduğu gibi Türkiye’de de kanser vakalarının artması sonucu kanser önde gelen sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Kanser hastalığının nedenlerinin belirlenmesi ve sonrasında bu tespitler doğrultusunda önlemlerin alınması kanser vakalarında sağ kalım süresini uzatır ve ölüm oranlarında düşüş sağlar (Yasin, 2016). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı verilerine göre 2009, 2010,2011 yılında ülkemizde ve Dünyanın gelişmekte olan ülkelerindeki kanser vakaları oranları arasında benzerlik söz konusudur (Gültekin ve Boztaş, 2014). Ancak kurumun 2012, 2013 kanser istatistik raporlarında Türkiye kanser insidansının, Dünya ortalamasının üzerinde seyrederken, Avrupa Birliği Ülkeleri ve Amerikan gibi gelişmiş ülkelerdeki kanser insidanslarına göre hem kadınlarda hem de erkeklerde daha düşük hızdadır (Özkan ve Keskinlik, 2015). 2014 kanser istatistiklerine göre Türkiye kanser insidansı erkeklerde Dünya kanser insidansının üzerinde seyrederken kadınlarda bu durumun biraz daha düşüktür. Hem kadınlarda hem erkeklerde insidans oranları Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika gibi gelişmiş ülkelerin insidans oranlarından daha düşük hızdadır (Gültekin ve Boztaş, 2014).

Türkiye’de erkekler arasında en fazla trakea, bronş ve akciğer kanseri görülmektedir. Bunları kolon, prostat, mesane, mide kanser gibi kanser türleri takip etmektedir. Kadınlarda ise en fazla meme kanseri görülürken meme kanserinden sonra trakea,

bronş, akciğer ve kolon kanseri sırasıyla en fazla insidansa sahip kanser türleridir. Türkiye’de kanser istatistik verileri hesaplanması sonucunda bir bireyin yaşamı süresince herhangi bir kanser türüne yakalanma oranı % 38.46 iken 65 yaş öncesi bu oran % 17.29 olarak hesaplanmıştır (Yasin, 2016).



Şekil 2.4. Sağlık Bakanlığı yaşa standardize edilmiş 2009-2015 yıllarındaki Türkiye kanser hızı istatistikleri (100.000’de) (İlter ve Keskinlik, 2018)



Şekil 2.5. Dünya Sağlık Örgütü 2018 yaşa standardize edilmiş Türkiye’de en fazla görülen 10 kanser türü (WHO,2018)

2.2. Kanser Hücrelerinin Ortak Özellikleri

Kanser, dünyadaki sekiz ölümden biriyle ilişkilendirilen, bulunduğu dokuyu aşan ve diğer organlara metastaz yapabilen, hücrelerdeki biriken mutasyonlar (özellikle hücre büyümesi ve kontrol mekanizmasında görevli genler) (Stratton vd., 2009) ve çevresel etkiler sonucu DNA’da meydana gelen birikimli değişimler sonucu kontrolsüz büyüme ve çoğalma gösteren birden çok türü barındıran bir hastalık grubudur (Aliustaoğlu, 2009).

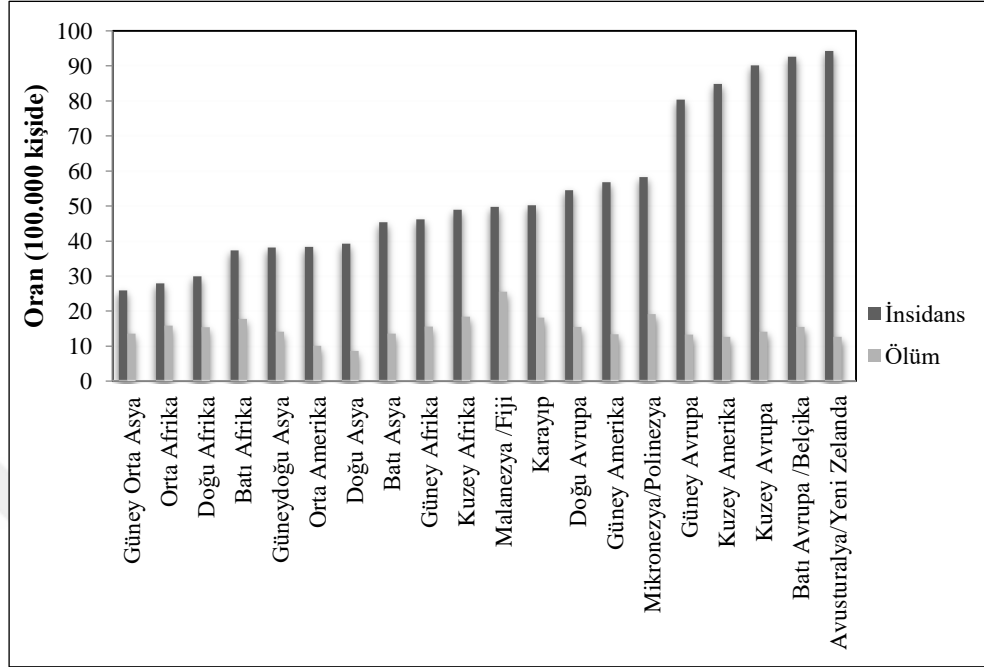
Kanserin gelişimi hücre proliferasyonunda etkili olan onkogen ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyon birikimiyle oluşmaktadır. Kanser araştırmaları neticesinde kanser hücrelerinin ortak altı özellik taşıdığı tespit edilmiştir. Bunlar: Büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, sınırsız çoğalma potansiyeli, programlanmış hücre ölümünden (apoptoz) kurtulma, büyüme engelleyici sinyallere duyarsızlık, sürekli anjiyogenez, lokal invazyon ve metastazdır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.3. Meme Kanseri

2.3.1. Meme kanseri istatistikleri

2008 yılında dünya genelinde yaklaşık 12.7 milyon kanser vakasının yaşandığı ve 7.6 milyon kişinin kanser kaynaklı yaşamını yitirdiği rapor edilmiştir. Kadınlar arasında en fazla tanı ve ölüm oranı olan kanser türü meme kanseri iken erkekler arasında akciğer kanseri ilk sırada yer almaktadır. Aynı yılın verilerinde meme kanserinin toplam 12.7 milyon kanserin vakasının % 23’ünü ve toplam kanser ölümlerinin % 14’ünü oluşturduğu belirtilmiştir (Jemal vd., 2011). 2008 yılında teşhis edilen 1,38 yeni meme kanseri vakalarının % 50 ‘sini ve ölümlerin % 60’ını geliştirmekte olan ülkelerde oluşmuştur. Gelişmiş ülkelerdeki sağ kalım oranları % 80 iken geliştirmekte olan ülkelerde bu oran % 40’ın altına kadar düşmüştür (Akram vd., 2017). Dünya çapında 2012 yılında tanı konulan 14.1 milyon vakanın 7.4 milyonu erkeklerde görülürken geriye kalan 6.7 milyonluk vaka kadınlarda görülmüştür. 2012 yılında yeni vakaların 1.7 milyonunu kadınlarda görülen meme kanseri oluşturmuştur (kullanılan istatistiklerde melanom hariç tutulmuştur) (Theodoratou vd., 2017). Dünya genelinde

2018 yılında 2.1 milyon meme kanseri vakasının yaşanacağı ve bu oranın kadınlarda görülen kanser türlerinin dörtte birini teşkil edeceği belirtilmiştir (Bray vd., 2018) .



Şekil 2.6. 2018 Yılında yaşa standardize edilmiş bölgesel meme kanseri insidansı ve ölüm oranları (Bray vd., 2018)

Türkiye’de kadınlarda en fazla tanı alan ve en fazla ölümlle sonuçlanan kanser türü meme kanseridir. Yapılan çalışmalar neticesinde Türkiye’nin kanser insidansı hesaplanmıştır. Türkiye’de yaşayan bir kadının yaşam boyu herhangi bir kansere yakalanma riski % 33.23, 65 yaşına kadar ise bu oran yaklaşık % 16.84 olarak hesaplanmıştır. Kadınlarda en fazla tanı alan ve ölümlle sonuçlanan meme kanserine yaşam boyunca yakalanma riski % 6.65 ve 65 yaşına kadar meme kanserine yakalanma riski 3,85 olarak hesaplanmıştır (melanom hariç) (Yasin, 2016). Türkiye’de 50-69 yaş aralığında meme kanseri teşhisi alan kadın vakalar, kadınlarda görülen meme kanseri vakalarının toplamının % 44.5’ini oluşturur iken 25-49 yaş aralığındaki kadınlarda bu oran % 40,4’tür. Görülen İnvaziv vakaların % 11,1’ uzak evrededir (Şencan ve Keskinlik, 2017).

Kanserin önlenmesinde birçok bilimsel gelişme yaşanmasını rağmen birçok ülke hastalığın teşhis ve tedavisinde kaynak kısıtlılığından dolayı sıkıntı yaşamaktadır. Dünyadaki düşük ve orta gelirli ülkelerdeki meme kanseri vakalarında düşüşün

sağlanmasında kanserin erken evrelerde tespit edilmesi, yeni görülen vakaların doğru teşhis edilmesi ve uygun seçimler ile yapılacak çok yönlü tedavi yöntemleri bu ülkelerdeki meme kanseri insidansının ve mortalitesinin düşürülmesini sağlayabilir (Anderson vd., 2008)

2.3.2. Meme anatomisi

Her iki cinsiyete var olan meme yağ dokudan oluşur. Bu yağ doku, bir sinir ağı, kan damarları, lenf damarları, lenf düğümleri, lifli bağ dokusu ve bağlardan oluşur. Kadınlardaki meme yapısında biraz daha fazla gladün doku içerir. Meme lobüllerden oluşan ve süt kanalları ile bu yapılara bağlanan 12-20 sayıda olan loblarla bağlantılı bir yapıya sahiptir. Meme vücuttaki hormonal değişikliklere karşı çok hassas bir yapıdadır (Akram vd., 2017). Memedeki lenf damarları lenf düğümleri arasında lenf taşımakla görevlidirler. Fasulye şeklinde olan lenf bezleri, lenfleri filtreleyen, enfeksiyon ve hastalıkta vücudun korunmasında yardımcı olan beyaz kan hücrelerini depolama özelliklerine sahiptir. Lenf nodu grupları koltuk altında, köprücük kemiğinin üstünde ve göğüste bulunur. Duktal karsinom, en sık görülen meme kanseri tipidir. Duktal karsinom kanal hücrelerinde başlar. Lobüler karsinom ise loblarda veya lobüllerde başlayan ve her iki memede diğer kanser tiplerine kıyasla daha fazla görülen meme kanseri tipidir (NCI, 2019).

2.3.3 Meme kanseri risk faktörleri

Meme kanseri önemli bir halk sorunu olarak kalmaya ve vakalarındaki artışın önümüzde yıllarda da devam edeceği belirtilmiştir (Howell vd., 2014). Meme kanserinin oluşumun tetikleyen faktörler iki farklı grupta incelemek mümkündür. Birinci grupta yer alan yaş, cinsiyet, ırk, genetik yatkınlık, genetik mutasyonlar gibi doğuştan gelen doğal faktörlerden oluşmaktadır. İkinci grup ise çevresel faktörlerden oluşan yaşam tarzı, diyet veya uzun süreli tıbbi hormon tedavisinden oluşan dışsal faktörlerden oluşmaktadır. İkinci grupta yer alan faktörlerin etkisi kısmen azaltılarak kanser oranlarının düşürülmesine katkı sağlanabilir (Kaminska vd., 2015). Meme kanserini ailesel/genetik faktörler (aile öyküsü, BRCA1/2 genlerinin taşınma olasılığı,

p53, PTEN veya meme kanseri gelişimini tetikleyen diğer gen mutasyonları) ve meme biyopsi sayısı gibi etmenler tetiklemektedir (Koçak vd., 2011).

Meme kanserinin oluşumunda ailesel faktörler tüm meme kanseri oranlarının küçük bir kısmını oluşturmaktadır. Kalıtsal meme kanseri oluşumunda yüksek duyarlılığa sahip BRCA 1/2 genleri meme kanserin oluşmasını açıklamada % 25'lik bir paya sahip iken diğer yüksek, orta ve düşük duyarlılık genleri % 20'lik bir kısmı oluşturur (Melchor ve Benítez, 2013). BRCA1 ve BRCA2 genlerini taşıyan kadınlarda meme kanseri gelişme riski yüksektir. Bu genlerden BRCA1 geni taşıyıcısı olan kadınlarda yaşam boyu meme kanserine yakalanma riski % 65 ila % 85 iken BRCA2 geni taşıyıcısı kadınlar için bu risk oranları % 45 ila % 85 arasında değişmektedir (Shah vd., 2014).

Meme kanserinin 40-55 yaşlarındaki İngiliz kadınlarında ve bekâr kadınlarda daha fazla görüldüğü ve yaşla birlikte meme kanserinin gelişme riskinin arttığı belirtilmiştir. 50 yaş üzerindeki 1000 kadından 2 tanesinde görülen meme kanseri alt yaş gruplarına göre daha yüksek görüldüğü tespit edilmiştir. Birinci derece akrabalarından birisinde görülen (kız evlat, kız kardeş ve anne) meme kanseri bir bireyin meme kanserine yakalanma riskinin tahmininde önemli bir belirteçtir. Bunların dışında ikinci derece akraba olan büyükanne ve teyzenin de bir bireyin meme kanserine yakalanma riskini belirlemede kullanılabilir. BRCA 1/2 geni taşıyan ve ailesinde meme kanseri öyküsü olan kadınların meme kanserine yakalanma riski diğerlerine oranla 2-4 kat daha fazladır (Akram vd., 2017). Bundan dolayı ailenin genetik bilgilerinin detaylandırılması, sağlıklı bir teşhis, daha iyi tümör gözetimi ve hastanın daha iyi bir tedavi süreci geçirmesinde ve pozitif sonuç alımında etkilidir (Melchor ve Benítez, 2013).

2.3.4. Histopatolojik sınıflandırma

Kanser hastalarında prognoz durumunu belirlemek ve etkili bir kanser tedavisi sağlamak için kanser hastalık grubunun sınıflandırılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Bu sınıflandırma da yaş, aksiller lenf nodu durumu, tümör büyüklüğü, histolojik özellikler, hormon reseptörü durumu ve HER2 durumu göz önünde bulundurularak yapılmıştır (Schnitt, 2010). Meme kanseri bazı türleri yavaş büyüme ve iyi prognozla ilişkilendirilirken bazı türleri agresif özellik gösteren heterojen bir hastalık grubudur. Histopatolojik

sınıflandırma bir tümörün daha kesin olarak seyrinin ve davranışının belirlenmesinde etkilidir (Verma vd., 2012).

Meme kanseri İnvaziv ve İnvaziv olmayan tiplerden oluşmaktadır.

A. İnvaziv Olmayan Meme Kanseri Türleri

Yer aldığı lobül ve kanalların dışına çıkmayan kanser türleridir. In situ karsinomlar İnvaziv olmayan meme kanseri örnekleridir. Süt kanallarındaki atipik hücrelerin gelişmesi sonucu oluşur ve dokuya metastaz yapmazlar (Akram vd., 2017). İnvaziv olmayan meme kanseri, çevredeki dokulara, loblara ve kanallara yayılmayan ve memenin belirli bir bölgesinde kalan yıkıcı etki gösteren türleri içermektedir. Bu türler hastalığın başladığı bölgeye göre sınıflandırılır. Eğer kanser hücreleri loblarda gelişir ise lobüler karsinom in situ, memenin kanallarında gelişen hücrelerden oluşuyorsa duktal karsinom in situ olarak tanımlanır (Hang vd., 2017). Duktal karsinom in situ, bazal membran içerisinde yer alan ve metastaz yapmayan kötü huylu meme duktal epitel hücrelerinin aşırı ifade edilmesi sonucu oluşmaktadır. Mamografi taraması yaygın olarak kullanılmadan önce meme kanseri insidansının % 3-5 lik bir kısmı duktal karsinom in situ türlerden oluşturmaktaydı ve bunların çoğu palpe edilebilir kitlelerdi. Ancak mamografi taramalarındaki artışla birlikte duktal karsinom in situ insidansında artış olduğu belirtilmiştir (Nakhliş ve Morrow, 2003). Lobüler karsinom in situ (LCIS) loblarda gelişen ve meme dokusuna yayılmayan bir özelliكتedir (Akram vd., 2017). Lobüler karsinom in situ meme kanseri, teşhis edilen iyi huylu vakaların % 0.5-1.5'inde ve tüm meme kanseri biyopsilerinin % 1.8-2.5'inde tanımlanmıştır (Wen ve Brogi, 2018). İnvaziv kanser gelişiminde etken değildir ancak bir risk olarak kabul edilir ve tanıdan sonra cerrahi müdahale gerektirmemekle birlikte seri takip edilir (Posner ve Wolmark, 1992).

B. İnvaziv Meme Kanseri Türleri

Meme loblarında veya süt kanallarında gelişen bu kanser türleri anormal hücrelerin gelişmesi sonucunda oluşmaktadır. Bağışıklık sistemi veya dolaşım sistemi aracılığıyla vücudun farklı bölgelerine metastaz yapabilirler. İnvaziv meme kanseri kadınlarda en sık görülen karsinomdur. Metastatik meme kanseri

olarak da tanımlanan invaziv meme kanseri türleri en çok beyin, kemikler, akciğerler ve karaciğere metastaz yapmaktadır (Akram vd., 2017). İnvaziv meme kanseri farklı alt tiplerden oluşmaktadır. Bunlar ;

1. İnvaziv Lobüler Karsinom: Meme süt bezleri olan lobüllerde oluşurlar ve sıklıkla metastaz yaparlar (Akram vd., 2017). İnvaziv lobüler karsinomlar tüm vakaların % 10-15 'ini oluşturan ve invaziv meme kanserleri arasında en çok tanı alan ikinci alt tiptir (Ciriello vd., 2015). Her yaşta kadında görülebilmese rağmen yaşlı kadınlarda daha yaygın olarak görülür (Feng vd., 2018).
2. İnvaziv Duktal Karsinom: Memenin süt kanallarından kaynaklanırlar ve yağ doku ile vücudun diğer kısımlarına metastaz yaparak kanal duvarlarına uzanırlar (Akram vd., 2017). İnvaziv meme kanserlerinin % 80'ini oluştururlar (Feng vd., 2018).
3. Tübüler Karsinom: Hem duktal hem de lobüler bağlantılı invaziv lobüler karsinomun nadir bir türüdür. Meme kanserlerinin % 1'ini oluşturmaktadır (Priya ve Prasaad, 2017). İyi prognoza sahip olan bu alt tipin görüldüğü çoğu hastaya düşük lenf nodu ve nüks oranı ile küçük tümör boyutu teşhisi konur (Chen vd., 2019)
4. Medüller Karsinom: Medüller karsinomlar tüm invaziv meme kanserlerinin % 1'inden daha az bir kısmını oluştururlar ve agresif morfolojik özelliklere sahip olmasına karşın olumlu prognozla ilişkilendirilen invaziv meme kanseri alt türüdür. Sıklıkla BRCA1 mutasyonları ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir.
5. Müsinöz Karsinom: Görülme sıklığı az olan ve kolloid karsinom olarak da bilenen bu kanser alt tipi tüm primer meme karsinomlarının % 2'sini oluşturmaktadır. Teşhiste genellikle elle hissedilirken aynı zamanda görüntüleme de bir anormallik olarak da tespit edilebilen müsinöz karsinomlar yaşlılarda ortaya çıkmaktadır. (Masood, 2016).
6. Papiller Karsinomlar: Nadir görülen invaziv meme kanseri alt tipidir. İnvaziv meme kanserlerinin % 1'lik bir kısmını oluştururlar. Genellikle menapoz sonrası hastaları etkilemektedir ve olumlu prognozludur (Duprez vd., 2012).

2.3.5. Moleküller sınıflandırma

Meme kanseri farklı biyolojik özelliklerinin yanı sıra klinik davranışları, risk faktörleri, tedavilere verdiği cevaplar ve patolojik özellikleri bakımından da farklılıklar gösteren heterojen bir hastalık grubudur (Weigelt vd., 2010). İmmünohistokimya ve gen ekspresyon profillerinin incelenmesine olanak sağlayan tekniklerin kullanılmaya başlanmasıyla kanserin farklı biyolojik alt tiplerinin incelenmesi mümkün hale gelmiştir. Alt türlerin sınıflandırılmasında tedavilere verilen yanıt ve hastalığa özgü sonuçların varyasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Tümör morfolojisi, tümör büyüklüğü, lenf nodu metastazlarının varlığı ve ER, PR ile HER2'nin ifade edilmesi gibi faktörler bireyselleştirilmiş tedavide karar verme sürecinde etkilidirler. Bireysel tedavi sürecinin planlanması, tedavinin olumlu sonuçlanması için hem prognostik hem de öngörücü belirteçlerin anlaşılmasını sağlayan bu faktörler önemli rol oynamaktadırlar (Fragomeni vd., 2018). Meme kanseri ER+ (luminal A, luminal B), HER-2/neu+, bazal benzeri/üçlü negatif, sınıflandırılmamış/normal like alt gruplarından oluşur.

1. Luminal A tümörler: En iyi prognoz ve yavaş büyüme özelliğine sahiptir. Genellikle ER+/PR+ ve HER2- ve düşük Ki-67 ile karakterize edilmektedir. Luminal B'den daha iyi klinik sonuçlar verdiği belirtilmiştir (Yang vd., 2007).
2. Luminal B tümörler: Luminal A'ya göre daha kötü prognoza sahip olan luminal B, meme lümen hücrelerinin, yüksek proliferasyon oranlarına ve düşük PR ile ifade edilen genin orta derecede ekspresyona sahip olduğu belirtilmiştir. Hormon reseptörü pozitif olarak belirlenmiştir. ER+, PR+ ve HER2+ ile karakterize edilmektedir (Masood, 2016). Luminal A ve B tümörlerinin östrojen reseptörleri aracılığıyla düzenlendiği ve endokrin tedaviye cevap verdiği belirtilmiştir (Masood, 2016).
3. Bazal like/üçlü negatif tümörler: Sitokeratin 5/6 (CK5/6) ve CK17 ekspresyonu ile karakterize edildiği ve BRCA1 mutasyonları taşıyan hastalarda yaygın olarak görüldüğü belirtilmiştir. Sitokreatin 5/6 varlığı yüksek dereceli; lenf nodu negatif tümörleri ve P53 ekspresyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bazal benzeri ve HER2'yi eksprese eden grupların her ikisi de ER-/PR'dir. EGFR'ler bu tümör grubu için

moleküller bir belirteçtir. Bazal benzeri meme kanserleri genellikle kötü prognozludur (Foulkes vd., 2003).

4. Normal like: Luminal A'ya benzeyen, ER+, PR-/+, HER2- ve düşük Ki-67 ile karakterize edilen nadir görülen bir alt türdür. İyi bir prognoza sahip olmasına rağmen luminal A ile karşılaştırıldığında daha kötü prognozludur (Feng vd., 2018).
5. HER2 -/neu+: Meme kanseri oluşumunda genetik mutasyonların büyük bir etkisi vardır. Bu genetik mutasyonlar arasında meme kanseri ile ilişkilendirilen BRCA 1/2 genleridir.

Bu genlerin ailesel öyküsü kanser gelişiminde önemli belirteçlerdendir. BRCA1 ve BRCA2 geni taşıyan kadınlarda meme kanseri gelişme riski yüksektir. Diğer etkenlerin meme kanseri gelişimindeki etkileri düşük seviyelerdedir. Bu düşük seviyedeki etkili faktörlerin bir tanesi de ERBB2 (HER2) genin aşırı ekspres edilmesiyle ilişkilendirilmektedir. HER2 hücre bölünmesi, farklılaşma ve apoptoziste görev aldığı, genellikle tümörlerde çoğalma gösterdiği ve kötü prognozlu olduğu belirtilmiştir (Benusiglio vd., 2005).

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2) meme kanseri değerlendirilmesinde önemli bir belirteç olup tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran büyüme faktörü reseptörünü kodlamaktadır. Meme kanseri hastalarında HER2'nin amplifikasyonunun ve yüksek ekspresyonunun prognoz, sitotoksite ve hormonlar üzerinde etki yaratmasından dolayı incelmelerde önemli bir yer edinmiştir (Simon vd., 2001). Meme kanseri alt türü olan invaziv meme kanserlerinin % 20'sinde HER2 gen amplifikasyonu ya da bu gen aracılığıyla oluşturulan protein ürünlerinin aşırı üretilmesi ile ilişkilendirilmektedir (Eliyatkin vd., 2013). HER2'nin aşırı eksprese edilmesinin onkogenik transformasyona, tümörogenez ve metastaz oluşumunu tetikleyen önemli biyolojik etkileri vardır. HER2'nin aşırı eksprese olması meme kanseri kadınlar için kötü prognoz ve kısa sağ kalım belirtisi olarak kabul edilmektedir. Agresif tümörlerin aşırı HER2 ekspresyonuyla bağlantılı olduğu belirtilmiştir (Seidman vd., 2001). Normal bir hücrede yaklaşık 24.000 HER2 proteini ve HER2 geninin iki kopyası mevcut iken kanserleşmiş bir hücrede HER2 kinazın liganattan bağımsız aktivasyonunu hızlandıran 2.400.000 HER2 proteini ve 50 ile 100 tane arasında değişen HER2 geninin

kopyaları bulunabilmektedir (Perez ve Baweja, 2008). Membran yüzeyinde HER2 proteinin overekspresyonu sonucunda dimerizasyon artarak HER-2 tirozin kinaz aktivasyonuna neden olur. Oluşan sinyaller hücre nükluesuna iletilerek hücrenin replikasyonuna ve mitozaya neden olur. Bu durum sonucunda meme kanserine gelişir (Eliyatkin vd., 2013). Yapılan çalışmalar gösteriyor ki HER2 geninin aşırı ekspresyonu meme kanserinin gelişmesinde, hastalığın nüks etmesinde ve genel sağ kalım ile ilişkilidir (Slamon vd., 1987). İmmünohistokimya (IHC), enzim- bağımlı immünoabsorbent deneyi (ELISA), floresan in situ hibridizasyon (FISH), östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve karsinoembriyonik antijen (CEA) yöntemleri HER2 anormalliklerini test etmek için kullanılan yaygın tekniklerdir (Ross ve Fletcher, 1998).

2.3.6. Meme kanseri evreleri

Meme kanserinin evrelere ayrılması TNM sistemi olarak adlandırılan bir kategori basamağına göre yapılmaktadır. Sistemde yer alan T (tümör) tümörün büyüklüğünü ve yerini, N (lenf düğümü) kanserin yayıldığı lenf bezlerinin büyüklüğünü ve yerini, M (metastaz) tümörün vücudun diğer kısımlarına yayılma durumunu ifade eder (NCI, 2019). TNM sistemine göre meme kanseri evreleri;

Evre 0: İnvaziv meme kanseri alt tipleri olan duktal ve lobüler karsinom in situ türleri bu evre için iki örnektir. Bu evredeki vakalarda kanser oluşmaya başlamıştır. Ancak çevre dokulara yayılmamış ve bulunduğu alan ile sınırlıdır.

Evre 1: İnvaziv meme kanserinin gelişmeye başladığı 1. Evre, tümör genişliğinin 2 cm'den daha dar olduğu ve kanserin oluşmasına neden olan hücrelerin meme dışında başka bir yere (lenf bezleri) metastaz yapmadığı evredir.

Evre 2: Alt evreden oluşmaktadır.

Evre 2A: Bu evrede üç durum söz konusudur. Birinci durumda memede tümörün olmadığı ancak koltuk lenf bezlerinde kanserin görülmesi söz konusudur. İkinci durumda ise birinci durumdan farklı olarak meme de 2 cm veya daha küçük tümörün görülmesi ve koltuk altı lenf bezlerine metastazın olmasıdır. Üçüncü durum ise tümör

boyutunun 2 cm'den büyük ve 5 cm'den küçük olması ve birinci durum ile ikinci durumdan farklı olarak da koltuk altı lenf bezlerine yayılmamış olmasıdır.

Evre 2B: Bu evre tümör boyunun 2 cm'den büyük ve 5 cm'den küçük olması ve koltuk altı lenf bezlerine metastaz yapması veya tümör boyunun 5 cm'den büyük olduğu ancak koltuk altı lenf bezlerine metastaz yapmadığı iki durumdan oluşmaktadır.

Evre 3: Üç alt evreden oluşmaktadır.

Evre 3A: Bu evrede üç durum söz konusudur. Memede tümörün olmadığı fakat koltuk altı lenf bezlerinde birbirine veya çevre dokulara yapışık kanserin görüldüğü birinci durum, tümör boyunun 5 cm veya daha küçük olduğu ve çevre dokulara veya birbirine yapışık koltuk altı lenf bezlerine metastazın olduğu ikinci durum ve tümör boyunun 5 cm'den büyük olduğu ve koltuk altı birbirlerine veya çevre dokulara yapışık lenf bezlerine metastazın olduğu üçüncü durumdur.

Evre 3B: Tümör boyutunun belli olmadığı, tümörün deri, göğüs duvarı, kaburgalar veya göğüs duvarındaki kaslara metastaz yaptığı ve memede bulunan lenf nodlarına veya kolun altında yer alan lenf nodlarına da metastaz yapabildiği evredir.

Evre 3C: Ameliyat edilebilir ve ameliyat edilmeyen iki alt kategoriye ayrılmaktadır. Bu evrede tümörün köprücük kemiği altındaki ve komşu boyun boyunca uzanan lenf nodlarına metastaz yaptığı, kolun altında ve meme içerisinde yer alan lenf nodlarına ve memeye komşu olan dokulara da metastaz yapabileceği bir durum mevcuttur.

Evre 4: Bu evrede tümör vücudun diğer uzak bölgelerine metastaz yapmıştır. Bu evrede hastalara uygulanan tedavinin amacı yaşam süresini uzatmak ve yaşam kalitesini artırmaktır (Anadolu Sağlık, 2016).

2.3.7. Tedavi yöntemleri

Tedavide erken tanı yapılacak tedavi seçenek sayısını, tedavide başarı şansını ve hayatta kalma süresini artırır. Geç tanı alan hastalarda 5 yıllık sağ kalım süresinin % 10 olduğu ancak erken tanı alan hastalarda bu oranın % 80'lere kadar çıktığı belirtilmiştir (Parlar

vd., 2005). Meme kanseri tedavi yöntemleri arasında cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, ve terapötik protein, immünoterapi tedavileri uygulanmaktadır (Kurt vd., 2013).

1. Cerrahi tedavi

Meme kanseri olan birçok kadın için cerrahi müdahale birincil tedavi seçeneği olmaya devam etmektedir. Cerrahi müdahale uzak metastaz yapmayan, lokalize kalan hastalarda başvurulan bir meme kanseri tedavi yöntemidir (Akyolcu, 2008). Sentinel lenf nodülü biyopsisi ve meme koruyucu cerrahi erken evre meme kanseri tanısı alan hastalarda standart tedavi olarak kabul edilmektedir (Özmen, 2009). Memem koruyucu cerrahisi (lumpektomi) malign tümörle birlikte memenin büyük bir kısmının korunması ve çevre lenf bezlerinin çıkarılmasıyla yapılan bir uygulamadır. Meme kanserinin ilk evrelerinde yapılan bu uygulama sonrasında ek tedavi olarak radyasyon terapi, kemoterapi ve hormon replasman tedavi ihtiyacı olmaktadır (Akram vd., 2017). Evre I ve II meme kanseri vakaları için meme koruyucu cerrahisi hastalar için standart bir tedavi olarak kabul edilmekte ve bu tedavi sonucunda hastaların sağ kalım süreleri uzamaktadır (Bartelink vd., 2007). Meme kanseri hastalarında meme koruyucu cerrahisinin uygulanması hastanın kaygı ve depresyon seviyesini azaltmaktadır. Bundan dolayı erken evre meme kanseri teşhisi alan kadınlarda bu tedavinin alınması önerilmektedir. Eğer şartlar uygun değil ise meme koruyucu cerrahisi yerine radikal mastektomi yapılabilir. Mastektomi uygulanması kararı almadan önce östrojen, progesteron reseptörleri ve HER-2 reseptörü analizlerinin yapılması iyi bir patolojik değerlendirme için önemlidir (Özmen, 2009). Cerrahi müdahale sonrasında kalan malign hücrelerin yok edilmesi için kemoterapiye ihtiyaç duyulmaktadır (Kamdje vd., 2014).

2. Kemoterapi tedavi

Meme kanseri vakalarında uygulanan kemoterapi tedavisi ilaç kullanarak kanseri oluşturan hücrelerin büyümesini durdurmak için hücrelerin öldürülmesi veya bölünmelerinin durdurulması hedeflenmektedir. Sistemik ve bölgesel kemoterapi olarak tedavi yapılır. Sistemik kemoterapide ilacın ağız yoluyla alınması veya kas ya da damar içine enjekte edilerek kan dolaşımına katılarak vücuttaki kanserli hücreleri etkilemektedir. Bölgesel kemoterapi uygulamasında ise ilaç doğrudan beyin omurilik

sıvısına, bir organ veya karın gibi vücut boşluğuna yerleştirilerek bu bölgelerdeki kanser hücrelerinin etkisiz hale getirilmesi hedeflenmektedir (NCI, 2019).

Hormon reseptörü pozitif olan bazı kadınlarda meme koruyucu cerrahi sonrasında kemoterapi uygulaması önerilmektedir (Cuaron vd., 2016).

3. Radyoterapi tedavi

Radyoterapi tedavisi yüksek enerjili ışınlar kullanılarak sadece kanser hücrelerin öldürülmesine dayanan bir kanser tedavi yöntemidir. Bu yöntemde cerrahi müdahale sonrasında memede kalan kanser hücrelerinin yok edilmesi için başvurulmaktadır (Akram vd., 2017). Radyoterapi meme kanseri tedavisinde önemli bir yer oluşturmaktadır. Erken evre meme kanseri vakalarında radyoterapi uygulaması sonucunda lokal nüks önlenmesi sonucunda hastaların sağ kalım süresinin uzadığı belirtilmiştir (Cuaron vd., 2016). Radyoterapi uygulamasıyla yapılan yardımcı tedavi sonucunda tüm risk gruplarında ilk nüks riskinin yarıya düştüğü ve bölgesel kontrolün uzun süreli sağ kalım üzerinde olumlu etkileri olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (Eccles vd., 2013). Mastektomiye duyulan ihtiyacı azaltmak için başvuru radyoterapi tedavisinin lumpektomi ile kombinasyonun önemi giderek artmaktadır. Meme kanseri olan 143 kadına yapılan meme koruyucu müdahalenin ardından radyoterapi uygulamasından sonrası 54 aylık takip sonucunda tümörün önemli bir lokal kontrolü sağlandığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Akram vd., 2017).

4. Terapötik protein tedavisi

Meme kanseri hücrelerinde görülen gen amplifikasyonu, büyüme reseptörlerindeki aşırı ekspresyon, ve reseptörleri etkileyen mutasyonlar birçok kanser ile ilişkilendirilmektedir. Bu anormallikler sonucunda reseptör kinazlardaki artan sinyalleşme kanser oluşumuna neden olmaktadır. Tümör büyümesini durdurmak için, hücre büyümesinde rol alan yüzey reseptörleri hedef alınmakta ve büyümeyi teşvik eden reseptörler arasındaki sinyalleşme sürecinin durdurulması sonucu hücre sağ kalımının önlenmesi ve apoptoz teşvikinin oluşturulmasıyla terapötik proteinler aracılığıyla kanser tedavilerinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Terapötik sınıf içerisinde yer alan

monoklonal antikorlar kanseri ve diğer hastalıkları hedef almaktadır (Booy vd., 2006). Bu antikorlar arasında kanser tedavisinde kullanılan ve tedavide olumlu sonuçlar veren trastuzumab HER-2'ye bağlanarak HER-2 reseptörünün aktive ettiği sinyal yollarını inhibe ederek hastaların sağ kalım sürelerini uzattığı ve ölüm riskini % 20 azalttığı tespit edilmiştir (Şakalar vd., 2013).

5. İmmünoterapi

Kanser tedavisinde uygulanan cerrahi, radyoterapi, kemoterapi gibi tedavilerin yerine artık daha spesifik olan immünoterapi ve terapötik protein tedavileri daha fazla önem kazanmaktadır. Cerrahi, radyoterapi, kemoterapi tedavileri sonucunda kanserli hücrelerinin tamamen ortadan kaldırılması bazen mümkün olmamaktadır ve bu tedaviler sonucunda sağlıklı hücreler de zarar görebilmektedir. Hastanın kendi bağışıklık hücrelerinin tümörü ve mikro ortamını doğrudan hedefleyebilmesi, toksisitenin ve yan etkilerinin düşük olması immünoterapiyi diğer tedavi seçeneklerine oranla daha avantajlı kılmaktadır. İmmünoterapi uygulamasında kanserli hücrelerin pasifleştirdiği bağışıklık hücreleri aktif hale getirilir. Bağışıklık hücreleri cerrahi müdahalede cerrahların erişemediği alanlara ulaşarak daha iyi tedavi sonuçları sağlamaktadır (Kimiz-Gebologlu vd., 2018).

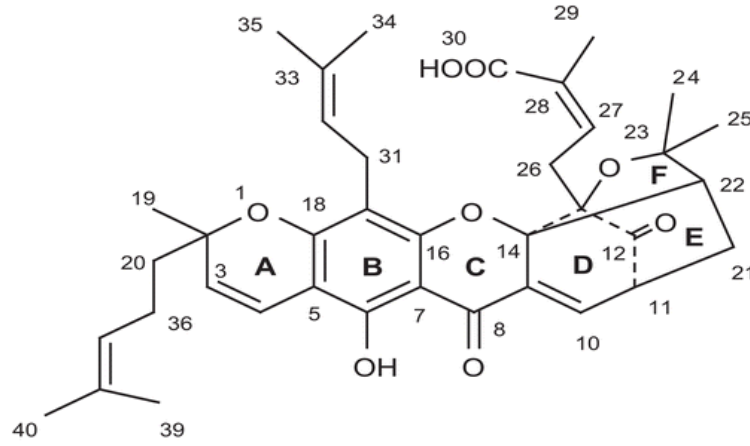
2.4. Trastuzumab

Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesinin bir üyesi olan tirozin aktivitesi olan ve 185 kilo daltonluk zar ötesi glikoprotein HER2 geni tarafından kodlanmaktadır. Meme kanserlerinin % 20 ila % 30'unda HER2'nin aşırı ekspresyonu görülmektedir. HER2'nin aşırı ifade edilmesi onkojenik transformasyona, tümörogeniz ve metastatik oluşuma neden olmaktadır. HER2'nin aşırı ekspresyonu kadınlarda daha kısa sağ kalım, kötü prognoz ve agresif tümörler ile ilişkilendirilmiştir. Birçok klinik çalışmada HER2 hedefli terapötik tedavi sonucunda tümör hücrelerinde büyüme inhibisyonu görülmüştür (Seidman vd., 2001). Tedavisi zor olan metastatik meme kanseri hastalarında HER2'nin hücre dışı alanına yönelik hümanize bir monoklonal olan trastuzumab kullanılmaktadır (Pegram vd., 2004). Trastuzumab (Herceptin) HER2'nin aşırı ifade edildiği tümörleri hedef alan bir anti HER monoklonal antikordur. HER2 molekülerinin birbiriyle veya HER/ErbB ailesinin diğer üyeleri ile dimer oluşturmak üzere fiziksel

olarak devre dışı bırakılması yoluyla normal ErbB sinyal transdüksiyonunun bozulmasını içeren çoklu mekanizmalarla HER-2 sinyalini bloke eder. Trastuzumab uygulanan HER-2 pozitif meme kanserlerinde olumlu sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir (Nemeth vd., 2017). HER-2 pozitif meme kanseri kadınlarda yapılan kemoterapi ile birlikte trastuzumab kullanımında hem cevap oranında hem de sağ kalımında artış olduğu belirtilmiştir. Terapötik ilaç kombinasyonlarında trastuzumab ile birlikte kullanıldığında bazı ilaçların sinerjik etki yaratabileceği yaklaşımından yola çıkarak sisplatin, karboplatin ve docetaksel ile yapılan kombinasyon tedavileri sonucunda trastuzumab ve sitotoksik ilaçlar arasında anlamlı bir terapötik etkileşimin varlığı ispatlanmıştır (Pegram vd., 2004). Kombinasyon tedavilerinde olumlu sonuçlar alınmasına karşın bazı kemoterapi kombinasyonları tedavilerdeki kardiyak bozuklukların sadece kemoterapi alanlarda daha fazla olduğu belirtilmiştir (Seidman vd., 2001). Trastuzumabın yan etkisi olan kardiyotoksitenin metastatik meme kanseri kadınların % 1.4'ünde görüldüğü rapor edilmiştir (Piccart-Gebhart vd., 2005a). Meme kanseri tedavisinde kullanılan trastuzumab'a karşı geliştirilen direnç mekanizmalarının anlaşılması HER-2 kaynaklı meme kanserlerinde daha etkili tedavi şansını artıracaktır. Trastuzumab iki temel etki mekanizması ile tedavi edici özellik göstermektedir. Bu temel etki mekanizma, hücre sinyalleşmesinin engellenmesi ve bağışıklık sistemi aracılı anti tümör yanıtının uyarılmasıdır. HER2'nin çoklu sinyal yollarını tetiklediği bilinmektedir ve bu nedenle HER2 kaynaklı inhibisyonun teorik olarak bu yolların pasifleştirilmesi gerektiği belirtilmektedir. Trastuzumab tedavi uygulanana hücrelerde hücresel yanıt olarak genellikle p27 seviyesinde bir artış eşliğinde olan ve siklin D1 ve siklin bağlı kinaz 2 aktivitesinde azalmaya eşlik eden hücre döngüsünün durmasıdır. İn vitro çalışmalarda yapılan trastuzumab tedavilerinde tek bir ajan olarak kullanılması sonucunda trastuzumab'ın apoptozu indüklediği belirtilmiştir. Kemoterapi ile kombinasyonu sonucunda birçok çalışma trastuzumab'ın sinerjik etkileri olduğu ispatlanmıştır. Bu kombinasyon sonucunda görülen sinerjik etki, normalde hücre sağ kalımını destekleyen PI3K/Akt sinyal yolunun inhibisyonu ile açıklanmaktadır (Mukohara, 2011).

2.5. Gambojik Asit

Halkalı ksanfon türevi olan Gambojik asit molekül formülü $C_{38}H_{44}O_8$ ve molekül ağırlığı 628.75 g/mol olan Güney Asya bölgesinde yetişen *Garcinia hanburyi* bitkisinden saflaştırılan bir bileşiktir. Yüksek sitotoksik etkisi nedeniyle ilaç ve eşsiz renginden dolayı renklendirme amaçlı kullanılan bir bitki reçinesidir (Zhao vd., 2010).



Şekil 2.7. Gambojik asitin kimyasal yapısı (Zhao vd., 2010)

Gambojik asit ile yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda hücre döngüsünü durdurma, apoptozu indükleme, telomeraz inhibisyonu ve anti-anjiyogenez etkiler gösterdiği kanıtlanmıştır (Jia vd., 2015). Gambojik asit uygulanan in vitro çalışmalarda hücre döngüsünün G0/G1 evrelerinde etki gösterdiği tespit edilmiştir. Tümör hücrelerinde apoptozu indüklemek için gambojik asit T lenfositleri aktive etmektedir (Gu vd., 2008). Aynı zamanda hücre proliferasyonu, metastaz ve sağ kalımı ile ilişkili olan STAT3'ü bloke ederek kanserli hücrelerin proliferasyonlarını azaltabildiği kanıtlanmıştır (Jia vd., 2015).

MDA-MB-213 insan meme kanseri hücre hattı enfekte edilen fareler ile in vivo çalışma yapan bir araştırmada farelerde akciğer metastazlarını ve ksenograft tümör büyümesini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Bu belirlenen etkinin apoptoz indüklenmesi ve bu hücre hattında reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimiyle ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Aynı çalışmada belirtilen ikinci görüş ise gambojik asitin kaspaz-3,

kaspaz-8 ve kaspaz-9'un aktivasyonunu ve artan Bax/Bcl-2 oranının indükleyebileceğidir. Gambojik asitin hücreyi apoptoza götüren başka ihtimalide mTOR yolağını bloke ederek inhibe etmesidir (Li vd., 2012). Gambojik asitin yan etkilerini araştıran bir çalışmada kullanılan köpeklerdeki kardiyovasküler ile solunum sistemi ve farelerin merkezi sinir sistemi farmakolojik toksisite testleri incelenmiştir. Çalışmada anti kanser etkisi olan gambojik asitin kan basıncı, kalp atış hızı ve solunum sıklığı üzerinde herhangi bir semptomu neden olmadığı kanıtlanmıştır. Çalışmada sadece yüksek dozda gambojik asit tedavisi sonucunda fare merkezi sinir sistemi üzerinde hafif bir etkisi olduğu belirtilmiştir (Zhao vd., 2010). Sıçanlarda yapılan tedavilerde kullanılan gambojik asitin kronik toksisite test sonuçlarında yüksek dozlarda (120 mg/Kg) uzun süreli tedavi sonucunda böbrek ve karaciğer hasarı tespit edilmiştir. Ancak yapılan periyodik tedaviler ile gambojik asitin tedavide kullanılabilmesi için uygun doz (60 mg/kg) geliştirilmiştir (Jia vd., 2015).

2.6. Enzimler

Organizmalar için hayatın devam edebilmesi in vitro veya in vivo şartlarda gerçekleşebilen elzem bazı kimyasal reaksiyonlara bağlıdır. Bu kimyasal reaksiyonlar koordineli bir şekilde gerçekleşmek zorundadır. Organizmada dokuların kendilerini yenileyebilmesi ve zarar görmüş olanların kendilerini onarması, sindirim, solunum v.b. birçok önemli fizyolojik reaksiyonun olması, bunların devamlılığının sağlanması ve dolayısıyla hayatın devam etmesi bir dizi kimyasal reaksiyonun gerçekleşmesi ile mümkün olabilmektedir. Reaksiyon boyunca meydana gelebilecek herhangi bir eksikliğin oluşması durumunda organizma bu eksikliği en hızlı ve en yüksek seviyede bir verim ile gidermeye çalışır. Eğer hata giderilemeyecek bir durumda ise canlı için ya eksik bir duruma neden olur ya da canlı yaşamının son bulmasıyla sonuçlanır.

Bu tür reaksiyonların gerçekleşebilmesi için ekstrem şartlar gerekir. Örneğin yüksek seviyede bir sıcaklık, enerji, pH, basınç ve bazı reaksiyonların kendiliğinden gerçekleşmesi uzun bir zaman dilimi gerektirir. Bu tür ekstrem şartlar göz önünde bulundurulduğunda organizmaların çoğunluğunun bu şartlar altında yaşaması mümkün değildir. Oysaki canlılığın sürdürülebilmesi için gerekli olan bir kimyasal reaksiyonlar vücut sıcaklığı olarak belirlenen 37-38 °C sıcaklıkta ve nötral pH de

gerçekleşebilmektedir. Bu hayati kimyasal reaksiyonlar biyolojik katalizörler olarak tanımlanan enzimler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Aslında hayatın devamı bir dizi enzim reaksiyonlarının gerçekleşmesi ile mümkün olabilmektedir (Atasağungil, 1965; Geçkil, 2011).

Enzimler, yapılarında net bir değişiklik olmaksızın yavaş ya da algılanamaz reaksiyonların hızını artıran, hiçbir yan ürün oluşturmayan ve ürün verimini yüzde yüz sağlayan biyolojik katalizörlerdir (Chaplin ve Bucke, 1990; Keha, 2015).

Biyokimyanın önemli bir kısmını oluşturan enzimler biyokimya tarihinin baskın bir bölümünü oluşturur. 1700'lerin sonunda ilk olarak midenin salgılarıyla etin sindirimi üzerine yapılan çalışmalarda enzimler keşfedilmiş ve tanımlanmıştır. Daha sonra ki araştırmalar 1800'lerde tükürük ve bazı bitki özütleriyle nişastanın şekere dönüşümü çalışmalarıyla devam ettirildi. Vitalizm görüşünün ortaya çıkmasında rol oynayan Louis Pasteur 1850'lerde, şekerin mayayla alkole fermentlenmesinin "fermentler" tarafından katalizlendiği sonucuna vardı. Pasteur'e göre bu fermentlerin canlı maya hücrelerinin yapılarından ayrılması söz konusu değildi. Eduard Buchner maya özütlerinin şekeri alkole fermentlediğini, bunun da fermantasyonun hücreden uzaklaştırıldığında işlevini kaybetmeyen moleküller tarafından sağlandığını 1897'de keşfetmesi enzimler hakkında yapılan çalışmalara yeni bir yön kazandırmıştır. Eduard Buchner' in iddaa ettiği bu molekülleri Frederic W. Kühne enzimler olarak isimlendirmiştir. Bu çalışmalar ışığında vitalizm görüşü çürütülmüş, biyokimyanın gelişmesini tetikleyecek enzimlerin izolasyonu ve özelliklerinin araştırılması çalışmaları yeni bir boyut kazanmıştır (Cox and Nelson,2005).

Enzimler, canlı organizmalarda biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran biyokatalizörler olarak da bilinir. Hücrelerden çıkarılabilir ve daha sonra in vitro şartlarda önemli birçok işlemi katalize etmek için kullanılabilir. Örneğin, tatlandırıcı ajanların üretiminde ve antibiyotiklerin modifikasyonunda önemli rolleri vardır. Enzimler yıkama tuzlarında ve çeşitli temizlik ürünlerinde kullanılırlar ve klinik, adli ve çevresel uygulamalara sahip analitik cihazlarda ve deneylerde önemli bir rol oynarlar (Robinson, 2015).

Enerji sağlamak için besinlerin yıkılması ve kimyasal yapımın engellenmesi; proteinlere, zarlara bu onarımın bloklanmasının montajı ve genetik bilgiyi kodlayan

DNA ve hücre hareketlerinin devamı için enerji kullanımının tümü, dikkatlice düzenlenen enzim davranışlarıyla mümkündür (Rodwell v.d.2004).

2.7. Antioksidanlar

Antioksidanlar serbest radikal ve diğer reaktif türlere karşı hücreyi korumakla görevli bir savunma sistemi elemanlarıdır. Bu savunma sisteminde yer alan katalaz (CAT), peroksidaz (POD), glutatyon redüktaz (GSSg-Rx), ve süperoksit dismutaz antioksidan savunma sisteminde yer alan antioksidan örnekleridir (Çimen vd., 2005). Serbest radikaller metabolik reaksiyonların gerçekleşmesiyle bitki ve hayvanlarda lipid peroksidasyonu ve DNA'ya verdikleri hasar sonucu ölüme neden olmaktadır. Alzhemier, Parkinson, romatoid artirit, diabetes mellitus gibi hastalıkların oluşumu oksidatif stres ile ilişkilendirilmektedir. Hücrenin tamir mekanizmasını bozdukları için kanser oluşumu ve yaşlanmaya neden olmaktadır (Çaylak, 2011).

Sahip olduğu mekanizmaya göre enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere serbest radikalleri etkisiz hale getiren antioksidanlar iki farklı grupta incelenmektedir. Enzimatik grupta yer alan birincil antioksidanlar ortamdaki serbest radikaller ile kimyasal reaksiyona girerek organizma için tehlikeli hale gelmesini önleyebilen ve yeni serbest radikal oluşumunu durduran bileşiklerdir. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) enzimatik antioksidan grubunda yer alır ve serbest radikalleri etkisiz hale getiren antioksidan örnekleridir. Serbest radikal kaynaklı, DNA, proteinler ve lipitler üzerinde oluşabilecek yan etkileri durdurmaktadırlar. Ayrıca organizmada oluşan serbest radikallerin bir bölgeden başka bir hücre bölgesine geçişini ve oluşturabilecekleri zararlı etkilerini yok ederler (Diplock, 1998).

Enzimatik olmayan grupta yer alan ikincil antioksidanlar C ve E vitamini, ürik asit, bilirubin ve polifenol bileşikleri içerirler. Bu gruptaki antioksidanlar ise oksijen radikalini yakalama ve radikal zincir reaksiyonlarını kırmaktadır (Ou vd., 2002).

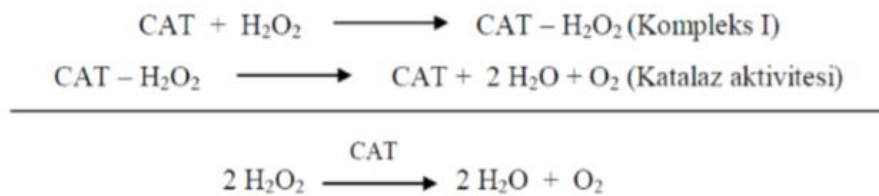
Antioksidanlar kanser oluşumun engellenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Örneğin β -karoten, E vitamini, C vitamini ve selenyum gibi mikro besleyici maddeler kanser oluşumunun azalmasında etkilidirler. Metastatik ve invaziv meme kanseri hücreleri,

proliferasyon ve apoptoz dengesini sağlamak için belirli miktarda oksidatif strese ihtiyaç duymaktadır. Kanserli hücreler yaşamlarına devam edebilmek için sinyal molekülleri olarak görev yapan hidrojen peroksit seviyesini yükseltmeye çalışırlar. Antioksidan savunma sistemi ise hidrojen peroksit seviyesini düşürerek kanser oluşumu engellemektedir (Willcox vd., 2004).

Reaktif oksijen türevlerinin yüksek miktarda hücrede bulunması kanser oluşmasına ve hücrede büyüme için daha fazla sinyal oluşumunu tetiklemektedir. Antioksidan savunma sistemi de reaktif oksijen türlerinin etkileri sonucunda DNA’da meydana gelen mutasyonlar sonucunda oluşan hücre proliferasyonunu düşürmek için konsantrasyonlarını artırır. Yapılan çalışmalarda reaktif oksijen türlerinin artışının hücreye zarar vermesi gibi aşırı antioksidan artışı da kanser oluşumunu tetiklemektedir. Bu nedenle antioksidan savunma sistemi hücrenin iç dengesini sağlamak ve maligniteyi korumak hücre ölümünün indüksiyonuna karşı proliferasyon ve hayata kalma süreçlerini dengeli bir şekilde sürdürmek zorundadır (Skoko vd., 2019).

2.7.1. Katalaz

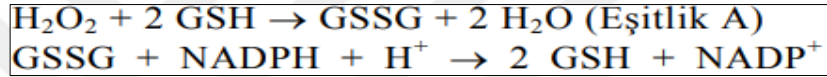
Katalaz enzimi metaloenzimler grubunda yer alan hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüştüren, hücre yaşamını uzatan bir antioksidandır. Reaktif oksijen türlerin (ROS) varlığında hücrenin etkilenmesine neden olan zararlı ürünleri pasifleştirerek hücre ömrünü uzatmaktadır. Aynı zamanda hücre içi ve hücreler arası sinyal iletimini etkileyerek hücre büyümesinde rol almaktadır (Yüzügüllü ve Ögel, 2013). Peroksizomlarda yer alan tetramerik bir proteindir. Hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüştürür. Peroksidi etkisiz hale getirmek için birinci basamak reaksiyonda hidrojen peroksit bileşimini oluşturur iken ikinci basamakta hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüştürerek etkisiz hale getirir. Reaksiyon tepkimesi aşağıda gösterildiği gibidir.



Şekil 2.8. Katalaz enzimi tepkime şeması (Çaylak, 2011).

2.7.2. Glutasyon peroksidaz

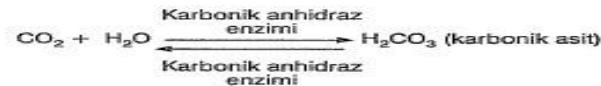
Sitozolda bulunan tetramerik bir enzim olan glutasyon peroksidaz yapısında dört selenyum atomu içeren bir enzimatik antioksidandır. Bu enzim Hidrojen peroksit ile hidroperoksitlerin indirgenmesinde görev alır. Serbest radikallerin fagositik hücrelere zarar vermesini engellemektedir (Stres, 2014). Glutasyon peroksidaz enzimi reaktif oksijen ve azot türevlerini temizleyerek antioksidan savunma sistemine destek olmaktadır. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzimi aynı zamanda apoptozun ve bazı kilit biyolojik işlemlerde sinyal kaskadlarını düzenlemektedir (Li vd., 2014). Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ailesinin sekiz (GSH-Px 1-8) üyesi vardır. GSH-Px 1-4 ve 6 hidrojen peroksidi azaltmak için bir ortak kofaktör olarak selenosistein aktif bölgesi ve glutasyon (GSH) kullanmaktadır (Skoko vd., 2019).



Şekil 2.9. Glutasyon peroksidaz enzimi tepkime şeması (Çaylak, 2011)

2.7.3. Karbonik anhidraz

Vücutun birçok kısmında bulunan bir enzim grubudur. Karbonik anhidraz (CA) 12'si katalitik olarak aktif olan toplam 15 izoformdan oluşmaktadır. pH dengesinde önemli rol oynar. Hücresel dağılım, fizyoloji ve fonksiyon bakımında farklılık gösterirler. Bazı formlarının tümörgeze ve metastaz oluşumunda önemli rolleri vardır. Mekanizmasında üç bölgenin varlığı söz konusudur. Bunlar: çinko bağlayıcı grup, bir bağlanma bölgesi ve bir kuyruktan oluşur. Çinko bağlayıcı bölge CA aktif alanın ortasına ligandı tutturur, ligandı aktif alan kalıntıları ile etkileşimler yoluyla daha da stabilize eder ve kuyruk kısmı izoform benzersiz kalıntılarla etkileşimler yoluyla izoform spesifikliğini artırır (Singh vd.,2018).



Şekil 2.10. Karbonik anhidraz enzimi tepkime şeması

Karbonik anhidraz karbondioksitin hidrasyonu ve bikarbonatın dehidrasyonundan sorumlu olan bir enzim grubudur (Doğanay ve Firat, 2007)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

- -80°C derin dondurucu (Haier)
- -20°C derin dondurucu (Arçelik)
- +4°C buzdolabı (Arçelik)
- Hassas terazi (Shimadzu ATX224)
- Santrifüj (H2050R West Tune, smart R17)
- Su banyosu (Memmert WNB/WNE/WPE/ONE)
- CO₂ inkübatörü (Nüve CO₂ incubator EC 160)
- Mikroskop (Nikon Eclipse Ti-U Inverted)
- Spektrofotometre (Perkin Elmer Lambda35 Uv/VSI)
- ELISA (Epoch Biotek)
- Kabin (Bil-ser lab. Ltd. şti. class II)
- pH (Radiometer PHM210)
- Pompa (Rocker 300)
- Şarjlı otomatik pipet (Isolab)
- Manyetik karıştırıcı (WiseStir, WSH-20A)
- Saf su cihazı Nüve
- Mikropipet (Eppendorf)

3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Dulbeco's Modified Eagle's Medium 500ml (Biological Industries, REF 01-055-1A)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) 500 ml (Biowest,Cat no:L0615-500)
- Fetal Bovine Serum 500ml (Panbiotech, Cat no: P30-3304)
- L-Glutamine Solution 200nM (Biological Industries, REF:03-020-1B)
- Trypsin-EDTA solution %0.25 (Biological Industries, REF: 03-050-1A)
- Penisilin Streptomisin (Biological industries Ref: 03-031-31)
- Aquaguard-1 (Biological Industries, Ref: 01-867-1B)

- Cell Proliferation Kit XTT (Biological Industries, REF:20-300-1000)
- Trypan Blue Solution (Lonza Cat no: 17-942E)
- Trastuzumab (Herceptin, Roche, 150mg)
- Gambogic acid 5 mg (Abcam Lot:GR196920-5)

3.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltilerin Hazırlanması

- **1 M NaOH** hazırlamak için 10g NaOH saf suda çözdürülerek toplam hacim 250 mL oluncaya kadar saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. (Tampon çözeltilerin pH dengesi için kullanıldı).
- **1 M HCl** Tampon çözeltilerin pH dengesi için hazırlanmıştır.
- **103.5 mM KH₂PO₄** hazırlamak için KH₂PO₄'ten 3.5 g tartıldı 200 ml saf suda çözdürüldü ve hazırlanan 1 N NaOH ile pH:7.5 ayarlandıktan sonra toplam hacim 250 ml'ye tamamlanmıştır (Katalaz enzimi aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon)
- **40 mM'lık H₂O₂** hazırlamak için 408 µL % 30'luk H₂O₂ çözeltiden balon jöjeye alınarak toplam hacim 100 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi).
- **5 mM H₂O₂** çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafiği hazırlamak için kullanıldı) hazırlamak için 41 µL H₂O₂ 'den alınarak toplam hacim 100 mL olacak şekilde tamamlanarak hazırlanmıştır.
- **1 mg/ml serum albümin çözeltisi** (BSA) hazırlamak için 25 mg BSA alınarak 25 ml saf suda çözdürülmüştür (protein tayini için kullanılan çözelti).
- **200 mM PMSF** (Sigma, 78830) stok hazırlamak için PMSF'den 0.035g tartıldı ve 1 mL izopropanol'de (2-izopropanol) çözdürülerek hazırlanmıştır.
- **150 mM NaCl** (sigma, 13423) için 2.2 g NaCl tartılıp 250 mL suda çözdürülerek hazırlanmıştır.
- **0.05 M Tris-SO₄** (sigma) hazırlamak için 6.055g Tris-SO₄ alınarak 900 ml saf suda çözdürüldükten sonra 1 N'lik hazırlanan H₂SO₄ (sigma) ile ph:7.4 getirilip toplam hacim saf su ile 1 litreye tamamlanarak hazırlanmıştır (Esteraz aktivitesi için kullanılan tampon)

- ***p*-nitrofenil asetat** (9 mM) hazırlamak için 0.027g *p*-nitrofenil asetat (sigma 24201) 2 ml aseton içinde çözülmüş ve üzeri saf su ile toplam hacim 50 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. (Karbonik anhidraz aktivitesini belirlemede substrat olarak kullanıldı ve günlük hazırlanmıştır).
- **Coomassie brilliant blue G-250** çözeltisi hazırlamak için 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 mL % 95'lik etanolde çözüldü, daha sonra bu çözeltiye %95'lik fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi saf su ile 1 litreye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- **1M Tris-HCl** hazırlamak için 80 ml saf su içerisinde 12.14g Tris çözdürüldükten sonra HCl ile pH.0.8 ayarlanıp toplam hacim 100 mL oluncaya kadar saf ilave edilerek hazırlanmıştır.
- **0.1 mM EDTA** (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) hazırlamak için 0.075g EDTA, 250 mL, 50 mM K₂HPO₄ (pH:7.8) tamponu içerisinde çözümlenerek hazırlanmıştır.
- **0.1 M Na₂HPO₄** (pH:5.5) hazırlamak için 3.55 g Na₂HPO₄ tartılıp 200 mL suda çözdürüldükten sonra pH:5.5 ayarlandı ve toplam hacim 250 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.
- **GSH-Px Tamponu** (pH:7.5 mM fosfat tamponu+5 mM EDTA'lı) (1000mL pH: 7, 50 mM fosfat tamponu + 2.08 g EDTA-Na tuzu)
- **2 µM NADPH** hazırlamak için 0.1 g NADPH tartılıp 5 mL saf suda çözdürülerek hazırlanmıştır.
- **Lizis tamponunu** hazırlamak için 1.514g Tris (sigma, T1503) tartılarak 200 mL ultra saf su içerisinde çözdürüldü. pH: 0.8 getirmek için HCl (sigma, 30721) eklenerek pH dengesi ayarlandı. Çözeltinin içerisine 2.1915g NaCl, 250 µL PMSF stoktan ve 2.5 mL Triton X-100 eklendikten sonra toplam hacim 250 mL oluncaya kadar saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

3.4. Hücre Kültürü

Bu çalışmada kullanılan hücre hatları ATCC' den temin edildi.

3.4.1. Besiyerlerinin hazırlanması ve inkübasyon koşulları

MDA-MB-453 hücre hattı için uygun olan DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyeri içerisine, 10.000 unite/mL penislin ve 10 mg/mL streptomisin, %1 L-glutamin ve %10 Fetal bovine serum (FBS) eklenerek hazırlandı. Çalışmada kullanılan hücre hattı olan MDA-MB4-53 hücre hatları hazırlanan bu besiyerinde, %95 nem, % 5 CO₂ ve 37°C sıcaklıktaki inkübatörde 75 cm² 'lik flasklarda steril şartlarda inkübe edildi. İnkübasyon ortamının nemli kalması için otoklavlanmış saf su içerisine % 1 oranında aquaguard-1 eklenerek inkübatör kabinin içerisindeki kaba doldurularak kabinin nemli kalması sağlandı.

Hücre kültür işlemleri çalışma öncesinde ultraviyole ile steril hale getirilen ve iç yüzeyi % 70'lik etanol ile silinen Laminar kabin içerisinde yapıldı.

3.4.2. Hücre hatlarının pasajlanması

İnkübasyona bırakılan hücrelerin besiyeri 2-3 gün arayla değiştirildi. Besiyeri değişimi yapılırken otomatik pipet yardımıyla flasttaki besiyeri çekildikten sonra flasttaki hücreler steril fosfat tampon solüsyonu (PBS) (75 cm² için 4-6mL) ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından PBS tekrar çekilerek ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin çoğalması için taze DMEM besiyerinden flaska 10 mL eklendi. Bu işlem flasttaki hücreler flastın yüzeyinin % 80-90'nını kaplayıncaya kadar tekrarlandı. MDA-MB-453 hücrelerinin 75 cm² 'lik flastın yüzeyinin % 80-90' lık kısmını kaplama süresi 8-10 gün arasında değişmektedir. Pasajlar ikilenme süresine uygun olarak yapıldı. Işık mikroskopunda incelendiğinde % 80-90 doygunluğa ulaşan hücrelerin pasajlanmasına karar verildi. Pasajlanacak hücrelerin besiyeri önceden steril hale getirilen kabin içerisinde pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Flasttaki hücreler 4 ml PBS ile yıkandıktan sonra PBS ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılması için 8 mL 0.25X Tripsin/EDTA (Biological Industries) solüsyonu ilave edilerek inkübatörde 5-10 dakika bekletildi. İnkübatörde bekletmeden sonra hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı mikroskopta kontrol edildi. Tamamı yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerlerine 32 mL DMEM besiyeri eklenerek tripsinin etkisi nötralize edildi. Daha sonra otomatik pipet yardımıyla flasttaki hücreli besiyeri 50 mL'lik falkon tüpüne aktarılarak 800xg de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra hücrelerin üzerindeki süpernetant

atıldı ve hücre peleti üzerine 12 mL DMEM besiyeri eklenerek otomatik pipet yardımıyla tamamen homojen hale gelinceye kadar süspansiyon pipetaj edildi. Daha sonra hücre yoğunluğuna bağlı olarak 75 cm²'lik flasklara yaklaşık 2 milyon hücre/10mL olacak şekilde tekrar ekildi ve ekilen flaskın içindeki besiyeri 10 mL olacak şekilde besiyeri ile tamamlandı. Yeniden ekimi yapılan hücreler 37°C', % 5 CO₂ ve % 95 nemli inkübatörde inkübe edildi.

3.4.3. Hücrelerin dondurulması

Çalışma için ihtiyaç duyulandan daha fazla pasaj olduğunda hücreler dondurularak daha sonra tekrar kullanılmak üzere stoklandı. Hücre dondurma basamağında flasklar mikroskopta incelenerek hücre yoğunluğunun yaklaşık % 80-90 olduğu flaskların içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler 4 mL PBS ile yıkandıktan sonra PBS ortamdan pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılması için üzerlerine 8 mL 0.25X Tripsin/EDTA solüsyonu ekledikten sonra hücreler 5-10 dakika arasında inkübatörde bekletildi. İnkübatörde bekletilen hücrelerin tamamen yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı mikroskopta kontrol edildikten sonra üzerlerine 32 mL besiyeri eklendi. Otomatik pipet yardımıyla hücreler steril 50 mL'lik falkon tüpüne aktarıldı.

Hücreler 800xg de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj süreci tamamlandıktan sonra süpernetant atıldı. Daha önce hazırlanan ve kabin içerisinde steril 15 mL'lik falkon tüplerde buz içerisinde bekletilen 100µl DMSO ve 900µl FBS içeren hücre dondurma süspansiyonundan 1 mL alınarak hücrelerin üzerine eklendi. Hücrelerin bulunduğu 50 mL'lik falkon tüpünün hücrelerin yapışmış olduğu kısımlardan ayrılması için pipetaj yapılarak falkon yüzeyinden ayrılması sağlandı. Hücrelerin dondurma süspansiyonunda homojen dağılması için pipetaj yapıldıktan sonra süspansiyon 2 mL'lik kriyo tüplere aktarılıp -80 °C' de buzdolabında gerektiğinde tekrar kullanılmak üzere saklandı. Yapılan bütün işlemler ultraviyole ile steril edilmiş ve yüzeyi %70'lik etanol ile silinmiş kabin içerisinde yapıldı.

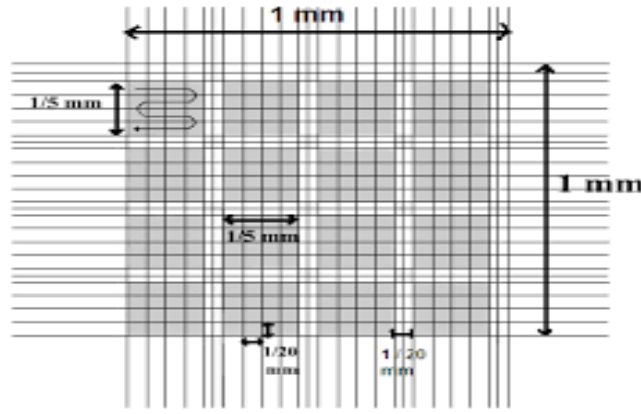
3.4.4. Dondurulan hücrelerin çözündürülmesi

Çalışmamızda hücrelerin kullanılmasına ihtiyaç duyulduğunda stoklanmış hücreler kullanıldı. DMEM besiyeri su banyosunda 37 °C' ye kadar ısıtıldı. Dondurulmuş

hücreler su banyosunda tutularak tamamen çözünmesi için bekletildi. Hücreler falkon tüpüne kabin içerisinde aktarılan 40 mL besiyerine pipet ile aktarıldı. Aktarımdan sonra hücreler 800xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüden sonra hücrelerin üzerindeki süpernetant vakumlu pompa yardımıyla uzaklaştırıldı. Hücre peletine şarjlı pipet ile 10 mL besiyeri eklenerek tam homojenizasyon sağlandıktan sonra T 75'lik flaska aktarıldı. 24 saatlik inkübasyondan sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri tekrar uzaklaştırıldı. Flask yüzeyine yapışmış hücreler 4 mL PBS ile yıkandıktan sonra PBS ortamdan uzaklaştırılıp tekrar 10 mL besiyeri eklenip 37 °C, % 5 CO₂ ve % 95 nemli inkübatörde inkübasyona bırakıldı. T 75'lik flasktaki hücre yoğunluğu % 80-90 oranlarına varıncaya kadar hücreler 2-3 gün arayla yıkanıp besiyerleri değiştirildi.

3.4.5. Hücre sayımı

İnkübe edilen hücreler mikroskopta incelendikten sonra yeteri yoğunluğa ulaşan flasklardaki hücrelerin üzerindeki büyüme besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile yıkandı ve yıkamadan sonra PBS ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin yapıştıkları flask yüzeyinden ayrılması için tripsin-EDTA ile muamele edildi. Yüzeyden ayrılan hücre çözeltilisine besiyeri eklenerek tripsinin etkisi nötralize edildi ve steril falkon tüplere aktarılarak santrifüj edildi. Santrifüj edilen hücrelerin üzerindeki süpernetant otomatik pipet yardımıyla atıldı. Hücre peleti üzerine 1 mL besiyeri eklenerek homojenize edildi. Daha sonra hücre içeren süspansiyondan 10 µl alınarak ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine tripan mavisi solüsyonundan 90 µl eklenerek homojen hale gelmesi pipetaj yapıldı. Homojen hale getirilen hücre süspansiyonundan 20 µl hücre/tripan mavisi karışımdan çekilerek thoma lamına emdirilerek aktarım sağlandı. Şekil 3.1.'de gösterildiği gibi, sayım işlemi thoma lamındaki merkez çizgilerin kesiştiği 1 mm²'lik alandaki 16 karenin içindeki parlayan beyaz renkteki hücreler sayıldı. Sayım thoma lamının iki tarafına da emdirilen süspansiyondaki hücreler sayılıp ortalamaları alınarak yapıldı.



Şekil 3.1. Thoma lamının sayım yapılan yüzeyi alan

Hücre sayımında hücre canlılığını belirlemek için tripan mavisi boyayı dışlama testi uygulandı. Canlı hücre sayısını belirlemek için çok kullanışlı ve basit bir yöntemdir. Bu yöntem canlı ve ölmüş hücreleri birbirinden ayırmamıza yardımcı olmaktadır. Mikroskopta incelendiğinde tripan mavisi boyası membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin içerisine girerek ölmüş hücrelerin koyu mavi renkteki noktalar şeklinde görüntülenmesini sağlamaktadır. Ancak sağlıklı hücreler tripan mavisi boyanın hücre membranından geçişini engellediği için mikroskopta görüntülendiğinde beyaz parlak renkte görüntülendi (ACEA,2012).

3.4.6. Hücre ekimi

CI₅₀ değerini belirlemek için 96 kuyucuklu mikro plakaların bütün kuyucuklarına 200 µl besiyeri içerisinde 5×10^4 tane hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılarak 24 saat inkübe edildi. Çalışmamızda zaman ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etkilerini belirlemek için Trastuzumab ve Gambojik asit konsantrasyonlarının belirlenmesi çalışması yapıldı.

Trastuzumab için 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.125 µg/mL ve 1.5625 µg/mL şeklinde yedi tane konsantrasyon belirlendi.

Gambojik asit için de 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2.5 µg/mL, 1.25 µg/mL, 0.625 µg/mL, 0.3125 µg/mL ve 0.15625 µg/mL olmak üzere yedi tane konsantrasyon belirlendi.

Hücre ekimini takiben yapılan 24 saatlik inkübasyondan sonra vakumlu pompa yardımıyla plakalardaki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonları için dörderli olacak şekilde pozitif kontroller oluşturularak (hücrelere

sadece 200 µL DMEM besiyeri eklendi) en yüksek konsantrasyondan en düşük konsantrasyona doğru plakalar gruplandırıldı.

Trastuzumab ve gambojik asit maddelerinden belirlenen gruplara ayrı ayrı ve kombinasyonları şeklinde hazırlanan dozlardan 12-24-48-72 saatlik sitotoksosite analizleri için 200 µL alınarak hücrelere uygulandı (her deney 3 kez tekrarlandı).

XTT uygulamasından sonra CI_{50} değerleri CompuSyn programı ile belirlendi. CompuSyn programı araştırmak istenilen kimyasal bileşiklerin ve ilaçların tek tek veya kombinasyonlarının sinerjik etki değerlerini hesaplamak için Chou tarafından geliştirilmiş ortalama etki (median effect) prensibine dayanan bir yazılım programıdır.

Program bir çalışmada kullanılan maddelerin sinerjik etki değerlerini medyan etki denklemi ve kombinasyon indeksi denklemlerine göre maddelerin sinerjistik, antagonistik, veya aditif etki gösterip göstermediğini analiz eder.

Tablo 3.1. Kombinasyon çalışmalarında kullanılan maddelerin sinerjistik-aditif-antagonistik sitotoksik etkilerini belirlemede kullanılan Kombinasyon İndeksi (CI) değerleri (Bulut, 2012)

CI (Kombinasyon indeksi)	Kombine sitotoksik etki
0,1 <	Çok kuvvetli sinerjizm
0,1- 0,3	Kuvvetli sinerjizm
0,3-0,7	Sinerjizm
0,7-0,9	Hafif sinerjik etki
0,9-1,1	Aditif etki
>1,1	Antagonist

Trastuzumab ve gambojik asitin sinerjik etkileri için yapılan hesaplama sonucunda en düşük CI_{50} değeri 12,5 µg/mL trastuzumab + 1,25 µg/mL gambojik asit olarak belirlendi. Enzim aktivitesi çalışmasında 24 saat, 48 saat ve 72 saat sonunda enzim aktivite hesaplamalarını bulmak için üç deney grubu oluşturuldu. Belirlenen dozlarda ilaçları tek tek ve kombinasyon şeklinde uygulamak için her bir süre için 1 tane pozitif kontrol ve 3'ü ilaçların uygulanması için oluşturulan gruplardaki petrilere her birinde 18×10^5 tane hücre 10 mL DMEM besiyeri içerisinde ekildi. Ekimden sonra hücrelerin

petrilerin yüzeyine yapışması için 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra belirlenen dozlarda ilaçlar uygulandı (kontrol grupları hariç, kontrol gruplarının sadece besiyerleri yenilendi) ve tekrar hücreler inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra ilk gruba hücre parçalama protokolü uygulandı ve hücreler -24 °C’de enzim aktivitelere bakmak için stoklandı. 48. ve 72. saat için de aynı protokol uygulandıktan sonra tüm grupların enzim aktivite tayinleri yapıldı.

3.4.7. Hücre parçalama

İlaç uygulanan petrileredeki hücrelerin süpernetantı falkon tüplere aktarıldı. Petrilere +4 °C bekletilen PBS eklenerek hücreler özel aparat yardımı ile yüzeyden kazınarak mikro pipet ile falkon tüplere aktarıldı. Petrilere mikroskopta incelendikten sonra ikinci kez PBS ile yıkanarak tekrar falkon tüplere eklendi. Falkon tüpler 800xg’de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra falkonlardaki süpernetant pompa yardımıyla uzaklaştırıldı. Hücre peleti üzerine 1 mL PBS eklenerek falkon tüplerden alınarak ependorf tüplere aktarıldı. Hücreler +4 °C ve 2000xg’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernetant atıldı ve hücreler 5 dakika boyunca buz içerisinde bekletildi. Hücrelerin üzerine lizis tamponu (150 mM NaCl, % 1 Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH: 8.0, 0.2 mM PMSF) eklendi. Homojenat haldeki süspansiyon içerisindeki hücreler 21 Gx’lik enjektör yardımıyla parçalandı. Parçalamadan sonra hücreler +4 °C ve 2000xg’de 10 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra -24 °C’de enzim aktivitesine bakmak için stoklandı.

3.4.8. Uygulanacak ilaçların hazırlanması

Trastuzumab (Herceptin; Roche, Basel, İsviçre) toz halinde temin edildi. Trastuzumab DMEM besiyerinde belirlenen konsantrasyonlarda çalışma öncesinde steril kabin içerisinde steril tüplerde çözdürülüp vorteks ile tam homojenizasyon sağlandıktan sonra hücre hattına uygulandı.

Gambojik asit (Abcam, USA) 5 mg olarak toz halde temin edildi ve steril kabin içerisinde 5 mL DMSO’da çözdürülüp ana stok oluşturuldu. Çalışma planına göre belirlenen çalışma konsantrasyonuna uygun derişimde çözeltileri oluşturmak için ana stoktan uygun miktarda çözelti alınarak uygulama yapıldı.

3.5. Protein Tayini

3.5.1. Bradford yöntemi ile protein tayini

Yöntem, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması sonucunda oluşturduğu renkli çözeltilerin 595 nm’de absorbansının ölçülmesine dayanır. Sığır serum albumini (BSA) standartları hazırlanır, 595 nm’de absorbansları ölçülüp bir standart grafiği çizilir. 0,1 g Bradford reaktifi, % 95’lik 50 mL etil alkol, %85’lik 100 mL fosforik asit çözeltileri karıştırılarak toplam hacim 1000 mL’ye tamamlanır. Çözelti bir gece boyunca karanlıkta bekletildikten sonra filtre kağıtından süzülür. Deney tüplerine analizi yapılacak örneklerden 100 µL örnek konulur. Tüpün üzerine hazırlanan Bradford çözeltisinden 5 mL eklenerek 5 dakika inkübasyonda bırakılır. Bu sürenin sonunda 595 nm’de absorbanslar okunur. Okunan absorbanslar standart grafiğinden elde edilen denklemde yerine yazılarak konsantrasyon cinsinden ne kadar protein olduğu belirlenir (Sedmak ve Sidney, 1977).

3.5.2. Katalaz enzimi aktivite tayini

Çalışmamızda katalaz aktivite tayinin için Aebi metodu kullanılmıştır. CAT enzimi hidrojen peroksit katalizler. Substrat olarak hidrojen peroksik kullanıldı. H₂O₂ ‘nin CAT enzimi tarafından yıkım hızı, H₂O₂ 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanarak spektrofotometrik olarak ölçülmesi sonucu tayin edilmektedir. (Aebi, 1974).

$k = (2,3/30) \times (\log A1/A2) \times \text{Dilüsyon}$ (Dokuda CAT aktivitesi k/g protein olarak hesaplanmıştır).

Tablo 3.2. Katalaz enziminin aktivite tayini için kullanılan çözeltiler ve miktarları

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
Tampon	1500	1475
Substrat	1500	1500
Örnek	-	25
Toplam hacim	3000	3000

3.5.3. Glutasyon peroksidaz enzimi aktivite tayini

GSH-Px aktivitesi, glutasyon redüktaz (GR) aktivitesine bağılı olarak ölçüldü. Tepkimede GSH-Px; hidrojen peroksit varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutasyona yükseltgenmesini katalizlemektedir. GSH-Px'in oluşturduğu okside glutasyon (GSSG) H₂O₂ (hidrojen peroksik) varlığında GR (glutasyon redüktaz) ve NADPH yardımı ile GSHA indirgenir. Glutasyon peroksidaz aktivitesi NADPH'ın NADP⁺'ya yükseltgenmesi sırasında absorbans azalmasının 340 nm'de 3 dakika boyunca köre okunması ile tayin edildi. Tayin formülü aşağıda belirtildi (Paglia ve Valentine, 1967).

$$U/L (\mu M/min/L) = \frac{\Delta A/t \times V_t \times 10^6}{\epsilon \times V_s \times L}$$

ϵ =NADPH' ekstinksiyon sabiti (6.22x10³ L.mol⁻¹.cm⁻¹)

V_t=Total reaksiyon hacmi (mL)

V_s= Total reaksiyon içindeki örnek hacmi (mL)

L=Küvet çapı (1 cm)

$\Delta A/t$ = Dakikadaki absorbans değişimi

10⁶= Molü μM 'e çevirmek için kullanılan faktör

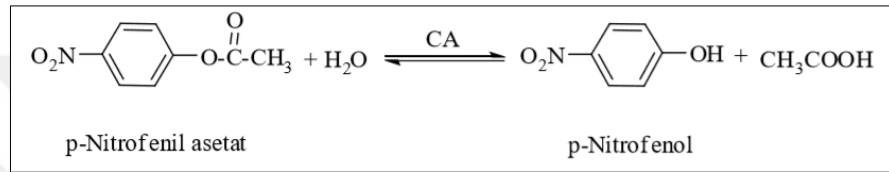
$$\text{GSH - Px Spesifik Aktivitesi (U/g protein)} = \frac{\text{GSH - Px (U/L)}}{\text{Protein (g/L)}}$$

Tablo 3.3. Glutasyon peroksidaz enziminin aktivite tayini için kullanılan çözeltiler ve miktarları

Çözeltiler	Kör (μL)	Örnek (μL)
Tampon	100	100
Glutasyon	20	20
Glutasyon Redüktaz	100	100
NADPH	100	100
Örnek	-	10
Ultra saf su	670	660
H ₂ O ₂	10	10
Toplam hacim	1000	1000

3.5.4. Karbonik anhidraz aktivite tayini

Karbonik anhidraz enzimin aktivite değeri hesaplamaları esteraz aktivite yöntemi ile hesaplandı. Esteraz aktivite yöntemi karbonik anhidraz enziminin substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatı (PNF) 348 nm’de absorpsiyon veren *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolat’a hidroliz etmesi esasına dayanır. 348 nm’de hem *p*-nitrofenol hem de *p*-nitrofenolat aynı absorpsiyon değeri göstermektedir. Fenol grubunda yer alan proton (H⁺) iyonunun ayrışmamasının ölçümü etkilemediği belirtilmiştir. Karbonik anhidrazın reaksiyon denklemi aşağıdaki gösterildiği gibidir.



Şekil 3.2. Karbonik anhidrazın *p*-nitrofenilasetatın *p*-nitrofenole dönüşümünü sağlayan enzimatik reaksiyonu

Deney çalışmasında CA enzim aktivitesi ölçümü için 1 mL’lik kuvartz küvetlere kör için pH: 7.4’te ayarlanan Tris-SO₄ ‘den 400 µL, substrat olarak hazırlanan PNF’den 360 µL ve saf sudan 220 µL eklenerek toplam hacim 1 mL tamamlanarak hazırlanmıştır. Örnek küvetine ise Tris-SO₄ ‘ten 400 µL, PNF’den 360 µL, 220 µL saf su ve 20 µL enzim çözeltisi ilave edilerek toplam hacim 1 mL olacak şekilde hazırlandı. 3 dakika boyunca her 1 dakikada absorpsiyon ölçümü 25°C’de 348 nm’de okunarak farkları alındı. Okumadan önce spektrofotometrenin absorpsiyon değerinin sıfıra ayarlanması için enzim yerine saf su kullanarak hazırlanan çözelti 3 dakika boyunca cihazda okutuldu. Deney çalışması tablo şeklinde aşağıda gösterilmiştir (Verpoorte vd., 1967).

Tablo 3.4. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi tayini için kullanılan çözeltiler ve miktarları

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
Tris-SO ₄ tamponu	400	400
PNF	360	360
Saf su	240	220
Enzim çözeltisi	-	20
Toplam hacim	1000	1000

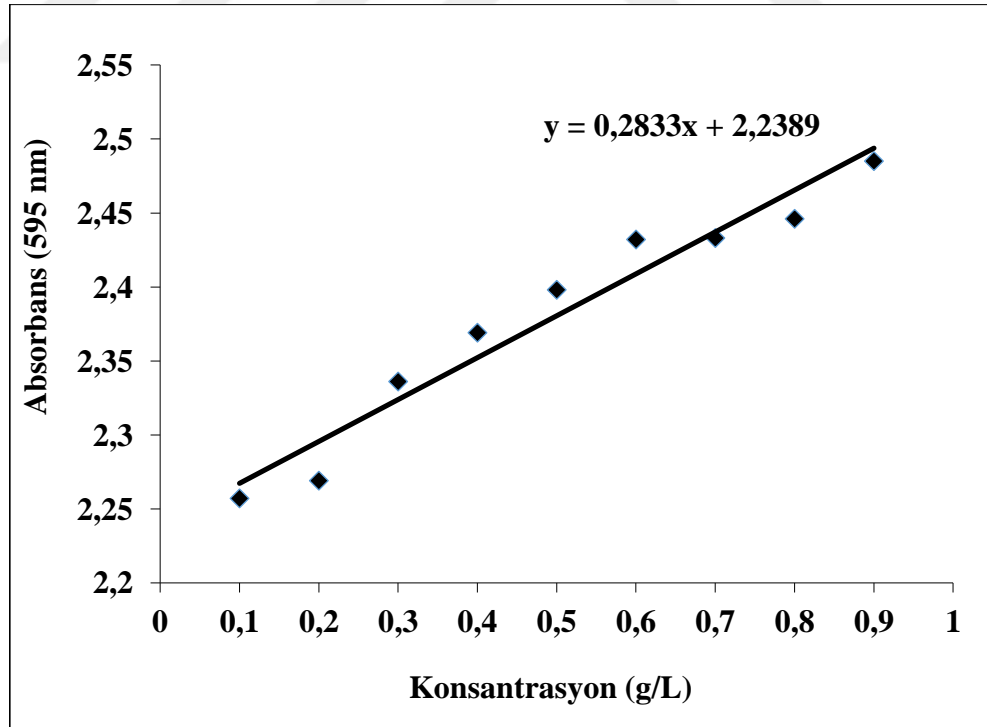
Aktivite hesaplaması aşağıda gösterilen formül ile yapılmıştır.

$$\text{Ünite/ml enzim} = (\Delta OD \times V_f \times D_f) / (\epsilon_{348nm} \times t \times V_e)$$

OD: Optik yoğunluk, $\Delta OD = OD_{348nm} \text{ Örnek} - OD_{348nm} \text{ Kör}$, V_f = Tüpte hazırlanan toplam hacim (1mL), D_f =Dilüsyon faktörü, ϵ_{348nm} =*p*-nitrofenolün 348 nm'deki milimolar ekstinksiyon katsayısı (pH: 7.49, t = Reaksiyon süresini (3 dakika), b =Küvetin ışık geçiş yolu (1cm), V_e = Küvette okutulan reaksiyon karışımındaki enzim hacmini ifade etmektedir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

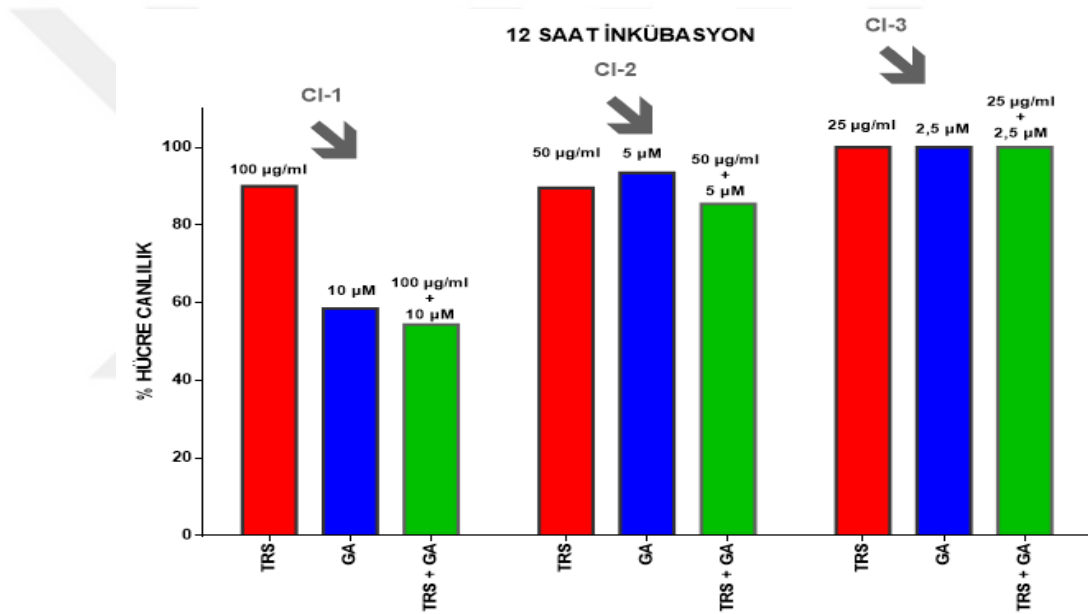
MDA-MB-453 hücre hattında gambojik asit ve trastuzumab'ın bazı enzimler üzerine sinerjik etkilerini belirlemek için XTT yöntemi kullanılmıştır. XTT yönteminde plakalara her bir kuyucukta 200 µL DMEM besiyerinde 5×10^4 tane hücre ekimi yapılarak trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonu şeklinde uygulanmasının zamana ve doza bağlı sitotoksik etki değerleri ELISA'da okutularak elde edilmiştir. Elde edilen ELISA sonuçlarının CompuSyn.exe programı yardımıyla sinerjik etki değerleri hesaplandı. Sinerjik değerlerin hesaplanmasından sonra belirlenen dozda maddeler MDA-MB-453 hücre hattının petrilere 10 mL'de 18×10^4 tane hücre olacak şekilde ekiminden sonra tek tek ve kombinasyon şeklinde uygulanarak 24 saat, 48 saat ve 72 saat sonrasında hücreler hücre parçalama protokolü uygulanarak enzim aktivite tayinleri için stoklandı. Katalaz enziminin, glutatyon peroksidaz enziminin ve karbonik anhidraz enzimin aktivite tayinleri için seçilen uygun yöntemler ile belirlendi. Yapılan hesaplama bulguları aşağıda ayrıntılı analizler ile detaylandırıldı.



Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile total protein tayini standart grafiği

4.1.Sinerjik Etki Değerleri

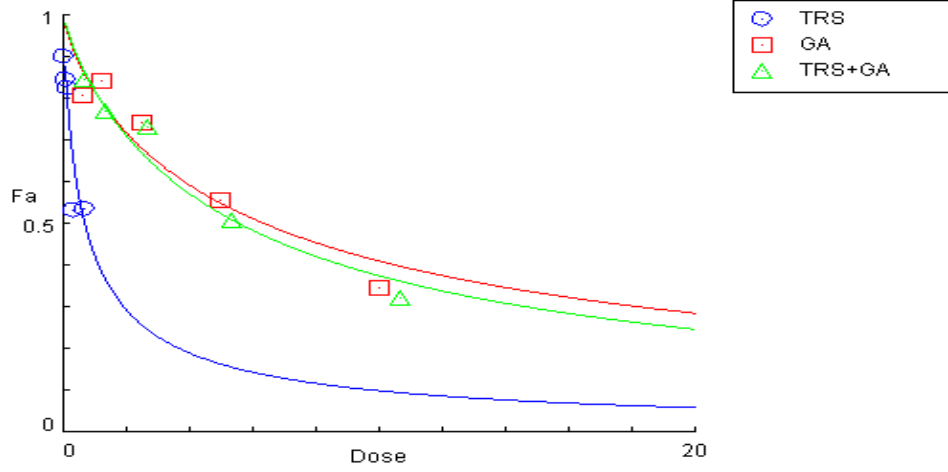
Trastuzumab MDA-MB-453 hücreleri 96 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 5×10^4 hücre olacak şekilde ekildi. Trastuzumab yedi farklı konsantrasyonunun (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.15625 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 24.saat, 48.saat, 72.saatlerdeki sitotoksitenin spektrofotometrik yöntemle belirlenebilmesi için üç ayrı deney oluşturacak şekilde deney planlaması yapıldı. Aynı işlemler gambojik asit içinde yapıldı (Gambojik asitin konsantrasyonları 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.3125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.15625 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Her deney grubunda sadece besiyeri ile hücrelerin olduğu kontrol grubu oluşturuldu. Deneyler 3 tekrarlı yapıldı.



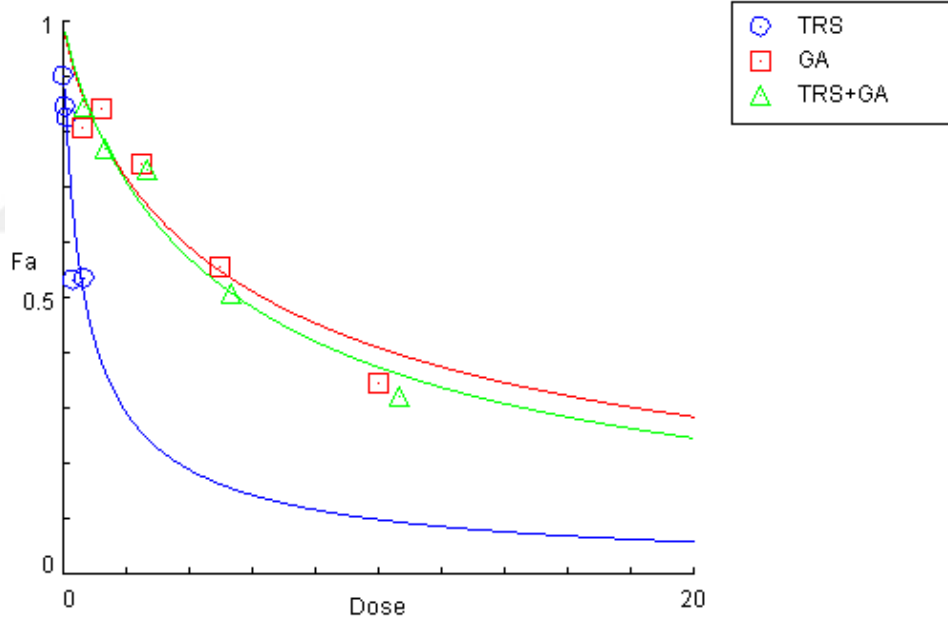
Şekil 4.2. 12. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen % canlılık oranları

Tablo 4.1. 12.saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında okunan CI değerleri

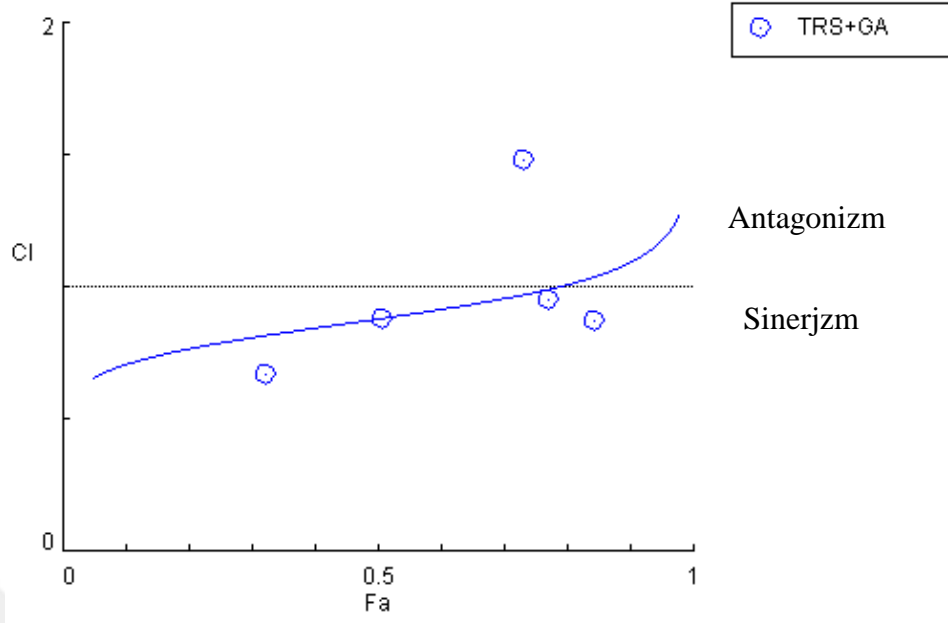
	CI	Yorumlama
CI-1	0,6723	CI<1 “sinerjistik”
CI-2	0,8795	CI=1 “aditif”
CI-3	1,4821	CI>1 “antagonistik”



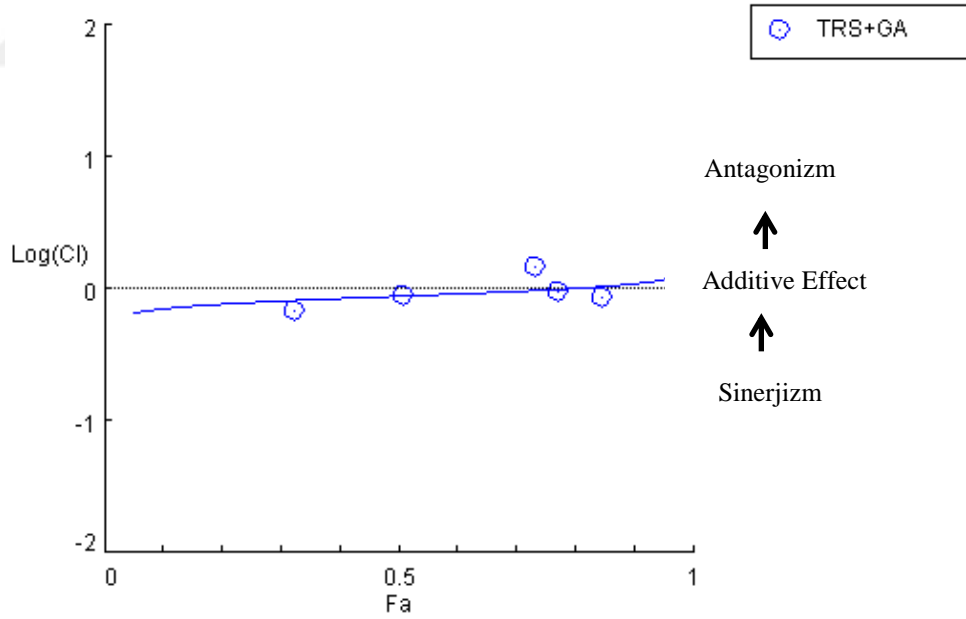
Şekil 4.3. 12. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen doz-effect curve eğrisi



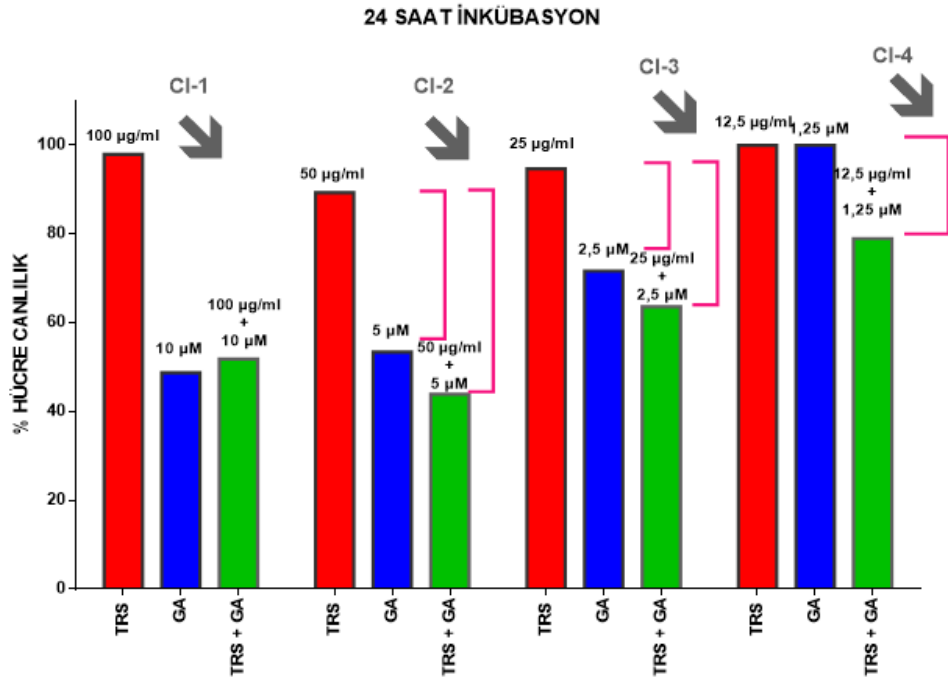
Şekil 4.4. 12. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen median-effect plot eğrisi



Şekil 4.5. 12. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Combination Index plot eğrisi



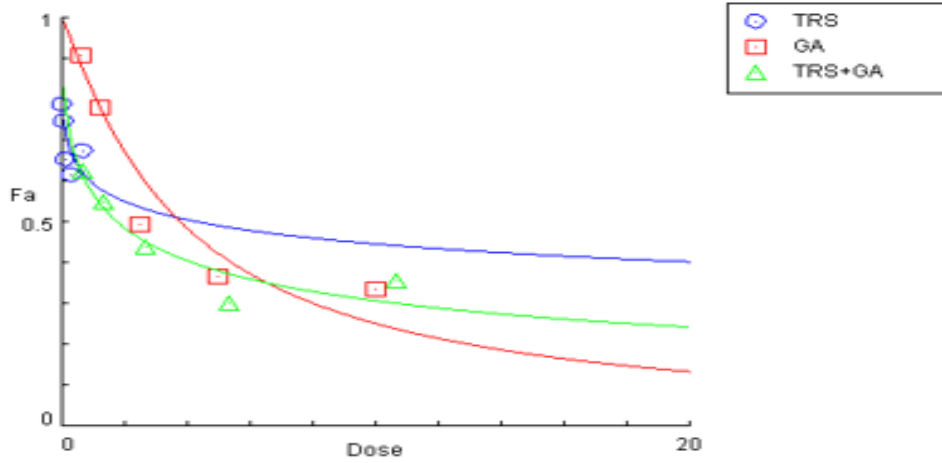
Şekil 4.6. 12. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Logarithmic Combination Index plot eğrisi



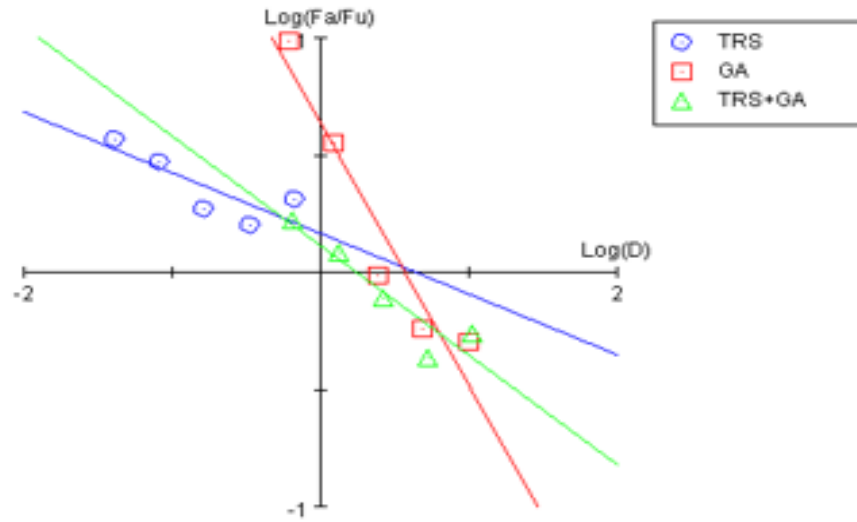
Şekil 4.7. 24. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen % canlılık oranları

Tablo 4.2. 24. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında okunan CI değerleri

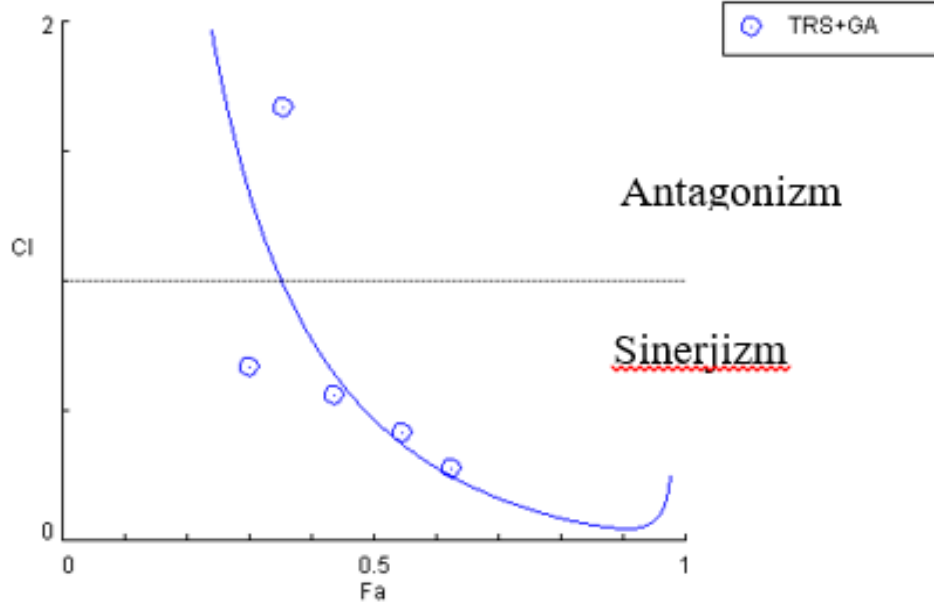
	CI	Yorumlama
CI-1	1,6672	CI>1 “antagonistik”
CI-2	0,3677	CI<1 “sinerjistik”
CI-3	0,4932	CI<1 “sinerjistik”
CI-4	0,7825	CI<1 “sinerjistik”



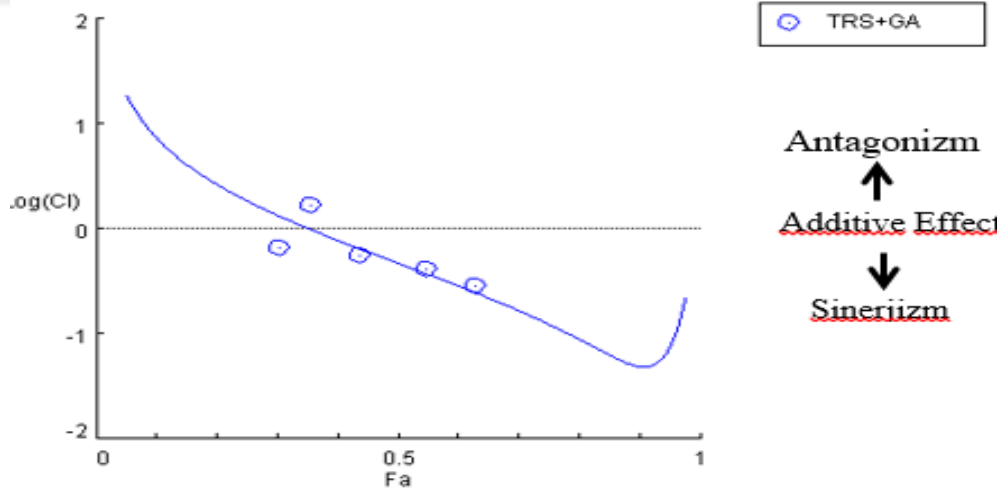
Şekil 4.8. 24. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen doz-effect curve eğrisi



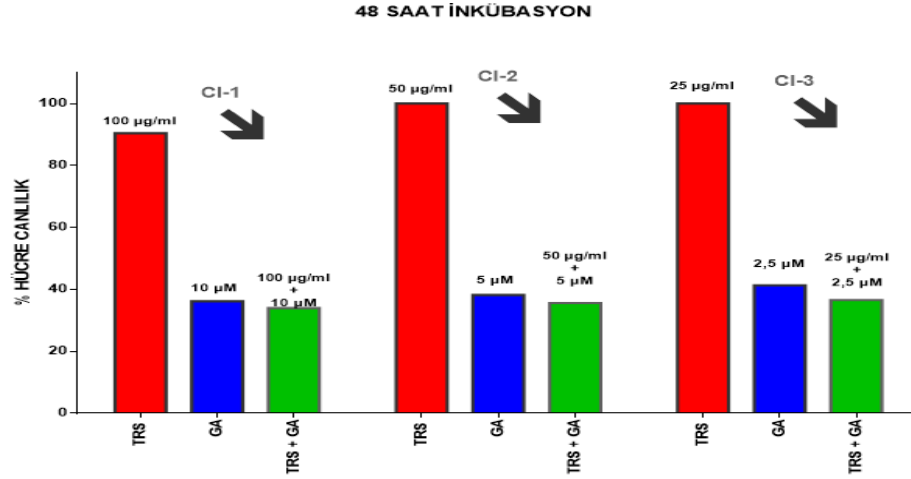
Şekil 4.9. 24. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen median-effect Plot eğrisi



Şekil 4.10. 24. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Combination Index Plot eğrisi



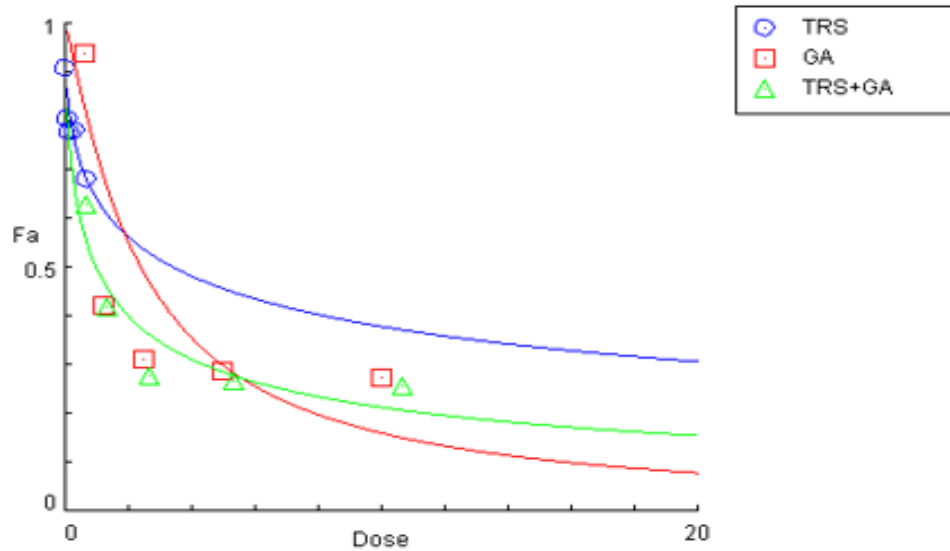
Şekil 4.11. 24. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Logarithmic Combination Index Plot eğrisi



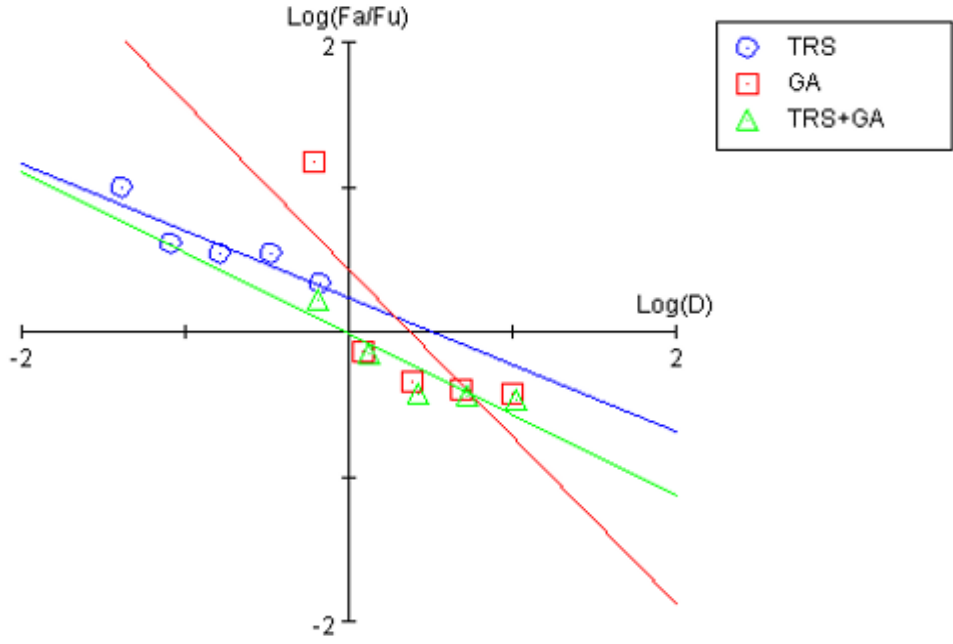
Şekil 4.12. 48. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen % canlılık oranları

Tablo 4.3. 48. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında okunan CI değerleri

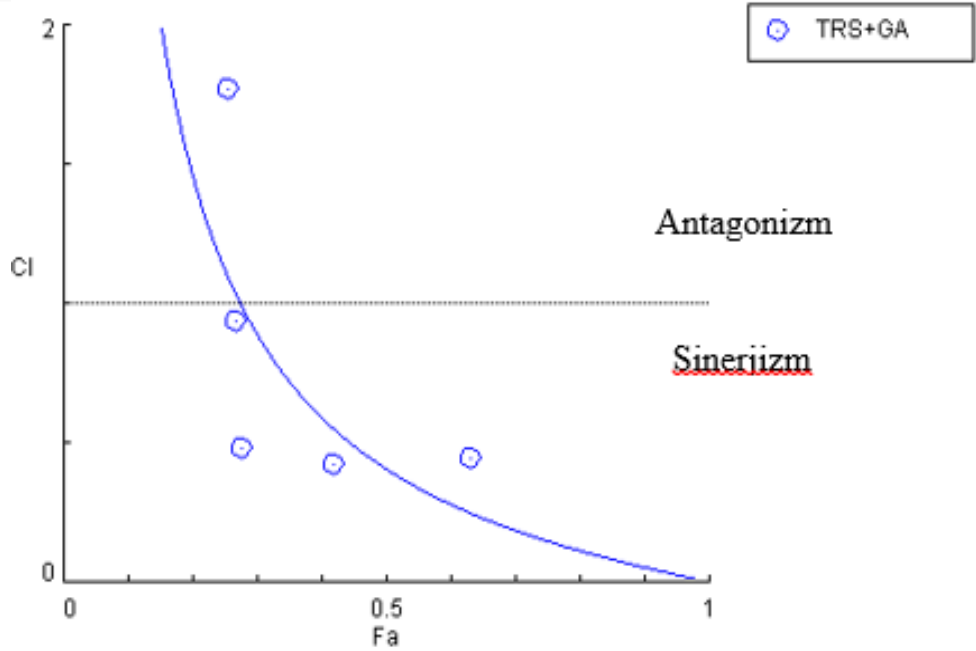
	CI	Yorumlama
CI-1	1,7724	CI>1 “antagonistik”
CI-2	0,9371	CI<1 “sinerjistik”
CI-3	0,4842	CI<1 “sinerjistik”



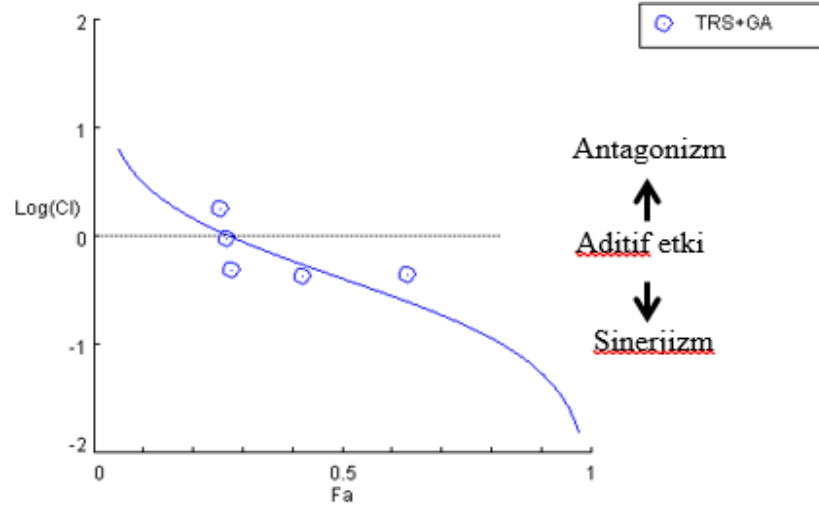
Şekil 4.13. 48. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Dose effect curve eğrisi



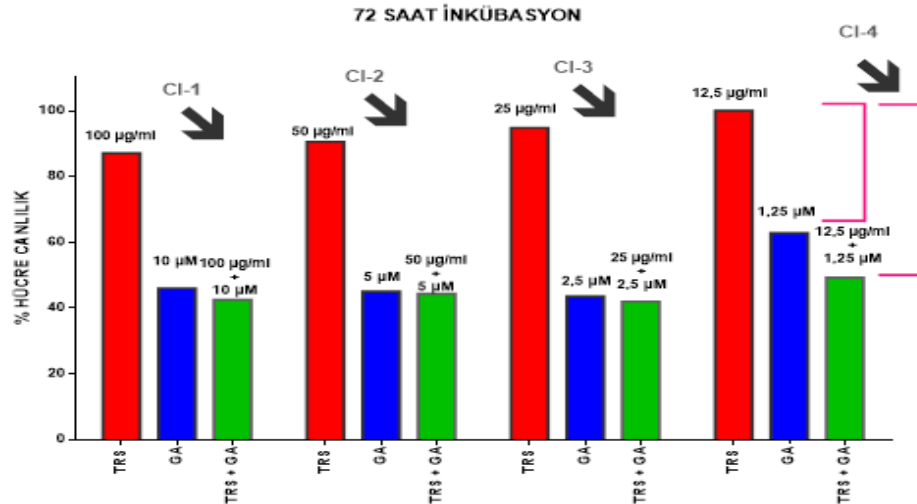
Şekil 4.14. 48. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen median-effect plot eğrisi



Şekil 4.15. 48. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Combination Index Plot eğrisi



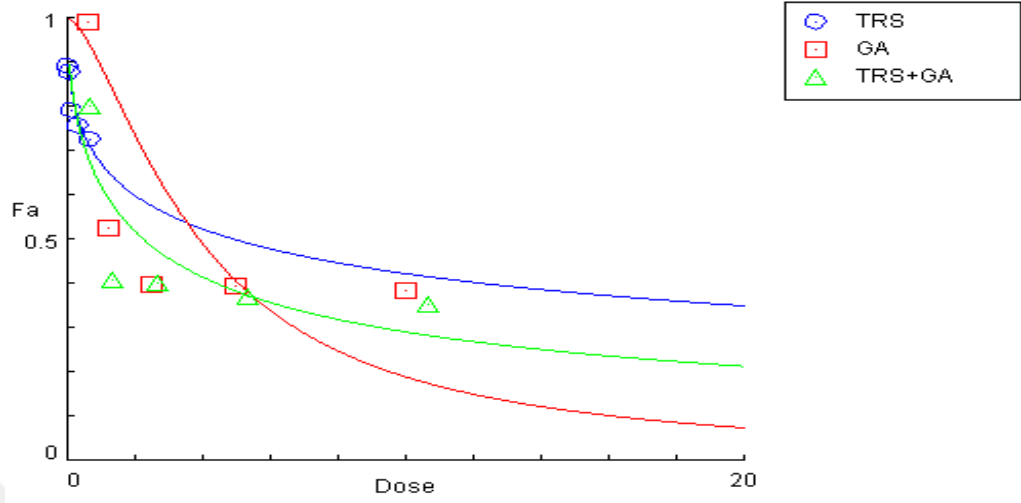
Şekil 4.16. 48. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Logarithmic Combination Index Plot eğrisi



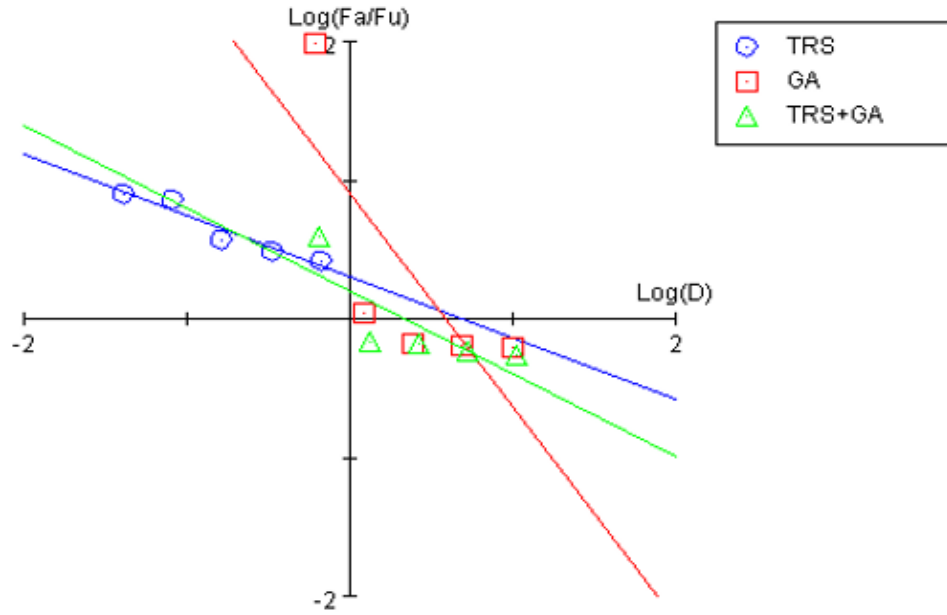
Şekil 4.17. 72. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen % canlılık oranları

Tablo 4.4. 72. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında okunan CI değerleri

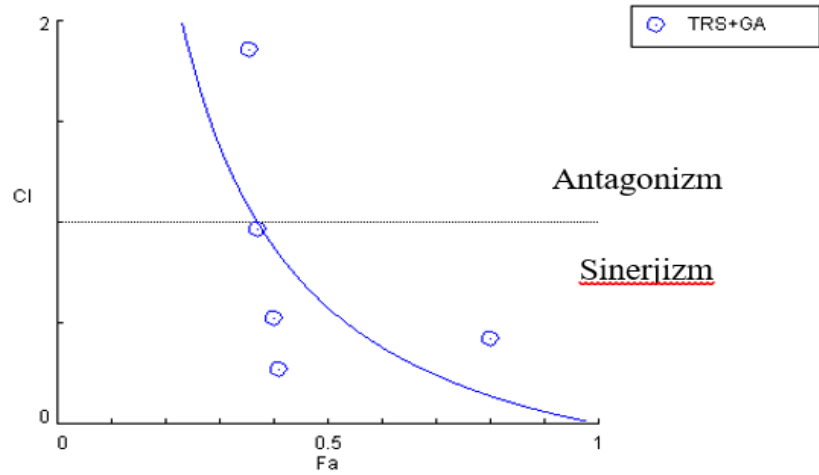
	CI	Yorumlama
CI-1	1,8610	CI>1 “antagonistik”
CI-2	1,002	CI>1 “antagonistik”
CI-3	0,5271	CI<1 “sinerjistik”
CI-4	0,2707	CI<1 “sinerjistik”



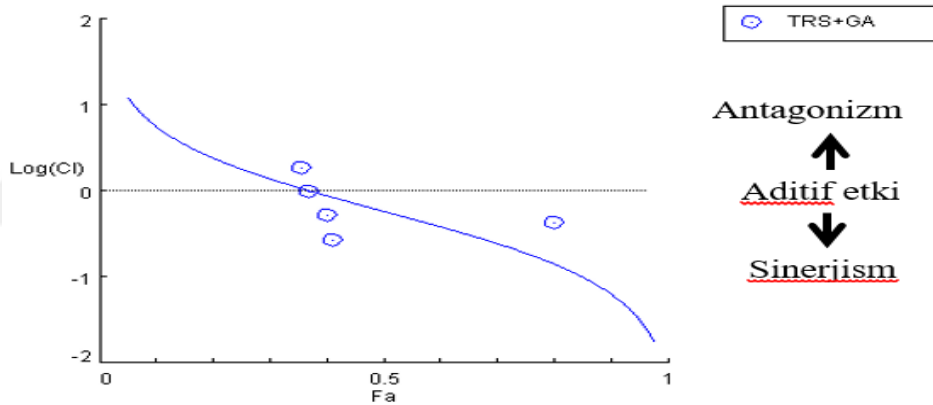
Şekil 4.18. 72. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Dose effect curve eğrisi



Şekil 4.19. 72. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen medain effect plot eğrisi



Şekil 4.20. 72. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Combination Index plot eğrisi



Şekil 4.21. 72. saatte trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında MDA-MB-453 hücre hattında gözlenen Logarithmic Combination Index plot eğrisi

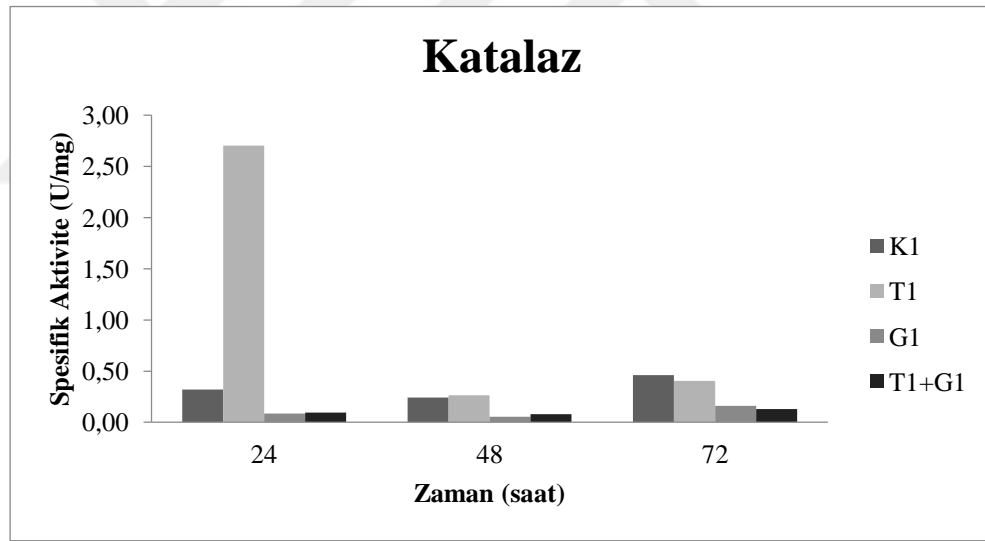
4.1. Enzimlerin Aktivite Değerleri

MDA-MB-453 hücre hattına uygulanan trastuzumab ve gambojik asitin tek tek ve kombinasyonları XTT testi kullanılarak sitotoksisite ölçümleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ölçülen sonuçlara göre CompuSyn.exe programı ile CI_{50} değerleri hesaplandı. Veri sonuçlarının değerlendirilmesi sonucunda çalışılacak derişim hesaplandıktan sonra deney planlaması yapıldı. Planlamada üç deney grubu oluşturuldu. Deney grubunda tratsuzumab, gambojik asit, kombinasyonu ve kontrol için petrilere her birinde 10 mL DMEM besiyeri içerisinde 18×10^5 tane hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat

inkübasyondan sonra hücrelere belirlenen dozlarda maddeler uygulandı. Hücreler 24 saat, 48 saat ve 72 saatin ardından hücre parçalama protokolüne göre parçalayarak her enzim için seçilen yöntemle enzim aktivite tayini yapıldı. Hesaplamaların sonuçları aşağıda detaylandırıldı.

Tablo 4.5. Katalaz enziminin 24, 48 ve 72.saat madde uygulanan hücre hattında okunan spektrofotometrik değerleri

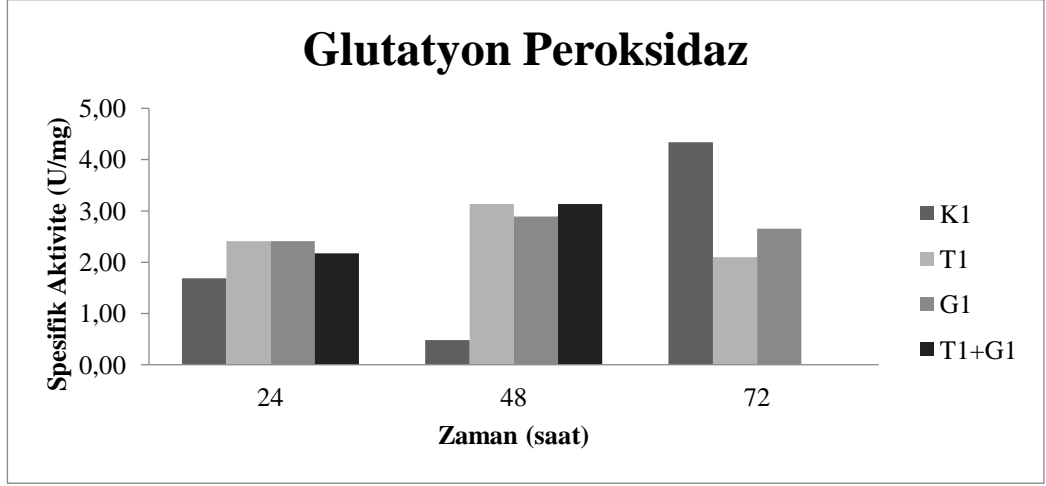
Grup	24. saat	48. saat	72. saat
Kontrol (K1)	0.320	0.242	0.461
Trastuzumab(T1)	2.705	0.263	0.405
Gambojik asit (G1)	0.087	0.056	0.162
Trastuzumab+Gambojik asit (T1+G1)	0.094	0.081	0.129



Şekil 4.22. Katalaz enziminin 24, 48, ve 72.saatteki aktivite grafiği

Tablo 4.6. Glutasyon peroksidaz enziminin 24, 48, ve 72.saat madde uygulanan hücre hattında okunan spektrofotometrik değerleri

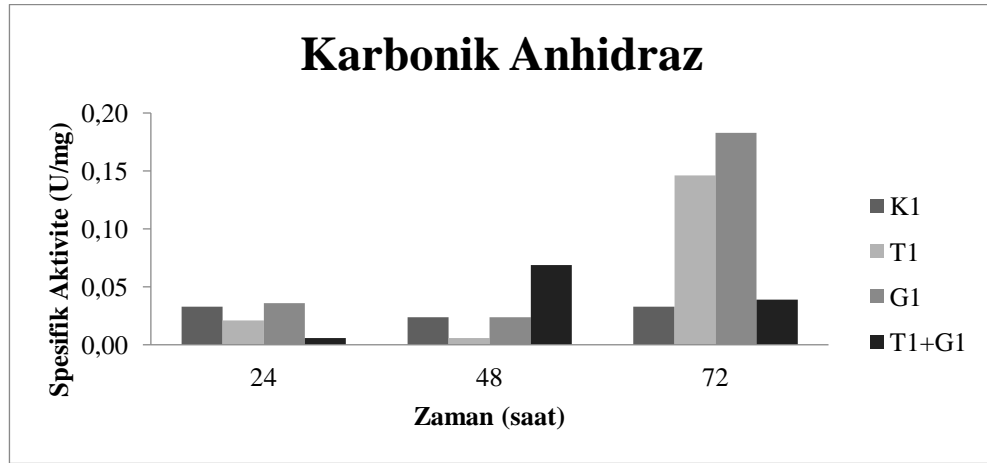
Grup	24. saat	48. saat	72. saat
K1	1.69	0.48	4.34
T1	2.41	3.14	2.10
G1	2.41	2.89	2.65
T1+G1	2.17	3.14	0.00



Şekil 4.23. Glutasyon peroksidaz enziminin 24, 48, ve 72.saatteki aktivite grafiği

Tablo 4.7. Karbonik anhidraz enziminin 24, 48, ve 72.saat madde uygulanan hücre hattında okunan spektrofotometrik değerleri

Grup	24. saat	48. saat	72. saat
K1	0.033	0.024	0.033
T1	0.021	0.006	0.146
G1	0.036	0.024	0.183
T1+G1	0.006	0.069	0.039



Şekil 4.24. Karbonik anhidraz enziminin 24, 48, ve 72.saatteki aktivite grafiği

5. SONUÇLAR

Kanser dünyada ve ülkemizde insanlığı tehdit eden en önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir ve tedavi sürecinin en önemli kısmını kemoterapi oluşturmaktadır. Bundan dolayı kanser hastalığına karşı kemoterapötiklerin geliştirilmesi ülkelerin ekonomilerinde önemli bir yer almaktadır. Özellikle son yıllarda hedefe yönelik kanser ilaçlarının geliştirilmesi ile daha büyük önem kazanmıştır. Ülkemizin 2023 vizyon programında da hedefe yönelik yeni nesil kanser ilaçlarının geliştirilmesi çalışmaları öncelikli destek kapsamına alınmıştır. Geliştirilen hedefe yönelik kanser ilaçlarının diğer kanser ilaçları ile ve antioksidan özellikleri bilinen çeşitli doğal bileşikler beraber (kombine) kullanılması klinik de kanser tedavisinde hastalara uygulanan en önemli tedavi stratejilerinden biridir. Elde edilen klinik öncesi ve klinik sonrası veriler, çeşitli kanser tiplerinde bu strateji tedaviyi hızlandırıcı ve destekleyici etkiler göstermiştir. Bu bağlamda yüksek lisans tez çalışmamda, HER-2 pozitif meme kanserinin tedavisinde rutin olarak kullanılan transtuzumab ilacı ile birlikte, güçlü bir doğal antioksidan olan gambojik asidin sinerjetik etkileri MDA-MB-453 insan HER-2 pozitif meme kanseri hücre hatlarında in-vitro olarak test edilmiş ve biyokimyasal parametrelerdeki değişimler belirlenmiştir.

Yüksek lisans tez çalışmamızda, transtuzumab ve gambojik asit farklı konsantrasyonlar da 12, 24, 48 ve 72 saat ayrı ayrı ve kombine şekilde MDA-MB-453 hücrelerine verilmiş ve her bir konsantrasyon değerindeki hücre canlılığı XTT testi ile belirlenmiştir. Kombine verildiğinde ortaya çıkan sinerjetik etkiler CompuSyn.exe programı ile hesaplanmış ve CI değerleri belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, 12 saatlik inkübasyon sonunda 100 µg/ml transtuzumab + 10 µM gambojik asit ve 50 µg/ml transtuzumab + 5 µM gambojik asit sinerjetik etki göstermiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda 50 µg/ml transtuzumab + 5 µM gambojik asit, 25 µg/ml transtuzumab + 2,5 µM gambojik asit ve 12,5 µg/ml transtuzumab + 1,25 µM gambojik asit sinerjetik etki göstermiştir. 48 saatlik inkübasyon sonunda 50 µg/ml transtuzumab + 5 µM gambojik asit ve 25 µg/ml transtuzumab + 2,5 µM gambojik asit sinerjetik etki göstermiştir. 72 saatlik inkübasyon sonunda 25 µg/ml transtuzumab + 2,5 µM gambojik asit ve 12,5 µg/ml transtuzumab + 1,25 µM gambojik asit sinerjetik etki göstermiştir. CI değeri 1 den ne kadar küçük ise sinerjetik etkinin o kadar büyük derecede olduğu

anlamındadır. Bu bağlamda bu sinerjetik etkinin görüldüğü konsantrasyonlarda en düşük CI değeri, diğer bir deyişle MDA-MB-453 insan HER-2 pozitif meme kanseri hücre hatlarında en iyi sinerjetik etki 72 saatlik inkübasyonda 12,5 µg/ml transtuzumab + 1,25 µM gambojik asidin kombinasyonunda görülmüştür. Sonuçlara göre gambojik asit trastuzumab'ın aktivitesini 72. Saatlik inkübasyonda ciddi oranda arttırmıştır.

Çalışmamızda, transtuzumab ve gambojik asidin en iyi sinerjetik aktivite gösterdiği konsantrasyon değeri olan 12,5 µg/ml transtuzumab + 1,25 µM gambojik asidin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde MDA-MB-453 insan HER-2 pozitif meme kanseri hücre hatlarında katalaz, glutasyon peroksidaz ve karbonik anhidraz enzimlerinin aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, 72. saat sonunda kontrol grubuna ve trastuzumab ve gambojik asidin tek tek uygulanmasına göre, 12,5 µg/ml transtuzumab + 1,25 µM/ml gambojik asit kombinasyonu MDA-MB-453 hücrelerinde katalaz, glutasyon peroksidaz ve karbonik anhidraz enzim aktivitesini ciddi oranda düşürmüştür. Bu enzimlerin aktivitesinin düşmesi kanserli hücrelerinin sağ kalımını azaltıcı yönde etki göstermiş ve böylelikle bu kombinasyonun anti kanser etki göstermesini sağlamıştır.

Tüm bu sonuçlara göre, gambojik asidin HER-2 pozitif meme kanseri tedavisinde klinikte rutin olarak kullanılan trastuzumab'ın aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Hedefe yönelik kanser ilaç dizayn çalışmalarında gambojik asidin iyi bir aday molekül olduğu belirlenmiş ve ayrıca kanser tedavisi gören hastaların kullanması için aday bir takviye edici potansiyeli belirlenmiştir. Ayrıca bu yüksek lisans çalışmasından elde edilen bu bilgiler, ileride yapılacak daha ileri bilimsel çalışmalar için önemli bir temel oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- Aebi, H. (1974) "Catalase", Methods of enzymatic analysis, *Elsevier*, 673-684.
- ACS, (2015) "What Is Cancer", <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html> (Son erişim tarihi: 01.10.2018).
- ACEA,(2012)"Cellviability"https://www.aceabio.com/wpcontent/uploads/Proliferation_Cytotoxicity.pdf (Son erişim tarihi:15.05.2019).
- Anadolu Sağlık, (2016). <https://www.anadolusaglik.org/blog/meme-kanserinde-evreleme> (Son erişim tarihi: 18.06.2019).
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M. and Khan, A. U. (2017) "Awareness and current knowledge of breast cancer", *Biological research*, 50 (1), 33.
- Akyolcu, N. (2008) "Meme kanserinde cerrahi girişim sonrası cinsel yaşam", *Meme Sağlığı Dergisi/Journal of Breast Health*, 4 (2),
- Aliustaoğlu, M. (2009) "Temel kanser fizyopatolojisi", *Klinik Gelişim*, 22 (3), 46-49.
- Anderson, B. O., Yip, C. H., Smith, R. A., Shyyan, R., Sener, S. F., Eniu, A., Carlson, R. W., Azavedo, E. and Harford, J. (2008) "Guideline implementation for breast healthcare in low-income and middle-income countries: Overview of the Breast Health Global Initiative Global Summit 2007", *Cancer*, 113 (S8), 2221-2243.
- Atasağungil, M., (1965) "Enzimler", Enzimler, *Güzel İstanbul Matbaası*, Ankara, 3.
- Bartelink, H., Horiot, J.-C., Poortmans, P. M., Struikmans, H., Van den Bogaert, W., Fourquet, A., Jager, J. J., Hoogenraad, W. J., Oei, S. B. and Wárlám-Rodenhuis, C. C. (2007) "Impact of a higher radiation dose on local control and survival in breast-conserving therapy of early breast cancer: 10-year results of the randomized boost versus no boost EORTC 22881-10882 trial", *Journal of Clinical Oncology*, 25 (22), 3259-3265.
- Benusiglio, P. R., Lesueur, F., Luccarini, C., Conroy, D. M., Shah, M., Easton, D. F., Day, N. E., Dunning, A. M., Pharoah, P. D. and Ponder, B. A. (2005) "Common ERBB2 polymorphisms and risk of breast cancer in a white British population: a case-control study", *Breast cancer research*, 7 (2), R204.
- Block, K. I., Gyllenhaal, C., Lowe, L., Amedei, A., Amin, A. R., Amin, A., Aquilano, K., Arbiser, J., Arreola, A. and Arzumanyan, A. (2015) "A broad-spectrum integrative design for cancer prevention and therapy", *Seminars in cancer biology*, S276.
- Booy, E. P., Johar, D., Maddika, S., Pirzada, H., Sahib, M. M., Gehrke, I., Loewen, S., Louis, S. F., Kadkhoda, K. and Mowat, M. (2006) "Monoclonal and bispecific antibodies as novel therapeutics", *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 54 (2), 85-101.

- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. and Jemal, A. (2018) "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries", *CA: a cancer journal for clinicians*, 68 (6), 394-424.
- Bulut, G. (2012) "İnsan HER2/neu pozitif, invaziv meem karsinomu hücre hattı olan MDA-MB-453 de trastuzumab ve gossipol (AT-101) kombinasyonunun sitotoksisite ve apoptozis üzerine etkisi", Uzmanlık tezi, *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç hastalıklar Anabilim Dalı*, İzmir, 40.
- Chaplin, M. F. and Bucke, C. (1990) "Enzyme technology, *Cambridge University Press*,
- Chen, S.-L., Zhang, W.-W., Wang, J., Sun, J.-Y., Wu, S.-G. and He, Z.-Y. (2019) "The role of axillary lymph node dissection in tubular carcinoma of the breast: population database study", *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 25 880.
- Ciriello, G., Gatza, M. L., Beck, A. H., Wilkerson, M. D., Rhie, S. K., Pastore, A., Zhang, H., McLellan, M., Yau and C., Kandoth, C. (2015) "Comprehensive molecular portraits of invasive lobular breast cancer", *Cell*, 163 (2), 506-519.
- Cox, M. M. and Nelson, L., D. (2005) "Enzimler: enzimlere giriş", Lehninger biyokimyanın ilkeleri, 3. Baskı, Prof. Dr. Nedret Kılıç, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 244.
- Cuaron, J. J., MacDonald, S. M. and Cahlon, O. (2016) "Novel applications of proton therapy in breast carcinoma", *Chinese clinical oncology*, 5 (4), 52.
- Çaylak, E. (2011) "Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar", *Tıp araştırmaları dergisi*, 9 (1), 73-83.
- Çimen, Ç., Çğdem, Ö., Demir, H. ve Savran, A. (2005) "Rat eritrositlerinden elde edilen katalaz enziminin karakterizasyonu ve kinetiğinin incelenmesi", *Yüzücü Yıl Üniversitesi veteriner Fakültesi Dergisi*, 16 (1), 15-20.
- Diplock, A. (1998) "Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients", *ILSI Europe concise monograph series*, 59
- Doğanay, S. ve Fırat, P. G. (2007) "Karbonik anhidraz inhibitörleri", *Glokom-Katarakt/Journal of Glaucoma-Cataract*, 2 (3),
- Duprez, R., Wilkerson, P. M., Lacroix-Triki, M., Lambros, M. B., MacKay, A., Hern, R. A., Gauthier, A., Pawar, V., Colombo, P. E. and Daley, F. (2012) "Immunophenotypic and genomic characterization of papillary carcinomas of the breast", *The Journal of pathology*, 226 (3), 427-441.
- Eccles, S. A., Aboagye, E. O., Ali, S., Anderson, A. S., Armes, J., Berditchevski, F., Blydes, J. P., Brennan, K., Brown, N. J. and Bryant, H. E. (2013) "Critical research gaps and translational priorities for the successful prevention and treatment of breast cancer", *Breast Cancer Research*, 15 (5), R92.

- Eliyatkın, N., Zengel, B.ve Aktaş, S. (2013) "Meme kanserinde HER-2/NEU (C-ERB-B2) durumunun önemi: hangi yöntemle değerlendirmek daha uygun?", *Meme Sağlığı Dergisi/Journal of Breast Health*, 9 (4).
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B. and Luo, W. (2018) "Breast cancer development and progression: risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis", *Genes & diseases*, 5 (2), 77-106.
- Figuroa-Magalhaes, M. C., Jelovac, D., Connolly, R. and Wolff, A. C. (2014) "Treatment of HER2-positive breast cancer", *Breast*, 23 (2), 128-136.
- Figuroa-Magalhães, M. C., Jelovac, D., Connolly, R. and Wolff, A. C. (2014). Treatment of HER2-positive breast cancer.*breast (Edinburgh, Scotland)*, 23(2), 128–136. doi:10.1016/j.breast.2013.11.011.
- Foulkes, W. D., Stefansson, I. M., Chappuis, P. O., Bégin, L. R., Goffin, J. R., Wong, N., Trudel, M. and Akslen, L. A. (2003) "Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer", *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 95 (19), 1482-1485.
- Fragomeni, S. M., Sciallis, A. and Jeruss, J. S. (2018) "Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer", *Surgical Oncology Clinics*, 27 (1), 95-120.
- Geçkil, H., (2011) "Enzimler", *Biyokimya I, İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Malatya*, 88-89.
- Gu, H., You, Q., Liu, W., Yang, Y., Zhao, L., Qi, Q., Zhao, J., Wang, J., Lu, N. and Ling, H. (2008) "Gambogic acid induced tumor cell apoptosis by T lymphocyte activation in H22 transplanted mice", *International immunopharmacology*, 8 (11), 1493-1502.
- Gültekin, M.ve Boztaş, G. (2014) "Türkiye kanser istatistikleri", *Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu*, 43
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) "Hallmarks of cancer: the next generation", *Cell*, 144 (5), 646-674.
- Hang, J. A., Sim, L. and Zakaria, Z. (2017) "Non-invasive breast cancer assessment using magnetic induction spectroscopy technique", *International Journal of Integrated Engineering*, 9 (2),
- Howell, A., Anderson, A. S., Clarke, R. B., Duffy, S. W., Evans, D. G., Garcia-Closas, M., Gescher, A. J., Key, T. J., Saxton, J. M. and Harvie, M. N. (2014) "Risk determination and prevention of breast cancer", *Breast Cancer Research*, 16 (5), 446.
- İlter, H. ve Keskinçilic, B. (2018) "Türkiye kanser istatistikleri 2015", *Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu*, 44-46.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D. (2011) "Global cancer statistics", *CA: a cancer journal for clinicians*, 61 (2), 69-90.

- Jia, B., Li, S., Hu, X., Zhu, G. and Chen, W. (2015) "Recent research on bioactive xanthenes from natural medicine: *Garcinia hanburyi*", *Aaps Pharmscitech*, 16 (4), 742-758.
- Jia, B., Li, S., Hu, X., Zhu, G. and Chen, W. (2015). Recent research on bioactive xanthenes from natural medicine: *Garcinia hanburyi*. *Aaps Pharmscitech*, 16(4), 742-758.
- Kamdje, A. H. N., Etet, P. F. S., Vecchio, L., Tagne, R. S., Amvene, J. M., Muller, J.-M., Krampera, M. and Lukong, K. E. (2014) "New targeted therapies for breast cancer: A focus on tumor microenvironmental signals and chemoresistant breast cancers", *World Journal of Clinical Cases: WJCC*, 2 (12), 769.
- Kaminska, M., Ciszewski, T., Lopacka-Szatan, K., Miotla, P. and Staroslawska, E. (2015) "Breast cancer risk factors", *Przegląd menopauzalny = Menopause review*, 14 (3), 196-202.
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ. . (2015) "Biyokimya, *Aktif Yayınevi*, Erzurum, 89.
- Kimiz-Gebologlu, I., Gulce-Iz, S. ve Biray-Avci, C. (2018) "Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy", *Molecular biology reports*, 45 (6), 2935-2940.
- Koçak, S., Çelik, L., Özbaş, S., Sak, S. D., Tükün, A. ve Yalçın, B. (2011) "Meme kanserinde risk faktörleri, riskin değerlendirilmesi ve prevansiyon: İstanbul 2010 konsensus raporu", *Meme Sağlığı Dergisi/Journal of Breast Health*, 7 (2),
- Koyunolğu, F., Konar, V. ve Sandal, S. (2013) "İnsan meme kanseri hücre serileri (MCF-7) üzerine apelin-13'ün etkilerinin araştırılması: In vitro bir çalışma", *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1 (1), 23-28.
- Kristeleit, H., Parton, M., Beresford, M., Macpherson, I. R., Sharma, R., Lazarus, L. and Kelleher, M. (2016) "Long-term follow-up data from pivotal studies of adjuvant trastuzumab in early breast cancer", *Targeted oncology*, 11 (5), 579-591.
- Kurt, H., Keşkek, Ş. Ö., Çil, T. and Canataroğlu, A. (2013) "Meme kanserli hastalarda tamamlayıcı/alternatif tedavi kullanımı", *Türk Onkoloji Dergisi*, 28 (1), 10-15.
- 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.
- Li, C., Qi, Q., Lu, N., Dai, Q., Li, F., Wang, X., You, Q. and Guo, Q. (2012) "Gambogic acid promotes apoptosis and resistance to metastatic potential in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells", *Biochemistry and Cell Biology*, 90 (6), 718-730.
- Li, F., Liu, J. and Rozovsky, S. (2014) "Glutathione Peroxidase's Reaction Intermediate Selenenic Acid is Stabilized by the Protein Microenvironment", *Free radical biology & medicine*, 127.
- Masood, S. (2016) "Breast cancer subtypes: morphologic and biologic characterization", *Women's Health*, 12 (1), 103-119.

- Melchor, L. and Benítez, J. (2013) "The complex genetic landscape of familial breast cancer", *Human genetics*, 132 (8), 845-863.
- Mukohara, T. (2011) "Mechanisms of resistance to anti-human epidermal growth factor receptor 2 agents in breast cancer", *Cancer Science*, 102 (1), 1-8.
- Nakhlis, F. and Morrow, M. (2003) "Ductal carcinoma in situ", *Surgical Clinics*, 83 (4), 821-839.
- NCI, (2019) "What Is Cancer", https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq#_148 (Son erişim tarihi: 15.06.2019)
- NCI, (2015) "What Is Cancer", <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (Son erişim tarihi: 25.09.2018).
- Nemeth, B. T., Varga, Z. V., Wu, W. J. and Pacher, P. (2017) "Trastuzumab cardiotoxicity: from clinical trials to experimental studies", *British journal of pharmacology*, 174 (21), 3727-3748.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A. and Deemer, E. K. (2002) "Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study", *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (11), 3122-3128.
- Özkan, S. ve Keskinçilic, B. (2015) "Türkiye kanser istatistikleri", *Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu*, 40-42.
- Özmen, V. (2009) "Meme kanseri hastalıklarının cerrahi tedavi kalitesi nasıl yükseltilebilir?", *Eur J Breast Health*, 5 (1), 1-1.
- Paglia, D. E. and Valentine, W. N. (1967) "Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase", *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 70 (1), 158-169.
- Parlar, S., Kaydul, N. ve Ovayolu, N. (2005) "Meme kanseri ve kendi kendine meme muayenesinin önemi", *Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Dergisi*, 8 (1), 72-83.
- Pegram, M. D., Pienkowski, T., Northfelt, D. W., Eiermann, W., Patel, R., Fumoleau, P., Quan, E., Crown, J., Toppmeyer, D. and Smylie, M. (2004) "Results of Two Open-Label, Multicenter Phase II Studies of Docetaxel, Platinum Salts, and Trastuzumab in HER2-Positive Advanced Breast Cancer", *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 96 (10), 759-769.
- Perez, E. A. and Baweja, M. (2008) "HER2-positive breast cancer: current treatment strategies", *Cancer investigation*, 26 (6), 545-552.
- Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R. and Jackisch, C. (2005a) "Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer", *New England Journal of Medicine*, 353 (16), 1659-1672.

- Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C. and others. (2005b) "Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer", *New England Journal of Medicine*, 353 (16), 1659-1672.
- Polyak, K. (2007) "Breast cancer: origins and evolution", *The Journal of clinical investigation*, 117 (11), 3155-3163.
- Posner, M. C. and Wolmark, N. (1992) "Non-invasive breast carcinoma", *Breast cancer research and treatment*, 21 (3), 155-164.
- Priya, V. and Prasaad, P. (2017) "Tubulo-lobular carcinoma: a rare mixed invasive carcinoma of breast", *Int J Res Med Sci*, 5 2818-2820.
- Robinson, P. K. (2015) "Enzymes: principles and biotechnological applications", *Essays in Biochemistry*, 59 1-41.
- Rodwell, W., V., Kenelly, J., P. ve İnal, E., M. (2004) "Enzimler: Genel Özellikleri", Harper Biyokimya, 25. Baskı, Nurten Dikmen ve Tuncay Özgünen, *Nobel Tıp Kitabevleri*, Adana, 74.
- Ross, J. S. and Fletcher, J. A. (1998) "The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy", *Stem cells*, 16 (6), 413-428.
- Schnitt, S. J. (2010) "Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy", *Modern Pathology*, 23 (S2), S60.
- Seidman, A. D., Fornier, M. N., Esteva, F. J., Tan, L., Kaptain, S., Bach, A., Panageas, K. S., Arroyo, C., Valero, V. and Currie, V. (2001) "Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification", *Journal of Clinical Oncology*, 19 (10), 2587-2595.
- Shah, R., Rosso, K. and Nathanson, S. D. (2014) "Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer", *World journal of clinical oncology*, 5 (3), 283.
- Simon, R., Nocito, A., Hübscher, T., Bucher, C., Torhorst, J., Schraml, P., Bubendorf, L., Mihatsch, M. M., Moch, H. and Wilber, K. (2001) "Patterns of HER-2/neu Amplification and Overexpression in Primary and Metastatic Breast Cancer", *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 93 (15), 1141-1146.
- Singh, S., Lomelino, C., Mboge, M., Frost, S. and McKenna, R. (2018) "Cancer drug development of carbonic anhydrase inhibitors beyond the active site", *Molecules*, 23 (5), 1045.
- Skoko, J. J., Attaran, S. and Neumann, C. A. (2019) "Signals Getting Crossed in the Entanglement of Redox and Phosphorylation Pathways: Phosphorylation of Peroxiredoxin Proteins Sparks Cell Signaling", *Antioxidants*, 8 (2), 29.

- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A. and McGuire, W. L. (1987) "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene", *science*, 235 (4785), 177-182.
- Stratton, M. R., Campbell, P. J. and Futreal, P. A. (2009) "The cancer genome", *Nature*, 458 (7239), 719.
- Stres, O. 2014. Antioksidanlar.
- Şakalar, Ç., İzgi, K. ve Canatan, H. (2013) "Kanser immün terapi ve monoklonal antikolar", *FÜ Sağ Bil Tıp Derg* 2013, 27 (2): 105, 111.
- Şencan, İ. ve Keskinçilic, B. (2016) "Türkiye knaser istatistikleri" *Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu*, 42-43.
- Şencan, İ. ve Keskinçilic, B. (2017) "Türkiye kanser istatistikleri", *Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu*, 44-46.
- Theodoratou, E., Timofeeva, M., Li, X., Meng, X. and Ioannidis, J. P. (2017) "Nature, nurture, and cancer risks: genetic and nutritional contributions to cancer", *Annual review of nutrition*, 37 293-320.
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M. and Jemal, A. (2016) "Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update", *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 25 (1), 16-27.
- Vega-Rubín-de-Celis, S., Zou, Z., Fernández, Á. F., Ci, B., Kim, M., Xiao, G., Xie, Y. and Levine, B. (2018) "Increased autophagy blocks HER2-mediated breast tumorigenesis", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115 (16), 4176-4181.
- Verma, R., Bowen, R., Slater, S., Mihaimed, F. and Jones, J. (2012) "Pathological and epidemiological factors associated with advanced stage at diagnosis of breast cancer", *British medical bulletin*, 103 (1), 129-145.
- Verpoorte, J. A., Mehta, S. and Edsall, J. T. (1967) "Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C", *Journal of Biological Chemistry*, 242 (18), 4221-4229.
- Weigelt, B., Geyer, F. C. and Reis-Filho, J. S. (2010) "Histological types of breast cancer: how special are they?", *Molecular oncology*, 4 (3), 192-208.
- Wen, H. Y. and Brogi, E. (2018) "Lobular carcinoma in situ", *Surgical pathology clinics*, 11 (1), 123-145.
- Willcox, J. K., Ash, S. L. and Catignani, G. L. (2004) "Antioxidants and prevention of chronic disease", *Critical reviews in food science and nutrition*, 44 (4), 275-295.
- Wu, G., Kim, D., Kim, J. N., Park, S., Maharjan, S., Koh, H., Moon, K., Lee, Y. and Kwon, H.-J. (2018) "A Mucin1 C-terminal subunit-directed monoclonal antibody targets overexpressed Mucin1 in breast cancer", *Theranostics*, 8 (1), 78.

- Yang, X. R., Sherman, M. E., Rimm, D. L., Lissowska, J., Brinton, L. A., Peplonska, B., Hewitt, S. M., Anderson, W. F., Szeszenia-Dąbrowska, N. and Bardin-Mikolajczak, A. (2007) "Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study", *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 16 (3), 439-443.
- Yasin, O. (2016) "Türkiye’de yaşam boyu kansere yakalanma riski", *Sosyal Güvençe*, (12), 108-124.
- Yüzügüllü, Y.ve Ögel, Z. B. (2013) "Çift aktiviteli katalaz-fenol oksidazının ve diğer katalazların gıda sanayisindeki önemi", *GIDA*, 38 (2), 111-118.
- Zhao, L., Zhen, C., Wu, Z., Hu, R., Zhou, C., and Guo, Q. (2010). General pharmacological properties, developmental toxicity, and analgesic activity of gambogic acid, a novel natural anticancer agent. *Drug and chemical toxicology*, 33(1), 88-96..



ÖZGEÇMİŞ

Şırnak'ın Cizre İlçesine bağlı Yakacık Köyünde 1992'de doğdu. İlkokul öğrenimine İnci Köyünde başladı. Ortaokul ve lise öğrenimini Cizre'de tamamladı. 2012 yılında Erzincan Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Eğitimi A.B.D. 'dan 2016 yılında mezun oldu. 2016 yılında Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde başladığı yüksek lisans eğitimini sürdürmektedir.

