

T.C.  
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**GAMBOJİK ASİT VE TRASTUZUMAB'IN HER2 POZİTİF  
MEME KANSERİ ÜZERİNE SİNERJİK ANTİKANSER  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ahmet ÇETİN

Danışman: Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

**BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN  
2020**

**Her Hakkı Saklıdır.**

### **Bilimsel Etięe Uygunluk Sayfası**

“Gambojik asit ve Trastuzumab’ın HER2 Pozitif Meme Kanseri Üzerine Sinerjik Antikanser Etkilerinin İncelenmesi” isimli “Doktora” 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 gerektirdiğı gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim.

23/6/2020



**Ahmet ÇETİN**

## ÖZET

Doktora Tezi

### GAMBOJİK ASİT VE TRASTUZUMAB'IN HER2 POZİTİF MEME KANSERİ ÜZERİNE SİNERJİK ANTİKANSER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ahmet ÇETİN

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

Kadınlarda ölüm oranı en yüksek olan kanser türü meme kanseridir. HER2 pozitif meme kanseri, HER2 reseptörünün yüksek ifadesiyle tanımlanan bir meme kanseri türüdür. Trastuzumab HER2'yi hedef alan monoklonal antikordur ve HER2 pozitif meme kanserli hastalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Trastuzumab HER2 reseptörüne bağlanarak bu reseptörün kanser hücresinde aktive ettiği birçok sinyal yolağını inhibe eder.

Gambojik asit *Garcinia hanburryi* ağacından saflaştırılan bir moleküldür. Gambojik asitin meme kanserinin de içinde bulunduğu pek çok kanser türüne karşı anti tümör aktiviteye sahip olduğunu gösteren çok sayıda çalışma literatür de yer almaktadır.

Kanser tedavisinde daha etkili sonuçlar elde etmek için başka bir sitotoksik ajanla kombinasyon yapılarak sinerjik etki oluşturulması üzerine yapılan çalışmalar oldukça yaygındır.

Çalışmamızda Trastuzumab ve gambojik asitin HER2 (+) meme kanseri üzerine sinerjik antikanser etkileri incelendi. Hücre hattı olarak MDA-MB-453 kullanıldı. Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonunun hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi incelendi ve CompuSyn programı ile kombinasyon indeksi hesaplandı. Sinerjik etkinin en fazla olduğu saat ve konsantrasyonlar: 24 saat, 50 µg/ml Trastuzumab ve 5 µM gambojik asit olarak belirlendi. *HER2*, *caspase-9* ve *BAX* gen ifade seviyeleri ve protein düzeyleri analiz edildi. Trastuzumab ve gambojik aside göre kombinasyonunun HER2'yi daha çok baskıladığı ve protein seviyesini daha çok azalttığı görüldü.

**2020, 77 Sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Gambojik asit, HER2, Meme kanseri, Trastuzumab.

## ABSTRACT

Doctorate Thesis

### THE ANALYSIS OF SYNERGIC ANTICANCER EFFECTS OF GAMBOGIC ACID AND TRASTUZUMAB ON HER2 POSITIVE BREAST CANCER

Ahmet ÇETİN

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

Supervisor: Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

The cancer type with the highest mortality rate in women is breast cancer. HER2 positive breast cancer is a type of invasive breast cancer that is defined by the high expression of the HER2 receptor. Trastuzumab is a monoclonal antibody that targets HER2 and is widely used in patients with HER2 positive breast cancer. Trastuzumab binds to the HER2 receptor, inhibiting many signal pathways that this receptor activates in the cancer cell.

Gambogic acid is a molecule purified from the *Garcinia hanburryi* tree. There are many studies in the literature that show that gambogic acid has anti tumor activity against many types of cancer, including breast cancer.

Studies on creating synergistic effects by combining with another cytotoxic agent to achieve more effective results in cancer treatment are quite common.

In our study, the synergistic anti cancer effects of Trastuzumab and gambogic acid on HER2 (+) breast cancer were examined. MDA-MB-453 was used as the cell line. The cytotoxic effect of Trastuzumab, gambogic acid and its combination on the cell line was examined and the combination index was calculated with the CompuSyn program. The hours and concentrations with the highest synergistic effect were determined as 24 hours, 50 µg / ml Trastuzumab and 5 µM gambogic acid. HER2, caspase-9 and *BAX* gene expression levels and protein levels were analyzed. The combination of Trastuzumab and gambogic acid was found to suppress HER2 more and reduce protein levels more.

**2020, 77 Pages**

**Keywords:** Breast cancer, Gambogic acid, HER2, Trastuzumab.

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım da desteğini hiç bir zaman eksik etmeyen, bilgi ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım tez danışmanım çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Murat ÇANKAYA' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans ve doktora çalışmalarım boyunca bana sürekli destek olan kıymetli hocam sayın Prof. Dr. T. Abdulkadir ÇOBAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktora çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, beni her daim motive eden sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KUZUCU' ya tüm içtenliklerimle teşekkür ederim. Çalışmalarımın her aşamasında destek olan, bana hücre kültürü çalışmalarını öğreten sayın Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZGÜR' e teşekkürlerimi sunarım.

Lisans üstü eğitim hayatım boyunca beni her zaman destekleyen, sabır ve anlayış gösteren, sevgili eşim Ebru ÇETİN' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca FDK-2018-565 nolu proje ile bana maddi kaynak sağlayarak tezimi tamamlamamı sağlayan Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri yönetimine teşekkürlerimi sunarım.

Ahmet ÇETİN

Haziran, 2020

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	x
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>3</b>
2.1. Kanser .....	3
2.1.1. Kanser istatistikleri.....	5
2.1.3. Türkiye’de kanser .....	7
2.2. Meme Kanseri.....	9
2.2.1. Meme kanseri risk faktörleri.....	9
2.2.2. Meme kanseri evreleri.....	12
2.2.3. Meme kanserinin sınıflandırılması.....	14
2.2.3.1. Histolojik sınıflandırma .....	14
2.2.3.2. Moleküler sınıflandırma.....	16
2.2.4. Meme kanseri teşhisi ve tedavisi.....	18
2.2.4.1. Meme kanseri teşhis yöntemleri.....	18
2.2.4.2. Meme kanseri tedavi yöntemleri.....	20
2.3. HER2 Reseptörü .....	22
2.3.1. HER2’nin yüksek ifade düzeylerini hedef alan tedavi yaklaşımları .....	25
2.3.1.1. Monoklonal antikorlar.....	25
2.3.1.2. Heterodimerizasyonu bozan antikorlar .....	25
2.3.1.3. Tirozin kinaz inhibitörleri .....	26
2.4. Trastuzumab (Herceptin®) .....	26
2.4.1. Trastuzumab’ın Etki Mekanizmaları.....	27
2.4.2. Trastuzumab direnç mekanizmaları .....	29
2.4.2.1. p95HER2.....	29
2.4.2.2. MUC4 ile HER2’nin maskelenmesi.....	30

2.4.2.3. PTEN ifadesinin azalması .....	31
2.4.2.4. p27 ifadesinin azalması .....	31
2.4.2.5. IGF-1R ile alternatif sinyal iletimi .....	31
2.4.2.6. c-Met RTK ile alternatif sinyal iletimi .....	32
2.4.2.7. EGFR'nin diğer üyeleri ile alternatif sinyal iletimi .....	32
2.5. Gambojik Asit .....	32
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>35</b>
3.1. Materyal .....	35
3.1.1. Hücre Hattı .....	35
3.1.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar .....	35
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	36
3.2. Yöntem .....	36
3.2.1. Hücre kültürü çalışmaları .....	36
3.2.1.1. Besiyerlerinin hazırlanması .....	36
3.2.1.2. Hücre hattının pasajlanması .....	37
3.2.1.3. Hücre hattı stoklarının oluşturulması .....	38
3.2.1.4. Hücre çözündürme .....	38
3.2.1.5. Hücre sayımı .....	39
3.2.2. Sitotoksosite çalışmaları .....	40
3.2.2.1. Uygulanacak kimyasalların hazırlanması .....	40
3.2.2.2. Hücre canlılık testi .....	40
3.2.3. Kombinasyon indeksinin hesaplanması .....	41
3.2.4. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi .....	42
3.2.5. Total RNA ve cDNA konsantrasyonunun ve saflığının belirlenmesi .....	44
3.2.6. RT-qPCR ile gen ifade düzeylerinin belirlenmesi .....	44
3.2.7. İstatistiksel hesaplamalar .....	46
3.2.8. Protein ekstraksiyonu .....	47
3.2.9. ELISA ile protein düzeylerinin belirlenmesi .....	48
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>49</b>
4.1. Sitotoksosite Çalışmaları .....	49
4.1.1. Hücre canlılık testi .....	49
4.1.2. Kombinasyon indeksi .....	51
4.1.3. Gen ifade düzeylerinin belirlenmesi .....	54
4.2. Protein seviyelerinin belirlenmesi .....	56

<b>5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....</b>	<b>57</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>61</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>74</b>
EK-1. 12 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonlarının Doz-Effect ve Median-Effect Eğrileri.....	74
EK-2. 24 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonlarının Dose-Effect ve Median-Effect Eğrileri .....	75
EK-3. 48 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonlarının Dose-Effect ve Median-Effect Eğrileri .....	76
EK-4. 72 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonlarının Dose-Effect ve Median-Effect Eğrileri .....	77
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>78</b>





## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Karsinogenez'in başlama, ilerleme ve metastaz süreçleri. ....	4
Şekil 2.2. Kıtalara ait 2018 yılı tahmini yeni kanser vakası sayısı .....	5
Şekil 2.3. 2018 yılı, dünya geneli kanser türlerine göre tahmini vaka sayısı.....	6
Şekil 2.4. 2018 yılı, dünya geneli tüm yaş grubu kadın ve erkeklerde ölümle sonuçlanan tahmini vaka sayısı.....	6
Şekil 2.5. 2018 yılı, dünya geneli tüm yaş grubu kadınlarda ölümle sonuçlanan tahmini vaka sayısı .....	7
Şekil 2.6. Türkiye'de tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanser türlerinin bu grup içindeki yüzde dağılımları.....	8
Şekil 2.7. Türkiye'de tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanser türlerinin bu grup içindeki yüzde dağılımları .....	8
Şekil 2.8. Meme kanseri evrelerinin yüzde dağılımları .....	9
Şekil 2.9. Meme kanseri risk faktörleri.....	11
Şekil 2.10. Histolojik sınıflandırmaya göre meme kanseri türleri .....	15
Şekil 2.11. Meme kanserinin moleküler sınıflandırmaya göre alt türleri .....	17
Şekil 2.12. Meme kanseri özel alt tiplerinin histolojik ve moleküler özellikleri .....	18
Şekil 2.13. Erken evre meme kanseri tedavi algoritması.....	21
Şekil 2.14. Biyomarker ifade düzeylerine göre neo-adjuvan tedavi yaklaşımı.....	22
Şekil 2.15. HER reseptörlerinin yapısı ve ligantları .....	23
Şekil 2.16. ERBB sinyal yolağı .....	24
Şekil 2.17. HER2 dimerizasyonu sonucunda aktif hale gelen PI3-K/Akt ve MAPK sinyal yolakları ve gerçekleşen hücresel faaliyetler.....	25
Şekil 2.18. Trastuzumab'ın molekül yapısını gösteren çubuk (a), küre (b) ve kurdele (c) diyagramları .....	27
Şekil 2.19. Trastuzumab'ın HER2 pozitif meme kanserine etki mekanizması.....	29
Şekil 2.20. HER2, 95-100 kDa p95HER2 ve 100-115 kDa p95HER2'nin şematik gösterimi.....	30
Şekil 2.21. Gambojik asit'in molekül yapısı.....	33
Şekil 2.22. Gambojik asit'in dahil olduğu hücresel sinyal yolağı.....	34
Şekil 4.1. 12 saat inkübasyon süresinde MDA-MB-453 hücre hattı üzerine Trastuzumab, gambojik asit ve T+G'nin antikanser aktivitesi. ....	49
Şekil 4.2. 24 saat inkübasyon süresinde MDA-MB-453 hücre hattı üzerine Trastuzumab, gambojik asit ve T+G'nin antikanser aktivitesi. ....	50

Şekil 4.3.	48 saat inkübasyon süresinde MDA-MB-453 hücre hattı üzerine Trastuzumab, gambojik asit ve T+G'nin antikanser aktivitesi. ....	50
Şekil 4.4.	72 saat inkübasyon süresinde MDA-MB-453 hücre hattı üzerine Trastuzumab, gambojik asit ve T+G'nin antikanser aktivitesi. ....	51
Şekil 4.5.	12 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab ve gambojik asit kombinasyonlarının kombinasyon indeksi grafiği. ....	52
Şekil 4.6.	24 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab ve gambojik asit kombinasyonlarının kombinasyon indeksi grafiği. ....	52
Şekil 4.7.	48 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab ve gambojik asit kombinasyonlarının kombinasyon indeksi grafiği. ....	53
Şekil 4.8.	72 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab ve gambojik asit kombinasyonlarının kombinasyon indeksi grafiği. ....	54
Şekil 4.9.	Trastuzumab, gambojik asit ve T+G uygulanmış hücrelerde <i>HER2</i> geninin ifade düzeyi. ....	54
Şekil 4.10.	Trastuzumab, gambojik asit ve T+G uygulanmış hücrelerde <i>BAX</i> geninin ifade düzeyi. ....	55
Şekil 4.11.	Trastuzumab, gambojik asit ve T+G uygulanmış hücrelerde <i>caspase-9</i> geninin ifade düzeyi. ....	55

## TABLULAR LİSTESİ

### Sayfa

Tablo 2.1. Benign ve Malign tümörler arasındaki farklılıklar .....	4
Tablo 2.2. 2018 yılına ait Avrupa'daki bazı ülkelerin her iki cinsiyette, her yaşta ve tüm kanser çeşitlerinde tahmini insidans ne mortalite sayıları.....	7
Tablo 2.3. TNM kriterleri yönteminde semboller ve ifade ettiği anlamlar .....	12
Tablo 2.4. TNM derecelendirme yöntemi ile meme kanseri evreleri .....	13
Tablo 2.5. Trastuzumab'ın tarihsel gelişimi .....	27
Tablo 3.1. Hücrelere uygulanan kimyasallar ve konsantrasyonları. ....	41
Tablo 3.2. Kombinasyon indeksi sonuçlarına göre, uygulanan kimyasalların hücre hattı üzerine sinerjik, aditif ya da antagonistik etkisi. ....	42
Tablo 3.3. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi için petrilere uygulanan kimyasal maddeler ve derişimleri. ....	42
Tablo 3.4. İfade düzeyleri belirlenecek genler ve primer dizileri. ....	45
Tablo 3.5. <i>HER2</i> geni için RT-qPCR sıcaklık döngü protokolü.....	45
Tablo 3.6. <i>caspase-9</i> geni için RT-qPCR sıcaklık döngü protokolü. ....	46
Tablo 3.7. <i>BAX</i> geni için RT-qPCR sıcaklık döngü protokolü. ....	46
Tablo 3.8. <i>GAPDH</i> geni için RT-qPCR sıcaklık döngü protokolü. ....	46
Tablo 3.9. Protein ekstraksiyon işlemi için Petrilere uygulanan kimyasal maddeler ve derişimleri. ....	47
Tablo 4.1. 12 Saat inkübasyon süresinde Trastuzumab ve gambojik asit kombinasyonlarının CI değerleri. ....	51
Tablo 4.2. 24 Saat inkübasyon süresinde Trastuzumab ve gambojik asit kombinasyonlarının CI değerleri. ....	52
Tablo 4.3. 48 Saat inkübasyon süresinde Trastuzumab ve gambojik asit kombinasyonlarının CI değerleri. ....	53
Tablo 4.4. 72 Saat inkübasyon süresinde Trastuzumab ve gambojik asit kombinasyonlarının CI değerleri. ....	53
Tablo 4.5. BAX, caspase-9 ve HER2 protein seviyeleri.....	56

## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

$^{\circ}C$	Celsius
%	Yüzde
$\mu g$	Mikro gram
$\mu l$	Mikro litre
$\mu M$	Mikro molar
<i>Da</i>	Dalton
<i>dk</i>	Dakika
<i>g</i>	Yer çekimi ivmesi
<i>iu</i>	International unit
<i>L</i>	Litre
<i>M</i>	Molar
<i>ml</i>	Mili litre
<i>ng</i>	Nano gram
<i>nm</i>	Nano metre
$\Delta$	Delta

## Kısaltmalar

ACS	Amerika Kanser Topluluğu
ASM	Anadolu Sağlık Merkezi
BCS	Meme koruma cerrahisi
cDNA	Komplementer DNA
ChT	Kemoterapi
CI	Kombinasyon indeksi
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER	Östrojen reseptörü
ET	Endokrin terapi
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
G	Gambojik asit
GLOBOCAN	Uluslararası Kanser Gözlemevi
HER2	İnsan Epidermal büyüme faktörü reseptör-2
HSGM	Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
mRNA	Haberci RNA
OD	Optik dansite
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PR	Progesteron reseptörü
RT	Radyo terapi
RT-qPCR	Ters transkriptaz-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
T	Trastuzumab
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

## 1. GİRİŞ

Kanser her yıl milyonlarca insanın ölümüne sebep olan dünyanın en büyük sağlık sorunlarından bir tanesidir. Küresel bir sorun haline gelmiş olan kanser hastalığına 2018 verilerine göre tahmini olarak 18,1 milyon yeni vaka eklenmiştir. Dünyada her beş erkekten birinde ve her altı kadından birinde kanser gelişmektedir (IARC, 2019). Ayrıca her sekiz erkekten biri ve her on bir kadından biri kanserden ölmektedir. Avrupa'daki kanser vakaları ise küresel kanser vakalarının %23,4'ünü oluşturmaktadır (IARC, 2019). Son beş yılki veriler, Dünya çapındaki tahmini kanser vakası sayısı olarak birinci sırada yer alan kanser türünün meme kanseri olduğunu göstermektedir (GLOBOCAN, 2019). Türkiye de Halk Sağlığı Kanser Dairesi Başkanlığının 2004-2006 yıllarını kapsayan sekiz noktada gerçekleştirdiği Türkiye kanser insidansı araştırma sonuçlarına göre meme kanseri insidansı 33,7/100.000 olarak tespit edilmiştir (Eser vd., 2010). Kanser türü, insidansı ve mortalitesi, cinsiyete göre değişiklik gösterir. GLOBOCAN (2019) verilerine göre kadın ve erkekler de toplam ölüm oranı en yüksek olan kanser türü akciğer kanseriyken sadece kadınlar da, ölüm oranı en fazla olan kanser türü meme kanseridir.

Meme kanserinin farklı sınıflandırma şekilleri vardır. Bunlardan birisi de meme kanseri hücrelerinin östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2) ifade düzeylerine göre yapılan moleküler sınıflandırmadır. Moleküler sınıflandırmada yer alan meme kanseri türleri: Luminal A, Luminal B, Bazal benzeri ve Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2) geninin yüksek ifade düzeylerinin görüldüğü HER2 pozitif meme kanseridir (Reis-Filho ve Pusztai, 2011). EGFR ailesinin bir üyesi olan HER2, hücre membranında heterodimerler ve homodimerler oluşturarak kanser hücrelerine çoğalma, yayılma, hayatta kalma gibi faaliyetler kazandırır (Ross vd., 2004). Meme kanserlerinin yaklaşık %20 sini HER2 pozitif meme kanseri oluşturmaktadır (Rayson vd., 2008).

İnsanlık için bu denli ciddi tehdit oluşturan, çok fazla sayıda türü ve alt türü bulunan kanser hastalıklarına, çeşitli tedavi yöntemleri geliştirmek için yapılan çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Monoklonal antikorlar, heterodimerizasyonu bozan antikorlar,

Tirozin kinaz inhibitörleri gibi HER2 yüksek ifade düzeylerini hedef alan bazı tedavi yaklaşımları geliştirilmiş ve hala da geliştirilmeye devam edilmektedir.

Kanser immün terapi yöntemleri içerisinde klinik uygulamalara en fazla aktarılan terapiye yönelik üretilen ilaçlardan birisi de monoklonal antikordur (Waldmann, 2003). Trastuzumab'da HER2 yi hedef alan bir monoklonal antikordur. Bu monoklonal antikor HER2 ye bağlanarak HER2 reseptörünün kanser hücrelerinde aktive ettiği sinyal yolaklarını inhibe eder (Şakalar vd., 2013). Tedavisinde Trastuzumab kullanan meme kanseri hastalarında ölüm oranının %20 azaldığı tespit edilmiştir (Slamon vd., 2001).

Kanser tedavisinde, monoterapi den daha etkili sonuçlar almak için ya da ilaca karşı direnç geliştirmiş hücrelerde ilaç etkinliğini artırmak için, başka bir sitotoksik ajanla kombine edilerek sinerjik etki oluşturulması üzerine yapılan çalışmalar oldukça yaygındır. Kanser tedavilerinde kombinasyonda kullanılması düşünülen ilaçların ön klinik çalışmaları yapılarak yan etkileri, toleransı, sağlıklı hücrelere ve kanser hücrelerine etkileri incelenir. Kombinasyon ile tedavi yaklaşımlarında minimum dozda maksimum sayıda kanser hücresinin hedef alınması çok önemlidir (Bulut, 2012).

Son yarım yüzyıl boyunca yapılan farmakolojik çalışmalar sonucunda *Garcinia hanburryi* ağacından salgılanan gamboge'den saflaştırılmış gambojik asit'in Lösemi, Hepatoma, Oral, Meme, Pankreas, Prostat, Epitelyal servikal ve Akciğer kanseri gibi çeşitli tümörlere karşı güçlü anti tümör aktiviteye sahip olduğu ortaya çıkartılmıştır (Pandey vd., 2007; Zhao vd., 2008; Huang vd., 2011). Ayrıca apoptozu indükleyip, proliferasyon ve anjiyogenezi inhibe ettiği bilinmektedir (Wang ve Chen, 2012).

Tez çalışmasında, gambojik asit'in ve Trastuzumab'ın HER2 pozitif meme kanseri üzerine sinerjik antikanser etkisi incelenmiştir. Hücre hattı olarak HER2 reseptörü ifade düzeyi olan MDA-MB-453 kullanılmıştır. Referans gen olarak *Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz* (GAPDH) kullanılmıştır. Öncelikle MDA-MB-453 Hücre hattı üzerinde sinerjik etki çalışmaları yapılmış ve çıkan sonuçların Compusyn programı ile combination index (CI) değerleri hesaplanmıştır. RT-qPCR ile *caspase-9*, *BAX* ve *HER2* genlerinin ifade düzeyi analizleri ve ELISA ile protein analizleri yapılmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Kanser

Kanser ile ilgili çalışma yaptığı bilinen ilk kişi M.Ö. 4. yy da yaşamış olan Hipokrat'tır. Ayrıca M.Ö. 2. yy da yaşamış olan Galen'e ait kanser ve diğer bazı hastalıklarla ilgili yüzlerce bölüm vardır ve bu bölümlerden bir tanesi tümör üzerinedir (Sigerist, 1932).

Kansere sebep olan etkenler günümüzde bile tam olarak anlaşılamamıştır. Genetik mutasyonların, tekstil ve deri sanayisinde kullanılan boyaların, petrol rafinerisinde kullanılan kimyasalların, su kirliliğine yol açan bazı kimyasalların, tütün içeriğinde yer alan kimyasalların ve gama ışını, X ışını, UV gibi mor ötesi ışınların kanserle bağlantılı olduğu bilinmektedir. HSGM (2019)'ye göre kanser den ölümlerin üçte birini; tütün kullanımı, aşırı kilo, sebze ve meyve tüketiminin az olması, yetersiz fiziksel aktivite ve alkol tüketimi olmak üzere beş risk faktörü oluşturmaktadır. Kanserdeki en önemli risk faktörü tütün kullanımıdır ve kanserden kaynaklanan ölümlerin %22'sini oluşturmaktadır (WHO, 2019).

Kanser, DNA'nın farklı sebeplerle hasar görmesi sonucu hücrelerin kontrolsüz bir şekilde proliferasyonuna ve invazyonuna denir. Kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerden en önemli farklılığı kontrolsüz çoğalma ve kan veya lenf damarları ile farklı dokulara yayılmalarıdır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

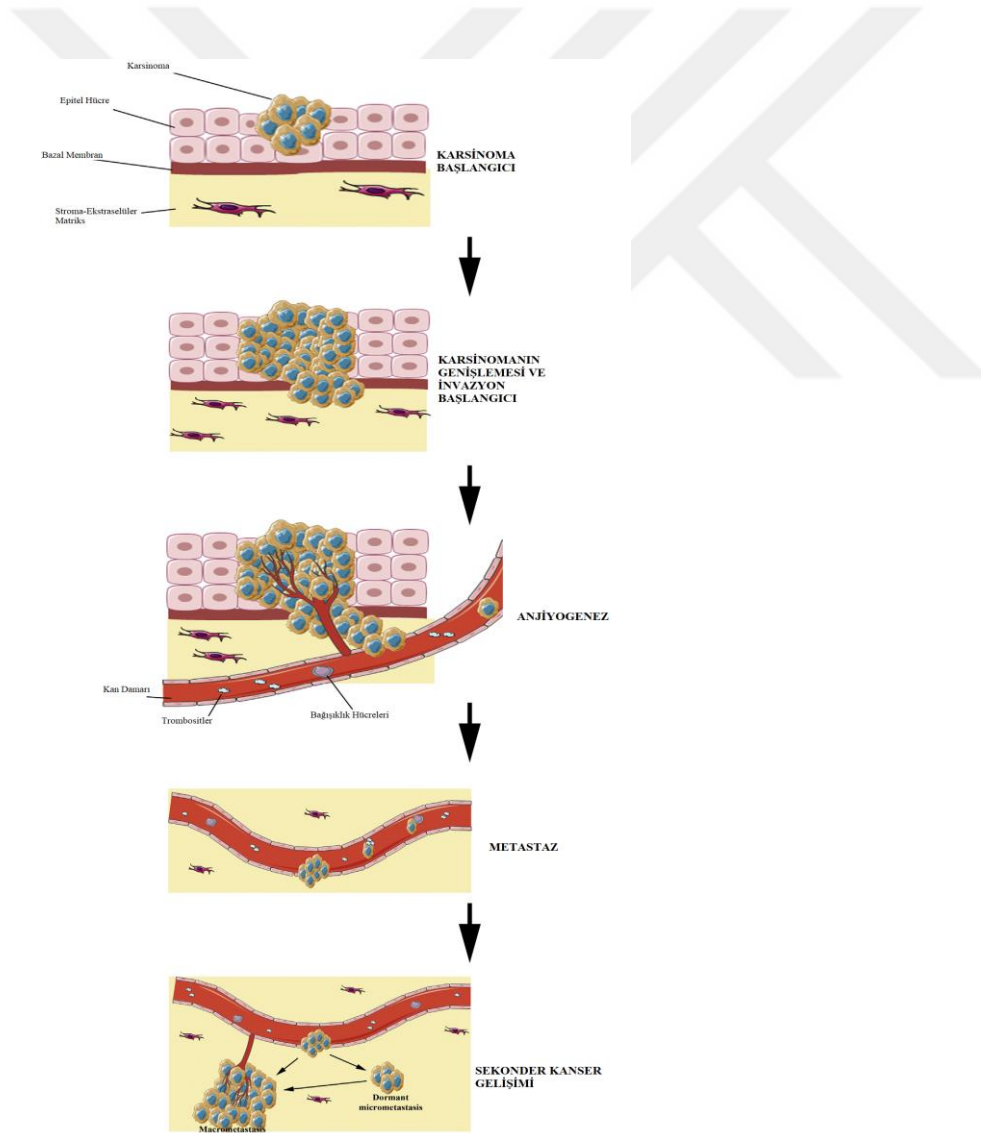
Bölünme yeteneğine sahip olan hücrenin her hangi bir nedenle kontrolsüz çoğalmasına tümör adı verilir. Tümörler iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) olmak üzere ikiye ayrılır. Tüm malign tümörler kanser olarak nitelendirilir. Malign tümörler metastaz olan, apoptoz yolaklarını kapatmış, anjiyogenez özelliği gösteren yaşam süresini kısaltan hatta ölüme sebep olan tümör türleridir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Malign tümörler komşu dokulara girebilmek için matrix bileşenlerini parçalama özelliği olan proteaz enzimi salgırlar (Keleg vd., 2003; Bozzuto vd., 2010). Ayrıca bu hücreler zamanla telomer kısalması sonucu hücre ölümünü engellemek için telomeraz enziminin yüksek ifadesini sağlar, bu sayede sınırsız replikasyon yeteneğine sahip olurlar (Lowe ve Lin, 2000). Malign tümörlerin başka bir önemli özelliği ise besin alımı ve metabolik



atıklardan kurtulmak için anjiyogenez (Damar oluşumu) yapmasıdır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

**Tablo 2.1.** Benign ve Malign tümörler arasındaki farklılıklar (Kurt, 2016).

<b>Benign Tümörler</b>	<b>Malign Tümörler</b>
Büyüme hızları yavaştır.	Büyüme hızları fazladır
Morfolojisi ve fonksiyonları normal hücreye benzer.	Morfolojisi ve fonksiyonları normal hücreye benzemez.
Lokal İnvazyon özelliği gösterir.	İnvazyon özelliği vardır.
Metastaz özelliği yoktur.	Metastaz özelliği vardır.

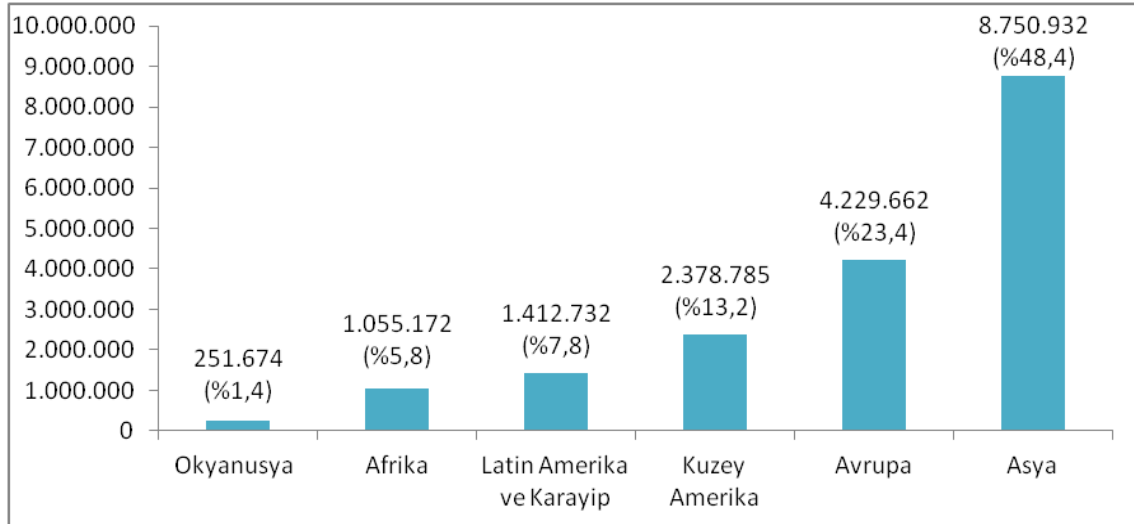


**Şekil 2.1.** Karsinojenez'in başlama, ilerleme ve metastaz süreçleri (Jianga vd., 2013).

### 2.1.1. Kanser istatistikleri

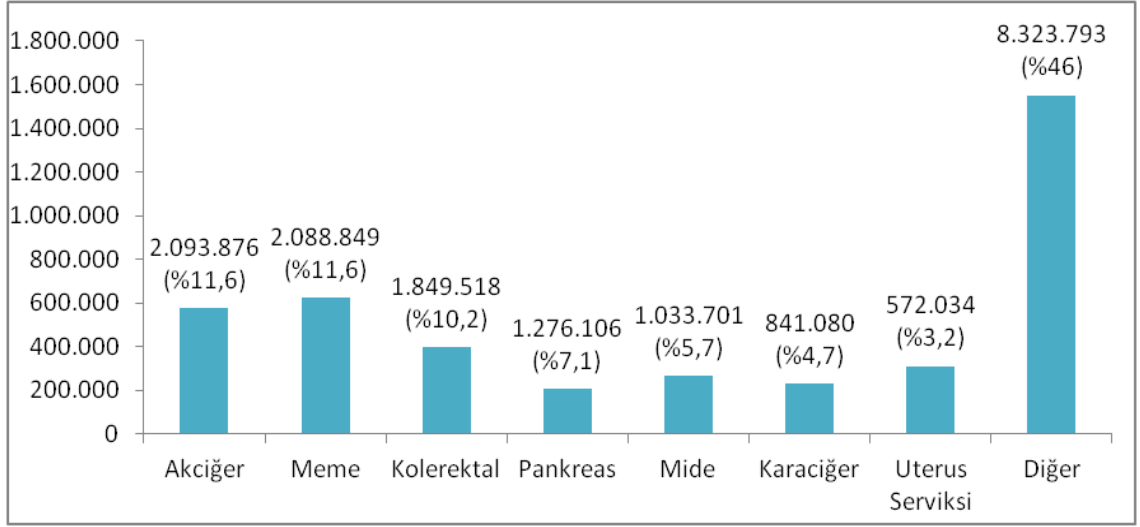
Dünyada hastalıklara dayalı ölümlerin başında Kardiyovasküler hastalıklardan sonra kanser hastalığı gelmektedir. İnsanlık için en önemli sorunlardan bir tanesi olan kanserle ilgili teşhis ve tedavi üzerine yapılan çalışmalar hızla artmaktadır. Bununla birlikte kanserle mücadelede istatistiksel analizlerde çok önemlidir ve buna yönelik çalışma yapan pek çok kurum ve kuruluş vardır. International Agency for Research on Cancer (IARC)'in bir parçası olan GLOBACAN, 185 ülkede 36 kanser türüne ait istatistiklerin yer aldığı en önemli veri tabanıdır. Bu veri tabanında kanserle ilgili, görülme sıklığı, ölüm oranı, kanser-yaş ilişkisi gibi bilgiler yer almaktadır. Dünya çapında son beş yılda kansere yakalanan insan sayısının 43,8 milyon olduğu tahmin edilmektedir ayrıca 2018 yılında 18,1 milyon yeni vaka tespit edilmiştir (IARC, 2019). 2025 yılında ise kanser vakalarının sayısının yaklaşık 19,3 milyon olacağı öngörülmektedir (Bishayee ve Block, 2015).

GLOBOCAN (2019) verilerine göre dünya genelindeki en çok kanser vakası görülen kıta Asya kıtasıdır, ikinci sırada ise Avrupa gelmektedir. 18,1 milyon vakanın %48,4 (8750932 kişi)'ü Asya'da, %23,4 (4229662 kişi) Avrupa'dadır.



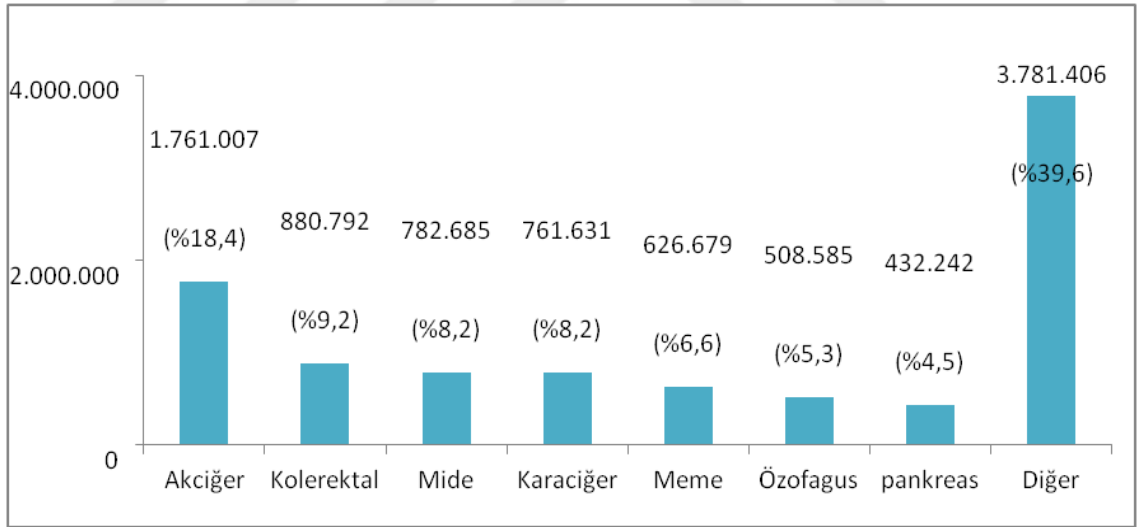
**Şekil 2.2.** Kıtalara ait 2018 yılı tahmini yeni kanser vakası sayısı (GLOBOCAN, 2019).

Dünyada en çok görülen kanser türü 2018 yılında 2,094 milyon (%11,6) ile akciğer kanseridir, ikinci sırada ise 2,089 milyon (%11,6) ile meme kanseri gelmektedir (GLOBOCAN, 2019).

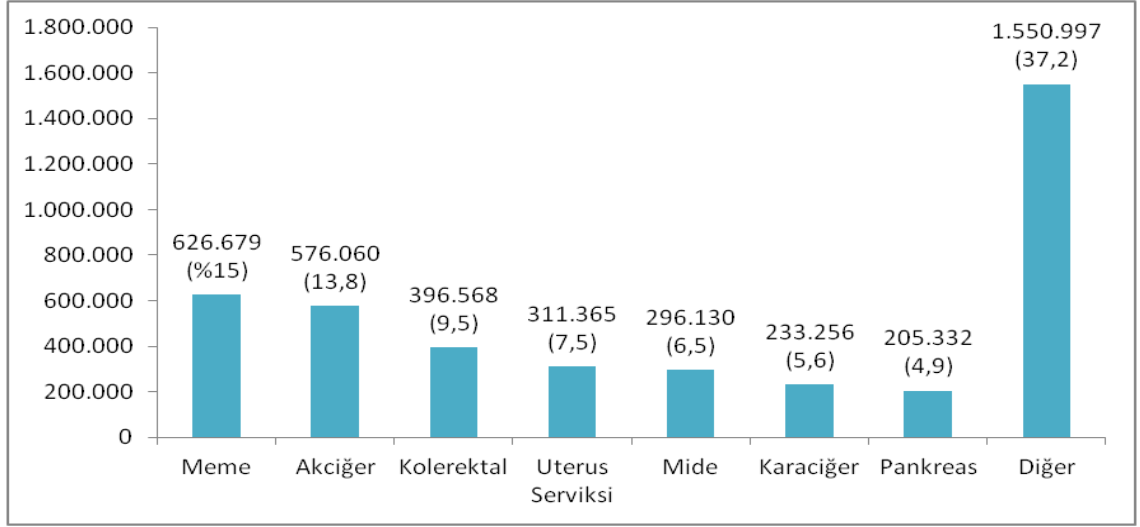


**Şekil 2.3.** 2018 yılı, dünya geneli kanser türlerine göre tahmini vaka sayısı (GLOBOCAN, 2019).

2018 yılında dünya çapında en fazla ölümlle sonuçlanan kanser türü 1,8 milyon (%18,4) ile akciğer kanseridir. Kadınlarda ise en fazla ölümlle sonuçlanan kanser türü yaklaşık 627 bin (%15) ile meme kanseridir (GLOBOCAN, 2019).



**Şekil 2.4.** 2018 yılı, dünya geneli tüm yaş grubu kadın ve erkeklerde ölümlle sonuçlanan tahmini vaka sayısı (GLOBOCAN, 2019).



**Şekil 2.5.** 2018 yılı, dünya geneli tüm yaş grubu kadınlarda ölüme sonuçlanan tahmini vaka sayısı (GLOBOCAN, 2019) .

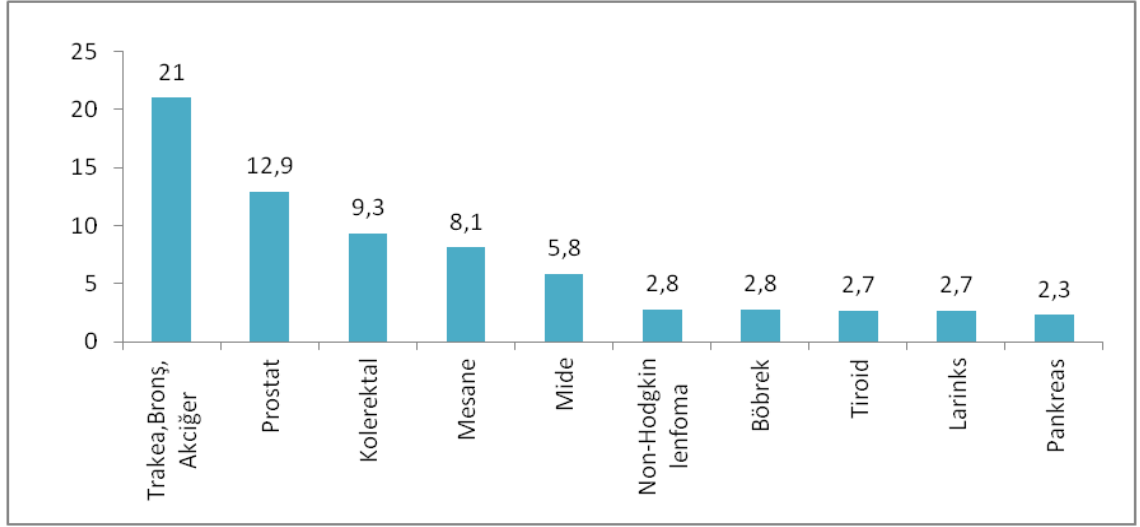
### 2.1.3. Türkiye’de kanser

Dünya genelindeki ölümlerin yaklaşık altıda biri kanser den kaynaklanmaktadır (WHO, 2019). Türkiye’deki ölümlerin ise yaklaşık beşte biri kanserden kaynaklanmaktadır (TÜİK, 2019).

**Tablo 2.2.** 2018 yılına ait Avrupa’daki bazı ülkelerin her iki cinsiyette, her yaşta ve tüm kanser çeşitlerinde tahmini insidans ne mortalite sayıları (GLOBOCAN, 2019).

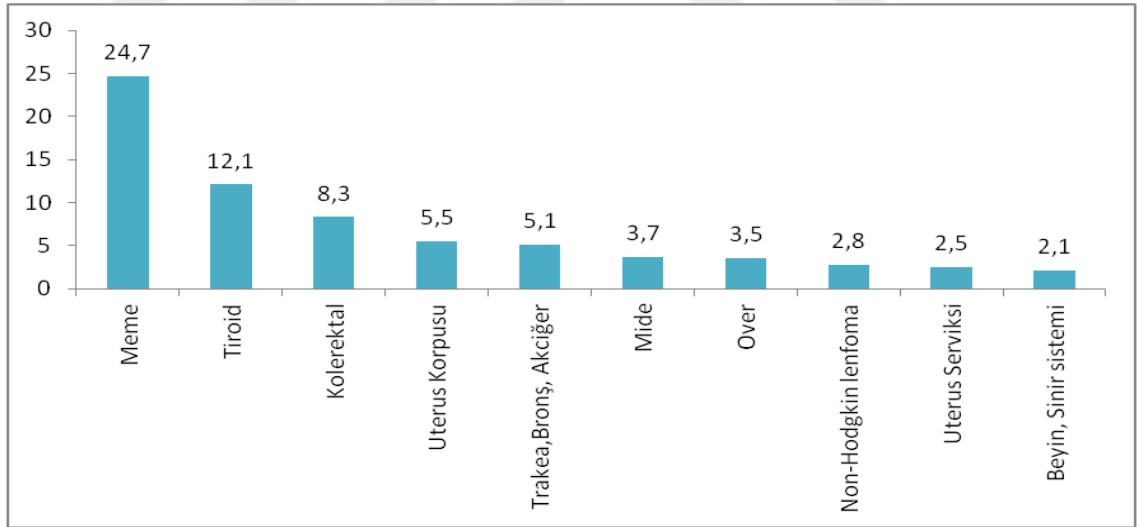
	İnsidans	Mortalite
Türkiye	210.537	116.710
Almanya	608.742	247.462
Rusya	543.045	314.611
Fransa	455.618	182.372
İngiltere	446.942	178.473
İtalya	409.808	175.741
İspanya	270.363	113.584
Polonya	185.630	113.388
Ukrayna	169.817	98.226

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de en sık görülen kanser türü akciğer kanseridir. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü verilerine göre ülkemizde en çok rastlanan kanser türü %21 ile akciğer kanseridir, ikinci sırada ise %12,9 ile prostat kanseridir.



**Şekil 2.6.** Türkiye’de tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanser türlerinin bu grup içindeki yüzde dağılımları (HSGM, 2019).

Dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de kadınlarımızı tehdit eden kanser türlerinin başında meme kanseri gelmektedir. Türkiye’de yaşayan kanser hastası kadınların %24,7’si meme kanseridir.



**Şekil 2.7.** Türkiye’de tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanser türlerinin bu grup içindeki yüzde dağılımları (HSGM, 2019).

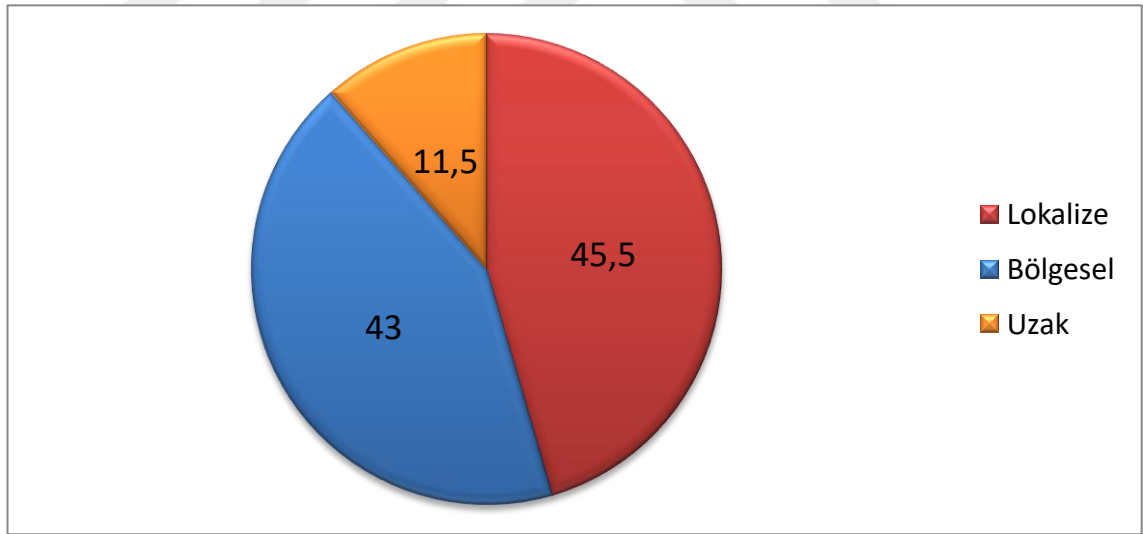
Ülkemizde 2015 yılında yaşa göre standardize edilmiş kanser hızı erkeklerde yüz binde 247,6 iken kadınlarda ise yüz binde 177,5 olduğu görülmektedir. Toplamda kanser insidansı ise yüz binde 212,6’dır. Türkiye’de yaklaşık olarak toplam 167.463 kişiye yeni kanser teşhisi konulmuştur. 2010-2015 yılları arasındaki verilere bakıldığında;

erkeklerde kanser sıklığında azalma görülürken, kadınlarda herhangi bir değişim görülmemektedir (HSGM, 2019).

## 2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, memede yer alan herhangi bir dokudaki hücrelerin çeşitli sebeplerden dolayı kontrolsüz proliferasyonu sonucu ortaya çıkar. Oldukça fazla çeşidi olan meme kanserinin en sık görülen türü meme kanallarında gelişen duktal karsinom dur.

Kadınlar da kanserden kaynaklanan ölümlerin başında %15 ile meme kanseri gelmektedir. Bunu sırasıyla akciğer kanseri (%13,8) ve kolorektal kanseri(%9,5) izlemektedir (IARC, 2019). İstatistiklere göre Türkiye’de kanser tanısı konulan kadınların dörtte biri meme kanseridir. Ülkemizde meme kanseri teşhisi konulan kadınların yaşa göre dağılımları ise şu şekildedir; %44,5’i 50-69 yaş aralığında, %40,6 sı 25-49 yaş aralığındadır. Meme kanseri evreleri incelendiğinde vakaların %11,5’i uzak evrededir (HSGM, 2019).



Şekil 2.8. Meme kanseri evrelerinin yüzde dağılımları (HSGM, 2019).

### 2.2.1. Meme kanseri risk faktörleri

Meme kanserine dair yapılan çalışmalarda belirli kriterlere sahip kadınlarda meme kanseri riskinin daha fazla olduğu görülmektedir ve bu kriterlere Meme kanseri risk faktörü adı verilmektedir (Campbell, 2002). Meme kanseri risk faktörleri

değiştirilemeyen ve değiştirilebilen olmak üzere iki gruba ayrılır. Değiştirilemeyen risk faktörleri: Cinsiyet, aile öyküsü, yaş, erken menstürasyon ve geç menopoz, değiştirilebilen risk faktörleri: Sigara ve alkol tüketimi, kilo, besinle alınan kimyasallar ve menopoz döneminde kullanılan hormon preparatları (Kushi vd., 2012).

Meme kanserindeki en önemli risk faktörü bireyin kadın olmasıdır Meme kanseri vakalarının %99'unu kadınlar oluşturmaktadır (Kaymakçı, 2014).

Meme kanseri riski yaşla doğru orantılıdır. 25 yaşında meme kanseri riski oldukça düşüktür, 45 yaşında ise meme kanserine yakalanma olasılığı 100 kat artmaktadır (Hulka ve Moorman, 2001). Meme kanseri 30'lu yaşlardan sonra menopoz dönemine kadar hızlı bir artış gösterir, menopoz döneminde biraz azalır ve sonrasında yavaş bir artış olur. Yaş ilerledikçe meme kanserinin artması üreme hormonlarından kaynaklanmaktadır (Dumitrescu ve Cotarla, 2005).

Meme kanseri olan birinci derecede akrabaya sahip olması, kadınlarda kanser riskini yaklaşık iki katına çıkartır (ACS, 2019). Güçlü aile öyküsü olan BRCA-1 ya da BRCA-2 gen mutasyonu taşıyan kadınlarda meme kanseri riski oldukça yüksektir (Schwartz vd., 2008). Meme kanserine yol açabilecek başka gen mutasyonları da vardır, bu mutasyonlar BRCA genleri kadar risk taşımaz (ACS, 2019). Meme kanserine yol açabilecek riski az olan gen mutasyonları: ATM, TP53, CHEK2, PTEN, CDH1, STK11, PALB2 (ACS, 2019).

Yoğun meme dokusuna sahip olan kadınlar yaklaşık iki kat meme kanseri riski taşır, hamilelik, yaş, menopoz durumu, bazı ilaçlar, genetik faktörler meme kanseri yoğunluğunu etkileyen faktörlerdir (ACS, 2019).

Benign meme kanseri tanısı alan kadınların meme kanseri riski bulunmaktadır. Benign meme kanseri üç grupta toplanmıştır bunlar: riski çok az olan Proliferatif olmayan lezyonlar, risk faktörünü biraz yükselten A-tipi olmayan proliferatif lezyonlar (hücre anormallikleri) ve atipik proliferatif lezyonlardır (ACS, 2019).

Kadınlarda menstürasyonun erken başlaması meme kanseri riskini artırır, bunun sebebinin östrojen ve progesteron hormonlarına uzun süre maruz kalmaktan kaynaklandığı düşünülmektedir (ACS, 2019).

İyonize radyasyon tüm bireylerde genotoksik etki sonucu oluşan DNA hasarlarından dolayı meme kanseri riskini artırır (Land vd., 2003; Little ve McElvenny, 2016). Ayrıca herhangi bir kanser den dolayı radyoterapi gören ve genç yaşta göğüs bölgesinde radyasyona maruz kalan kişilerde kanser riski önemli oranda artmaktadır (ACS, 2019).

1940-1970 yılları arasında düşük riskini azaltmak amacıyla DES adı verilen östrojen benzeri bir ilaç verilirdi, bu ilacı kullanan kadınlarda meme kanseri riskinin daha yüksek olabileceği bildirilmiştir (ACS, 2019).

Alkol tüketiminin de meme kanserini tetiklediği yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Alkol alan kadınların almayanlara göre %20 daha fazla risk taşıdığı görülmüştür, ayrıca obezite, yetersiz fiziksel aktivite, çocuk sahibi olmamak, emzirmeme, doğum kontrol hapları, Menopoz sonrası hormon tedavisi ve Göğüs implantlarının da meme kanseri riskini artırabileceği bildirilmiştir (ACS, 2019).

Uygun beslenme şekli ile meme kanseri riski azaltılabilir. Omega3 içeren besinler, doymamış yağ asidi içeren besinler sebze, meyve meme kanseri riskini azaltır (Dumitrescu ve Cotarla, 2005).

<b>Değiştirilemeyen Risk Faktörleri</b>	<b>Değiştirilebilir Risk Faktörleri</b>	<b>Belirsiz Risk Faktörleri</b>	<b>Kanıtlanmamış Risk Faktörleri</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Cinsiyet</li><li>• Yaş</li><li>• Genetik risk faktörleri</li><li>• Aile öyküsü</li><li>• Memede daha önceden kanser ya da atipik hiperplazi olması</li><li>• Irk</li><li>• Yoğun meme dokusu</li><li>• Benign meme hastalıkları</li><li>• Erken menarş, geç menapoz</li><li>• Daha önce göğüs bölgesine alınan radyasyon</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Çocuk sahibi olmama ya da ilk doğumu 35 yaşın üzerinde yapma</li><li>• Postmenapozal hormon tedavisi</li><li>• Kombine östrojen ve progesteron kullanımı</li><li>• Emzirme</li><li>• Günlük alkol alımı</li><li>• Postmenapozal obezite</li><li>• Fiziksel aktivite</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Diyet ve vitamin alımı</li><li>• Çevredeki kimyasallar</li><li>• Sigara kullanımı</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Antiperspirantlar</li><li>• Saç boyaları</li><li>• Sütyen</li><li>• Kürtaj</li><li>• Meme implantları</li></ul>

**Şekil 2.9.** Meme kanseri risk faktörleri (Çömez, 2016).



### 2.2.2. Meme kanseri evreleri

Meme kanseri, klinik aşamada TNM kriterleri adı verilen bir yöntemle derecelendirilir, bu derecelendirme sisteminde 'T' tümör boyutunu, 'N' lenf nodlarını ve 'M' ise metastazı ifade eder (Singletary ve Connolly, 2006).

**Tablo 2.3.** TNM kriterleri yönteminde semboller ve ifade ettiği anlamlar (Singletary et al., 2003).

Semboller	TNM kriterlerinin açıklaması
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümör yok
Tis	İnsitü karsinom
T1	Çapı 2 cm den küçük olan tümör
T2	Çapı 2-5 cm arasında olan tümör
T3	Çapı 5 cm den büyük olan tümör
T4	Herhangi bir boyutta olan fakat tüm cilde veya meme duvarına yayılmış
T4a	Meme duvarına yayılmış tümör
T4b	Tümör, kafa tası tabanındaki masticator boşluğunu işgal eder veya iç karotid arteri çevreler
NX	Değerlendirilemeyen lenf nodu
N0	Metastaz olmayan lenf nodu
N1	Yakın bölgedeki aksillada lenf nodlarına metastaz
N2	Yakın bölgedeki aksillada birbirlerine yada çevreye yapışık olan lenf nodlarına metastaz
N2a	Birbirlerine yada çevreye fiske olan lenf nodlarına metastaz
N2b	En büyüğünün boyutu 6 cm'den fazla olmayan, birden fazla ipsilateral lenf nodunda metastaz
N2c	En büyüğünün boyutu 6 cm'den fazla olmayan, bilateral veya kontralateral lenf nodlarında metastaz
N3	Boyutu 6 cm'den fazla olan lenf nodlarında metastaz
MX	Değerlendirilemeyen Uzak Metastaz
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz

TNM derecelendirme yöntemi ile kanser: Evre 0, Evre I, Evre IIA, Evre IIB, Evre IIIA, Evre IIIB, Evre IIIC, Evre IV olarak sınıflandırılmıştır

**Tablo 2.4.** TNM derecelendirme yöntemi ile meme kanseri evreleri (Singletary vd., 2003).

<b>Evre</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre II A	T0	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre II B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre III A	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
Evre III B	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
Evre III C	T4	N2	M0
	T0-T1-T2-T3-T4	N3	M0
Evre IV	T0-T1-T2-T3-T4	N0-N1-N2	M1

Evre I ve II opere edilebilir evre, III A ve III B lokal ileri hastalık, III C ileri hastalık ve IV ise metastatik hastalığı ifade etmektedir (TMHDF, 2019). Meme kanseri olan hastalarda, kanserin hangi evrede olduğunun tespit edilmesi tedaviye yön verilmesi açısından oldukça önemlidir.

### **2.2.3. Meme kanserinin sınıflandırılması**

Meme kanseri oldukça farklı klinik ve patojenik özellikleri olan ve çok sayıda alt gruplara sahip bir hastalıktır. Alt grup meme kanserli hastaların tedaviye gösterdiği yanıt farklı olduğu için alt tipin doğru tanımlanması çok önemlidir (Blows vd., 2010).

#### **2.2.3.1. Histolojik sınıflandırma**

Meme kanseri olan hastalarda tedaviye yön verebilmek ve daha sağlıklı sonuçlar alabilmek için tümörün biyolojik davranışlarını tahmin etmek çok önemlidir. Bu anlamda meme kanseri hücrelerinin sınıflandırılması yapılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre meme kanseri genel olarak non-invaziv, invaziv ve meme başı (paget hastalığı) olmak üzere üç gruba ayrılmış olmakla birlikte pek çok alt türü de mevcuttur.

İnvaziv duktal karsinom bu grup içerisinde yaklaşık %75 ile en sık görülen tiptir (Li vd., 2005). Östrojen reseptörü pozitif olan İnvazif lobüler karsinom ise % 5-%10 oranında görülür ve beklenmedik dokulara metastaz yapabilme özelliği vardır (Ferlicot vd., 2004; Orvieto vd., 2008).

Meme kanserinin tespiti ve sınıflandırılması için bilgisayar temelli birçok sistem geliştirilmiştir. Tanıda kullanılan yöntemlerin bazıları şunlardır:

- Artificial Neural Networks (ANN)
- Random Forest (RF)
- Support Vector Machines (SVM)
- Principal Component Analysis (PCA)

<p><b>Epitelial Tümörler</b></p> <p>1 -İnvaziv Duktal Karsinom, -Miks tip karsinom -Pleomorfik karsinom -Osteoklastik dev hücreli karsinom -Koryokarsinomatöz özellikli karsinom -Melanotik özellikli karsinom</p> <p>2 -İnvaziv lobuler karsinom</p> <p>3 -Tubuler karsinom</p> <p>4 -İnvaziv kribriform karsinom</p> <p>5 -Medüller karsinom</p> <p>6 -Müsinöz karsinom ve bol müsin içeren diğer tümörler -Müsinöz karsinom -Kistadenokarsinom ve kolumnar hücreli müsinöz karsinom -Taşlı yüzük hücreli karsinom</p> <p>7 -Nöroendokrin tümörler -Solid nöroendokrin hücreli karsinom -Atipik karsinoid tümör -Küçük hücreli/yulaf hücreli karsinom -Büyük hücreli nöroendokrin karsinom</p> <p>8 -İnvaziv papiller karsinom</p> <p>9 -İnvaziv mikropapiller karsinom</p> <p>10 -Apokrin karsinom</p> <p>11 -Metaplastik karsinomlar -Saf epitelial metaplastik karsinom *Skuamöz hücreli karsinom *İğsi hücre metaplazili adenokarsinom *Adenoskuamöz karsinom *Mukoepidermoid karsinom -Mikst epitelial/mezenkimal metaplastik karsinomlar</p> <p>12 -Lipitten zengin karsinom</p> <p>13 -Sekretuar karsinom</p> <p>14 -Onkositik karsinom</p> <p>15 -Adenoid kistik karsinom</p> <p>16 -Asinik hücreli karsinom</p> <p>17 -Glikojenden zengin şeffaf hücreli karsinom</p> <p>18 -Sebase karsinom</p>	<p>19 -İnflamatuvar karsinom</p> <p>20 -Lobuler neoplazi -Lobuler karsinoma in situ</p> <p>21 -İntraduktal proliferatif lezyonlar -Sıradan (usual) duktal hiperplazi -Düz (flat) epitelial hiperplazi -Atipik duktal hiperplazi -Duktal karsinoma insitu</p> <p>22 -Mikroinvaziv karsinom</p> <p>23 -İntraduktal papiller neoplaziler -Santral papillom -Periferik papillom -Atipik papillom -İntraduktal papiller karsinom -İntrakistik papiller karsinom</p> <p>24 -Benign epitelial proliferasyonlar -Adenosis *Sklerozan adenosis *Apokrin adenosis *Blunt duktus adenosis *Mikroglandüler adenosis *Adenomyoepitelial adenosis</p> <p>25 -Radyal skar/kompleks sklerozan lezyon</p> <p>26 -Adenomlar - Tubuler adenom -Laktasyon adenomu -Apokrin adenom -Pleomorfik adenom -Duktal adenom</p> <p><b>Myoepitelial Lezyonlar</b></p> <p>1 -Myoepiteliiosis 2 -Adenomyoepitelial adenosis 3 -Adenomyoepitelioma 4 -Malign myoepitelioma</p> <p><b>Mezenkimal Tümörler</b></p> <p>1 -Hemanjiom 2 -Anjiomatosis 3 -Hemajiooperisitom 4 -Psödoanjiomatöz stromal hiperplazi 5 -Myofibroblastom</p>	<p>6 -Fibromatosis (agresiv)</p> <p>7 -İnflamatuvar myofibroblastik tümör</p> <p>8 -Lipom -Anjiolipom</p> <p>9 -Granüler hücreli tümör</p> <p>10 -Nörofibrom</p> <p>11 -Schwannom</p> <p>12 -Anjiosarkom</p> <p>13 -Liposarkom</p> <p>14 -Rabdomyosarkom</p> <p>15 -Osteosarkom</p> <p>16 -Leiomyom</p> <p>17 -Leiomyosarkom</p> <p><b>Fibroepitelial Tümörler</b></p> <p>1 -Fibroadenom</p> <p>2 -Phylloides tümör *Benign *Borderline *Malign</p> <p>3 -Periduktal stromal sarkom, low grade</p> <p>4 -Meme hamartomu</p> <p><b>Meme Başı Tümörleri</b></p> <p>1 -Meme başı adenomu</p> <p>2 -Siringomatöz adenom</p> <p>3 -Meme başı Paget hastalığı</p> <p><b>Malign Lenfoma</b></p> <p>1 -Diffüz büyük B hücreli lenfoma</p> <p>2 -Burkitt lenfoma</p> <p>3 -Ekstranodal marjinal zon B hücreli lenfoma, MALT tip</p> <p>4 -Foliküler lenfoma</p> <p><b>Metastatik Tümörler</b></p> <p><b>Erkek Meme Tümörleri</b></p> <p>1 -Jinekomasti</p> <p>2 -Karsinom -İnvaziv -İn situ</p>
---	--	--

**Şekil 2.10.** Histolojik sınıflandırmaya göre meme kanseri türleri (Eble vd., 2003).

### 2.2.3.2. Moleküler sınıflandırma

Günümüzde meme kanserinin farklı histolojik ve biyolojik özelliklere sahip, klinik bulguları ve tedaviye olan yanıtları farklılık gösteren heterojen bir hastalık olduğu anlaşılmıştır (Eliyatkin vd., 2015). Moleküler tekniklerin ilerlemesi ile meme kanserinde moleküler sınıflandırma adı verilen yeni bir sınıflandırma gelişmeye başlamıştır (Eliyatkin vd., 2015). Moleküler sınıflandırma, 2000 yılında yaptıkları çalışmalar sonucu gen ifade analizlerinde farklılıklar bulmaları üzerine Perou ve Sorlie tarafından ortaya atılmıştır (Perou vd., 2000).

Moleküler sınıflandırmada meme kanseri tümörleri östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2/neu) ifade düzeylerine göre alt gruplara ayrılmıştır, bu gruplar: luminal A, luminal B, HER2 ve bazal-benzeridir (Reis-Filho ve Pusztai, 2011).

Meme kanserlerinin en sık görülen alt tipi lüminal A da ER ve PR ifade düzeyleri görülürken (ER+ ve PR+) HER2 ifade düzeyi oldukça düşüktür, lüminal B grubunda ise ER+ ve PR+ dir ve HER2 ifade düzeyi değişkendir (Sørliie vd., 2001). P53 geninde mutasyon sıklığı luminal A'da luminal B'ye göre daha çöktür (Sørliie vd., 2001). Diğer bir alt tip olan bazal-benzeri grubunda %95 ER(-), PR(-) ve HER2(-) (Triple negative) dir (Rouzier vd., 2005; Eliyatkin vd., 2015).

Meme kanserli hastaların yaklaşık %75'i lüminal A ve lüminal B, yaklaşık %15'i ise HER2 pozitifdir, geriye kalan yaklaşık %10'luk grup ise triple negatif hastalardır ve bu gruptaki hastalar hormon tedavisinden fayda göremezler, bu yüzden mortalitesi en fazla olan alt türdür (Güneş vd., 2012).

	Moleküler alt tip			
	Lüminal A	Lüminal B	HER2	Basal benzeri
Gen ekspresyon paterni	Lüminal sitokeratinlerin ekspresyonu ve hormon reseptörleri ve ilişkili genlerin ekspresyonu yüksek.	Lüminal sitokeratinlerin ekspresyonu ve hormon reseptörleri ve ilişkili genlerin ekspresyonu orta-düşük .	HER2 ekspresyonu yüksek, ER ve ilişkili genlerin ekspresyonu düşük.	Bazal epithelial genlerin ve bazal sitokeratinlerin ekspresyonları yüksek, ER ve ilişkili genlerin ekspresyonu düşük, HER2 ekspresyonu düşük.
Klinik ve biyolojik özellikleri	İnvaziv meme kanserlerinin yaklaşık %50 si ER/PR(+), HER2 (-)	İnvaziv meme kanserlerinin yaklaşık %20 si ER/PR(+), HER2 ekspresyonu değişken, Lüminal A dan daha çokproliferasyon,Lüminal A dan daha çok histolojik dereceli	İnvaziv meme kanserlerinin yaklaşık %15 i ER/PR(-), HER2 (+) yüksek proliferasyon, yaygın TP53 mutasyonu, yüksek histolojik derece ve nodal pozitiflik oranı.	İnvaziv meme kanserlerinin yaklaşık %15 i çoğu ER/PR(-), HER2 (-) (Triple negative. Yüksek proliferasyon, yaygın TP53 mutasyonu, BRCA1 disfonksiyonu.
Histolojik korelasyon	Tübüler karsinom, Kribriform karsinom, Düşük dereceli invaziv duktal karsinom, NOS Klasik lobüler karsinom.	invaziv duktal karsinom, NOS Mikropapiller karsinom.	Yüksek dereceli invaziv duktal karsinom, NOS	Yüksek dereceli invaziv duktal karsinom, NOS metaplastik karsinom, medüller karsinom.
Tedaviye verilen cevap ve hastalık seyri	Endokrin tedaviye cevap, kemoterapiye değişken cevap, iyi prognoz.	Endokrin tedaviye cevap (Tamoksifen veAromataz inhibitörleri). Lüminal A kadar iyi yanıt alınamayabilir, kemoterapiye değişken, prognoz lüminal A kadar iyi değil.	Trastuzumab'a cevap, Antrasiklin grubu kemoterapiye cevap, genellikle kötü prognoz.	Endokrin tedavi ya da Trastuzumab'a yanıt yok, Platinum grubu kemoterapiye ve PARP inhibitörlerine duyarlı, genellikle kötü prognoz.

**Şekil 2.11.** Meme kanserinin moleküler sınıflandırmaya göre alt türleri (Eliyatkin vd., 2015).

Moleküler alt tür	Yaygın histolojik tipler	Histolojik derece	ER durumu	HER2 durumu	Ki67	Özel İHK/ moleküler özellik
Lüminal A	Klasik, Lobüller, Tübüler, Kribriform.	1,2	+	-	düşük	Lüminal CK+, E-Kaderin +/-
Lüminal B	Mikropapiller	2,3	+/-	-/+	yüksek	Lüminal CK+, p53 mutasyonu
Bazal benzeri	Medüller, Metaplastik, Adenoid, Kistik, Sekretuar.	3	-	-	yüksek	Bazal CK+, p53 mutasyonu, DNA tamir kaybı, EGFR +/- mutasyonları
Mol.apokrin	Apokrin, Plemorfik, Lobüller.	2,3	-	-/+	yüksek	Androjen reseptörü +
Claudin-low	Metaplastik	3	-	-	yüksek	Kanser kök hücre benzeri, EMT benzeri, düşük E-Kaderin seviyesi.

**Şekil 2.12.** Meme kanseri özel alt tiplerinin histolojik ve moleküler özellikleri (Eliyatkin vd., 2015).

#### 2.2.4. Meme kanseri teşhisi ve tedavisi

Meme kanserinde tedavi, tanı sırasında yapılmalıdır ve doku örneğinden alınan biyopsi materyalinin patolojik değerlendirilmesi ile tanı konulmalıdır. Meme kanseri tedavi seçeneği çok olan bir hastalıktır. Hekimin, hastanın yaşına, kanserin evresine ve hormon duyarlılığına bakarak yapılacak olan tedaviye karar vermesi gerekmektedir.

##### 2.2.4.1. Meme kanseri teşhis yöntemleri

###### **Kendi kendine muayene**

Meme kanserinin erken teşhisinde klinik muayene ve mamografi ile birlikte ilk aşamalardan birisidir ve yaklaşık 50 yıldır uygulanmaktadır (Seçginli, 2011). Elle muayenenin meme kanseri mortalitesindeki azalmaya etkisi sınırlıdır (Semiglavov vd., 1993; Thomas vd., 2002). Kendi kendine muayenenin başlangıç evrelerde etkisi az olsa da ara evrelerde oldukça etkili olduğu görülmektedir (Lechner vd., 2004).

### **Klinik meme muayenesi**

Klinik meme muayenesi uzun yıllardır kullanılan erken teşhis için önerilen bir yöntemdir fakat mortaliteye etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır (Seçginli, 2011). Mamografi ile birlikte yapılan klinik meme muayenesinin hata oranını azaltabileceği belirtilmiştir (Park vd., 2000).

### **Mamografi**

Mamografi X ışınları kullanılarak çekilen özel bir röntgendir (ASM,2019). Erken tanıda en sık kullanılan ve en etkili görüntüleme yöntemlerinden birisidir ayrıca seçiciliği ve duyarlılığı da oldukça yüksektir (Seçginli, 2011). Mamografi ile taramanın 50 yaş ve üzeri kadınlarda mortaliteyi %20-30 azalttığı görülmüştür (Berns vd., 1992).

### **Dijital Mamografi**

Mamografi ile prensibi aynıdır. Daha düşük dozda X ışını kullanarak daha az hatalı sonuçlar elde edilir (ASM,2019).

### **Meme Ultrasonografisi**

Mamografide dokuların üst üste geldiği durumlarda görülemeyecek kitleleri tespit edebilir. Radyasyon içermediği için genç kadınlarda öncelikle tercih edilir (ASM,2019).

### **Manyetik Rezonans Görüntüleme**

Dev mıknatıslarla manyetik alan oluşturarak belirli yapıları ayırt edebilen bir tıbbi tekniktir. Radyasyon içermez, vücuttaki anormal yapıları tespit etmek için kullanılır (ASM,2019).

### **Biyopsi**

Görüntüleme sonucunda şüpheli bir lezyon tespit edilmesi durumunda cerrahi yöntemlerle parça alınmasıdır (ASM,2019). Biyopsi sonucuna göre tümörün benign yada malign olduğuna karar verilir.

### **PET/CT**

Pozitron emisyon tomografisi (PET) ve bilgisayar tomografisi (CT) birleştirilerek ileri teknoloji görüntüleme sağlanır ve kanser tanısında kullanılır (MEMORIAL, 2019). Meme kanserinin erken tanısında oldukça önemli bir tekniktir.



#### **2.2.4.2. Meme kanseri tedavi yöntemleri**

Meme kanserinin teşhisiyle birlikte kanserin evreleri de dikkate alınarak tedavisi başlar. Örneğin erken evre meme kanserli hastalarda tümör boyutu, grade, lenf nodu, *ER/PR* ve *HER2* ifade düzeyi gibi primer tümör özelliklerine bakılarak radyoterapi yada primer cerrahi yapılır (Gradishar vd., 2016)

#### **Cerrahi operasyon**

Meme kanserinin tedavisinde meme korunamayacak evrede ise metastazını önlemek amacı ile tümör kitlesi çıkartılır ya da memenin tamamı alınır (Senkus vd., 2015). Pek çok çalışma evre I ve II de olan meme kanserli kadınlarda mastektominin sağ kalım açısından meme koruyucu tedaviye eşdeğer olduğunu göstermiştir (Gradishar vd., 2016). Geniş lokal eksizyon geçiren hastalarda daha iyi kozmesis elde edebilmek için meme cerrahları onkoplastik yaklaşımlar uygulamak üzere eğitilmektedir (Senkus vd., 2015).

#### **Kemoterapi**

Kanser hastalarında kullanılan ilaç tedavisidir. Cerrahi girişimlerin öncesinde ve sonrasında verilmesine göre; neoadjuvan kemoterapi ve adjuvan kemoterapi olarak adlandırılır. Meme kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçlarından bazıları şunlardır: Doxorubicin, Epirubicin, Paclitaxel, Docetaxel, Cyclophosphamide. Meme kanserinin ileri evrelerinde kemoterapi ilaçlarının etkinliği azalabilir bu gibi durumlarda ek ilaçlar gereklidir (Maricic, 2006). Bazı meme kanserli hastalarda daha iyi yanıt almak için kombinasyon terapisi yapılmaktadır. Mono terapi yerine kombinasyon terapisi halen tartışılan bir konudur (Miles vd., 2002). Kombinasyon tedavilerinde toplam yanıt daha fazla olsa da kişiyi aşırı toksisiteye maruz bırakmaktadır (O'Shaughnessy, 2005).

#### **Radyoterapi**

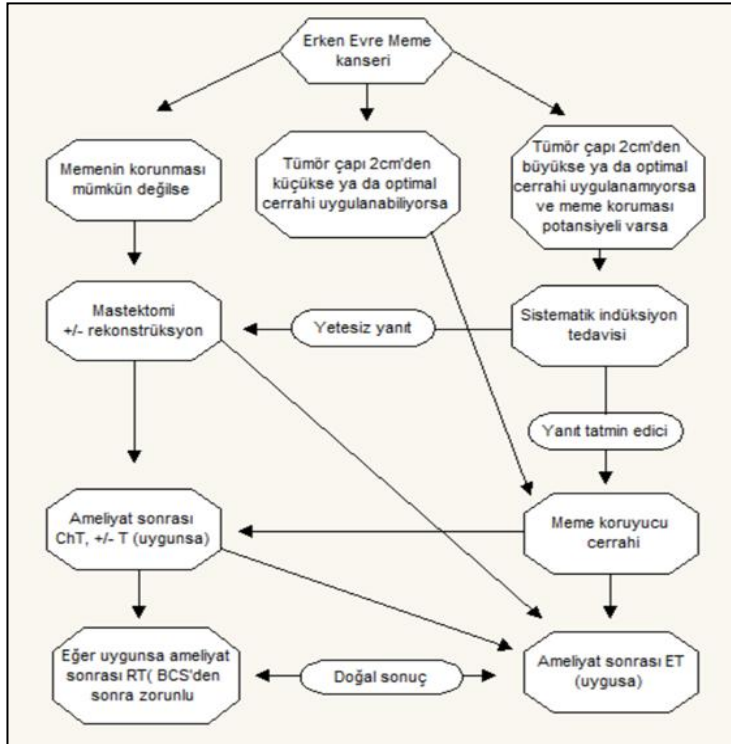
Radyoterapi, kanser hücrelerinin radyoaktif ışınlarla yok edilmesidir. Radyasyon tedavisi öncesi planlama yapmak çok önemlidir. Planlama yaparken hedefin hacmi, risk altındaki komşu dokular, normal dokunun korunması gibi hususlar dikkate alınmalıdır (Gradishar vd., 2016).

## Hormon tedavisi

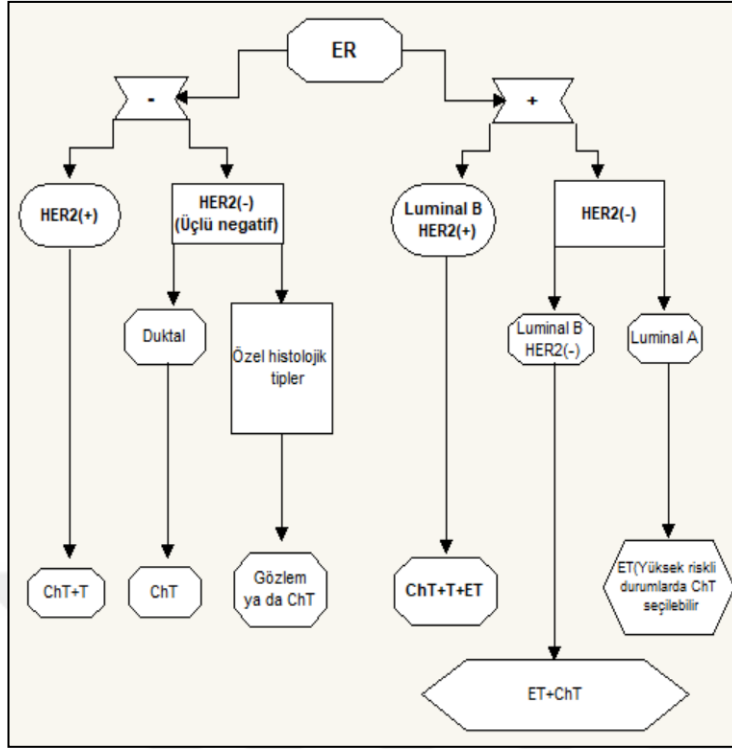
Bazı meme kanseri türlerinde östrojen reseptörleri (ER) ve progesteron reseptörleri (PR) aşırı-eksprese olmaktadır. Bu hormonları baskılamak için hastalara hormon ilaçları verilmektedir. Meme kanseri vakalarında yaklaşık %75'inde östrojen reseptör seviyesinde artış görülmüştür (Dowsett, 2001). Giuliano (2009) ve arkadaşları adjuvan hormonal tedavinin kanser hastalarında mortaliteyi azalttığını bildirmişlerdir. Güçlü ve seçici östrojen modülatörü olan Tamoksifen, premenopozal hastalarda en çok kullanılan hormon ilacıdır (Giuliano, 2009). Ayrıca Tamoksifen'in mortaliteyi azalttığı bildirilmiştir (Vogel vd., 2006).

## Hedefe yönelik tedavi

Hedefe yönelik tedavilerde monoklonal antikolar kullanılır. Meme kanseri tedavisinde kullanılan monoklonal antikolardan bir tanesi de Trastuzumab (Herceptin®)'dir (Ross vd., 2004). İnvaziv meme kanserli hastaların yaklaşık %25'inde HER2 aşırı-ekspresedir ve Trastuzumab HER2'yi hedef alan monoklonal antikordur (Ross vd., 2004). Trastuzumab ile tedavi HER2 protein seviyesi yüksek olan hastalara uygulanır (Huston ve George, 2001)



**Şekil 2.13.** Erken evre meme kanseri tedavi algoritması (Senkus vd., 2015).



**Şekil 2.14.** Biyomarker ifade düzeylerine göre neo-adjuvan tedavi yaklaşımı (Senkus vd., 2015)

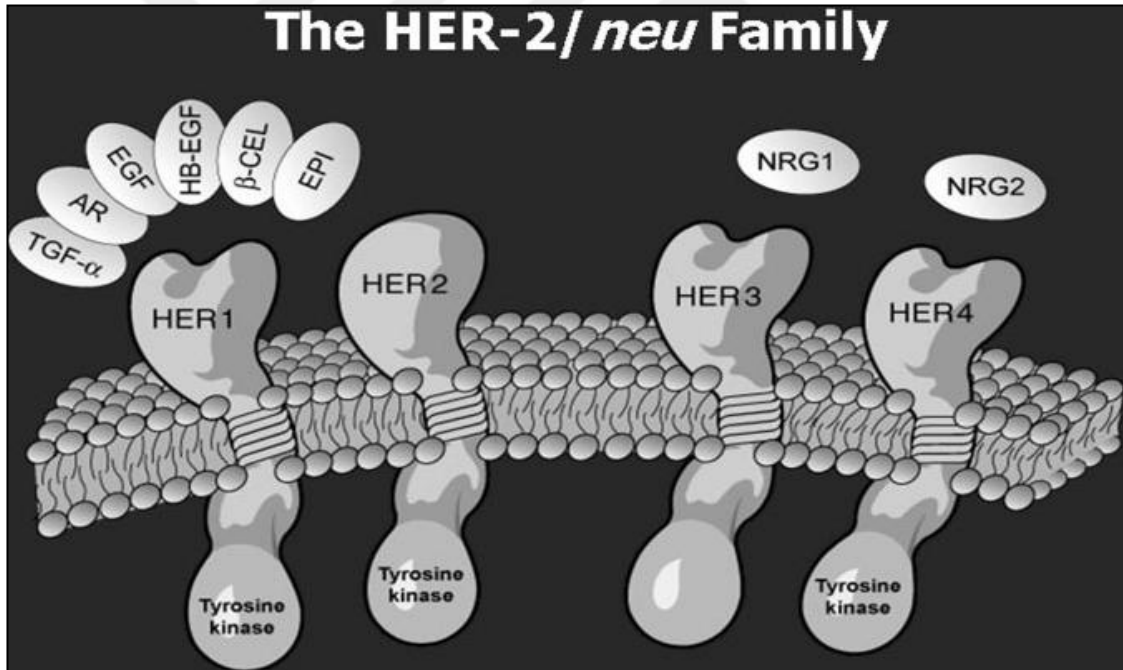
Kadınlarda meme kanseri risk faktörünün hesaplanması ile gelecekte meme kanserine yakalanma ihtimali tespit edilebilir, böylece yüksek risk taşıyan grup için risk azaltıcı tedaviler uygulanabilir. BRCA 1 ve 2 öyküsü, meme kanseri veya over kanseri olan birinci derece yakını olması, daha öncesinde toraks bölgesine radyoterapi almış olması, atipik hiperplazi varlığı gibi durumlarda birey yüksek risk grubundadır (Koçak vd., 2011). Yüksek risk grubunda bulunan kadınlar için risk azaltıcı yaklaşımlar ise yaşam biçiminde değişiklik yapma, tarama, kemaprevansiyon ve cerrahi yöntemlerdir (Koçak vd., 2011).

### 2.3. HER2 Reseptörü

Bir membran reseptörü olan İnsan Epidermal Büyüme Faktörü-2 (HER2 veya ErbB-2), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ailesinin bir üyesidir. EGFR ailesinin üyeleri: HER1 (erb-B1 yada EGFR), HER2 (erb-B2), HER3 (erb-B3) ve HER4 (erb-B4)'dür ve HER1, HER2, HER4 Tirozin kinaz aktivasyonu gösterir (Lupu vd., 1995; Ross ve Fletcher, 1998; Navolanic vd., 2003). HER2 protoonkogeni tarafından, transmembran HER2 proteini kodlanır ve hematopoetik kaynaklı olanlar hariç pek çok

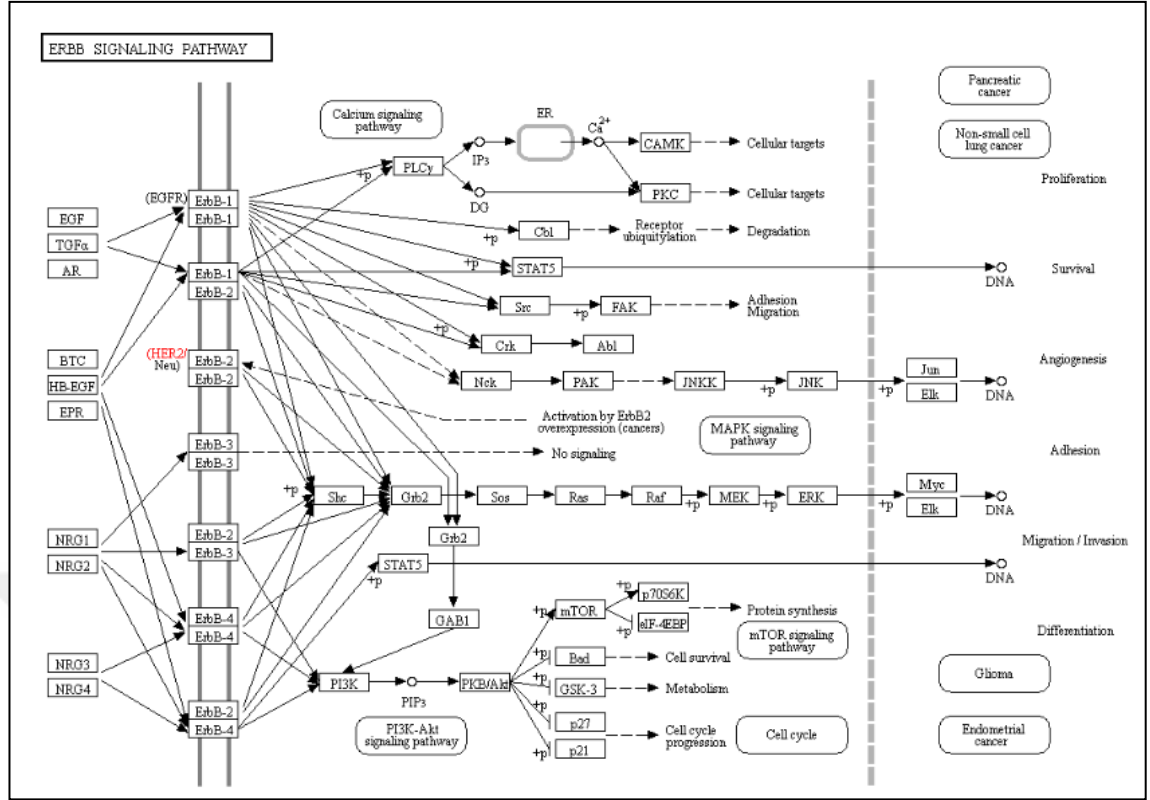
hücrede ifadesi vardır fakat bazı kanser hastalarında ifade düzeyi oldukça yüksek olabilmektedir (Hynes ve Stern, 1994; Yarden, 2001). İnvaziv meme kanseri olan hastaların %20 ila %30 kadarında HER2'nin yüksek ifade düzeyi görülmektedir (Hudis, 2007). Kromozom 17q'da lokalize olmuş ve 32 ekzonu olan HER2 literatürde pek çok isimle anılır, bu isimler: C-erbB-2, NEU, NGL, HER2, TKR1, CD340, MLN 19 'dur (NCBI, 2019).

Bu reseptör ailesinin her birisinin trans membran bölge, sitoplazmik bölge (Tirozin kinaz aktivitesi gösterir) ve ekstra selüler bölge (Ligant bağlanır) olmak üzere üç bölgeleri vardır (Normanno vd., 2005). EGFR gen ailesindeki üyelerden HER1, HER3 ve HER4 proteinlerinin ligandları vardır, fakat HER2'ye tanımlanmış herhangi bir ligand bulunmamaktadır (Lupu vd., 1995). Ayrıca bu dört üyeden HER3'ün tirozin kinaz aktivasyonu yoktur (Ross vd., 2004).



Şekil 2.15. HER reseptörlerinin yapısı ve ligantları (Ross vd., 2004).

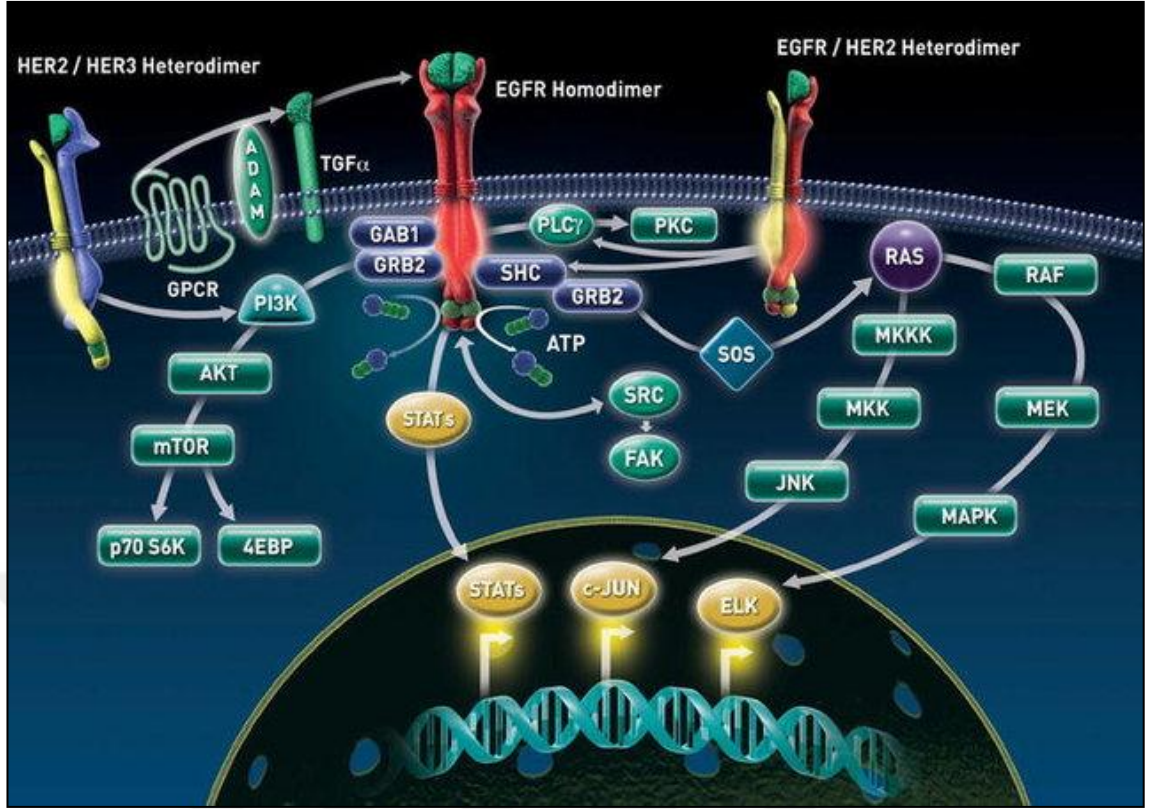
EGFR üyeleri homodimerizasyon ya da heterodimerizasyon yoluyla tirozin kinaz fosforilasyonuna yol açarlar ve sinyal iletimine aracılık ederler (Graus-Porta vd., 1997). Sinyal iletiminin sonucunda MAPK, PI3K/Akt, STAT, PLC-  $\gamma$ , JAC yolları aktif hale gelir ve hücre; çoğalma, hayatta kalma, yapışma, hareket kabiliyeti gibi faaliyetler kazanır (Ross vd., 2004).



Şekil 2.16. ERBB sinyal yolağı (KEGG, 2019).

Meme kanserini etkileyecek birçok prognostik faktör vardır ve bunlardan biriside HER2'dir. HER2'nin amplifikasyonunun, meme kanserinde kötü prognozla ilişkili olduğunu ilk gösteren kişi Slamon ve arkadaşlarıdır (Slamon vd., 1987).

HER2 dimerizasyonu sonucunda, intraselüler bölgedeki tirozin rezüdüleri fosforillenenek PI3-K'yı aktive eder ve PI3-K da Akt enzimini posforilleyerek aktive olmasını sağlar, böylece hücre hayatta kalma faaliyetlerini sürdürür. Buna paralel olarak bir guanin nükleotit değişim faktörü olan SOS sinyali, RAS'ı aktive eder, ardından sırasıyla RAF, MEK ve MAPK aktive olur ve hücre proliferasyonu devam eder (Hudis, 2007).



**Şekil 2.17.** HER2 dimerizasyonu sonucunda aktif hale gelen PI3-K/Akt ve MAPK sinyal yolları ve gerçekleşen hücresel faaliyetler (Lilleby vd., 2011).

### 2.3.1. HER2'nin yüksek ifade düzeylerini hedef alan tedavi yaklaşımları

HER2 geni yüksek ifade düzeylerinin olduğu hastaların çoğunda sağ kalımın azaldığı ve tedavilerinde istenilen yanıtın alınmadığı gözlenmiştir. Bunun üzerine bilim insanları HER2'nin hedef alınmasının meme kanseri tedavisinde önemli bir strateji olarak görmüşlerdir (Hudis, 2007).

#### 2.3.1.1. Monoklonal antikorlar

Membran reseptörü HER2'yi bloke etmek için tasarlanmış monoklonal antijenlerdir. En sık kullanılan monoklonal antijenlerden bir tanesi Trastuzumab'dır.

#### 2.3.1.2. Heterodimerizasyonu bozan antikorlar

HER2, EGFR ailesinin ligand içermeyen bir üyesi olmasına rağmen ailenin diğer üyeleri ile heterodimerizasyon yaparak meme kanseri hücrelerini stimule edebilir (Graus-Porta vd., 1997). Örneğin Heregulin ligandı HER3'e bağlanır ve HER3 de

HER2 ile heterodimer oluşturarak proliferasyon ve maling ile ilgili sinyal yollarını aktive eder (Alimandi vd., 1995). Meme kanseri tedavisinde heterodimerizasyonu engelleyen 2C4 gibi ilaçlar bazı hastalarda kullanılmaktadır.

### **2.3.1.3. Tirozin kinaz inhibitörleri**

Tirozin kinaz hücrel aktivitelere önemli rol oynar ve HER2 de tirozin kinaz aktivitesine sahip olan transmembran reseptörüdür. Tirozin kinaz inhibitörleri kullanılarak tümör gelişimi önlenir (Chen vd., 2003). Emodin ve Kurkumin'in HER2 tirozin kinaz aktivitesini baskıladığı bildirilmiştir (Zhang vd., 1995; Hong vd., 1999). Diğer bilinen tirozin kinaz inhibitörleri ise şunlardır: OSI-774, ZD-1839, CI-1033, Lapatinib (Chen vd., 2003; Nahta vd., 2006).

Hücre içi tek zincirli antikolar, HER2 promotörünün transkripsiyon baskılayıcıları ve Antisens oligonükleotitler veya ribozimler, HER2 yüksek ifade düzeyini hedef alan ve geliştirilmeye çalışılan diğer çalışmalardır (Chen vd., 2003).

HER2'nin yüksek ifade düzeyi, normal hücrenin kontrol mekanizmasını bozar ve agresif tümör oluşumuna yol açabilir (Hung vd., 1986). HER2 nin HER ailesi içerisinde en güçlü dimerizasyon yaptığı üye HER3 dür (Yarden, 2001). HER2'nin yüksek ifade düzeyi HER2-HER-3 heterodimer sayısını artırır ve güçlü sinyaller oluşturur, sinyalizasyon sonucunda mitojeniklik artar. HER2-HER3 heterodimerinin sinyalizasyonunun engellenmesi için Trastuzumab gibi monoklonal antikolar kullanılabilir (Yarden, 2001).

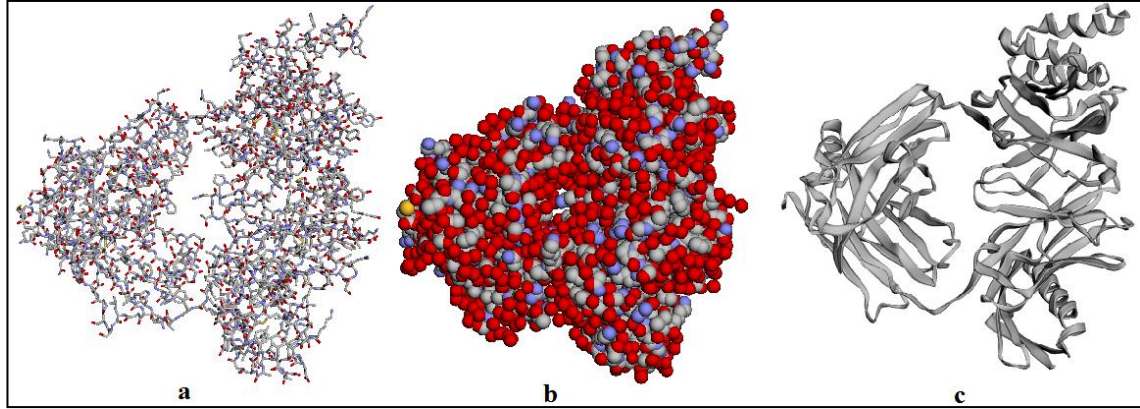
### **2.4. Trastuzumab (Herceptin®)**

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ancak sağlıklı hücre ile kanser hücrelerini ayırt edebildiğinde başarıya ulaşabilir. Kanser tedavisi üzerine çalışma yapan bilim insanları uzun yıllardır hedefe yönelik ilaçlar geliştirmeye çalışmışlardır. Benim çalışmamda kullandığım, ticari adı Herceptin olan Trastuzumab'da bu amaçla üretilmiş monoklonal antikordan birisidir. Trastuzumab 1998 yılında Food and Drug Administration (FDA) tarafından onay almış ve kullanımına başlanmıştır (Bedard vd., 2009).

**Tablo 2.5.** Trastuzumab'ın tarihsel gelişimi (Brufsky, 2010).

Yıl	Gelişme
1987	HER2'nin agresif kanserle ilişkili olduğu bulundu.
1990	HER2'ye karşı Trastuzumab geliştirildi.
1993	Trastuzumab'ın II. Evre meme kanseri çalışmaları başladı.
1997	Trastuzumab'ın III. Evre metastatik meme kanseri temel çalışmaları tamamlandı.
1998	HER2 tanısı geliştirildi.
2000	III. Evre adjuvan Trastuzumab denemeleri başladı.
2005	Adjuvan meme kanserinin verileri ASCO'da sunuldu.
2008	Trastuzumab temelli kombinasyon denemeleri yapıldı.

Trastuzumab invaziv meme kanseri hastaların yaklaşık %25'inde aşırı-eksprese olan ve HER2 proteininin ekstraselüler bölgesini hedef alan monoklonal antikordur (Carter vd., 1992; Nahta vd., 2006). Trastuzumab, HER2 reseptörünün ekstraselüler kısmına bağlanabilen iki antijen spesifik bölgeden oluşur ve IgG1 Fc yapısı içerir (Albanell vd., 1996; Spector ve Blackwell, 2009).



**Şekil 2.18.** Trastuzumab'ın molekül yapısını gösteren çubuk (a), küre (b) ve kurdele (c) diyaagramları (Cancer quest, 2019) .

#### 2.4.1. Trastuzumab'ın Etki Mekanizmaları

Trastuzumab, HER2 pozitif meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılsa da etki mekanizmaları tam olarak anlaşılammıştır (Valabrega vd., 2007). Yapılan çalışmalarla bazı etki mekanizmaları bulunmuş ve Trastuzumab'ın HER2'ye karşı hem ekstraselüler hem de intraselüler etkileri olduğu tespit edilmiştir.

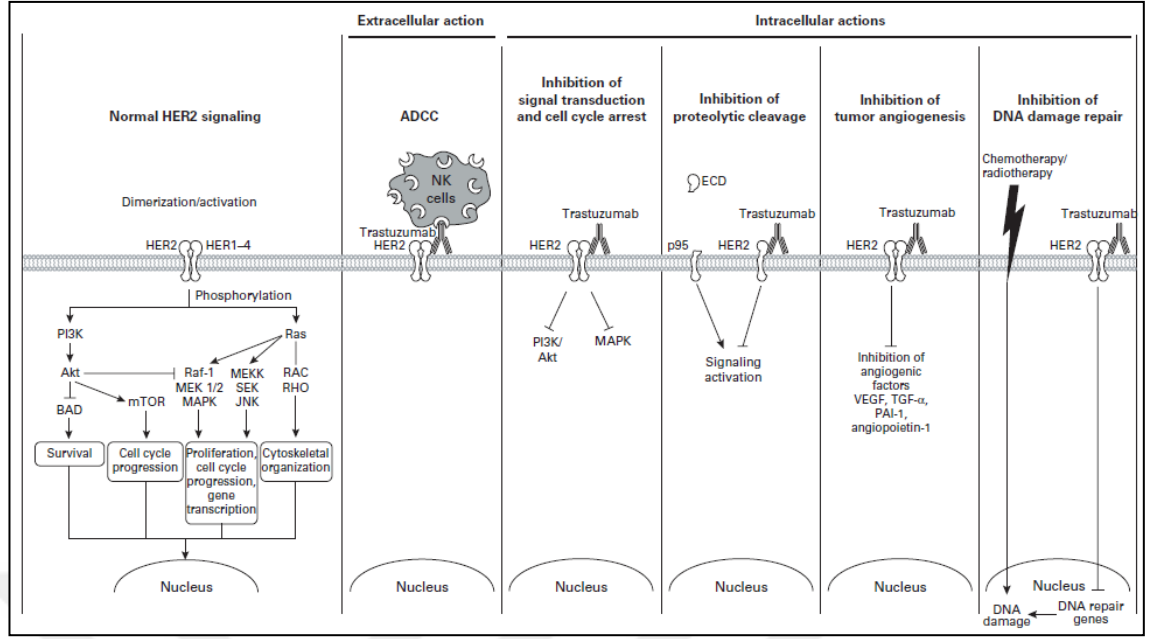


Dođal öldürücü özelliği olan immün efektör hücrelerdeki Fcγ alıcısı, hedef hücrenin antikoruna bağlı Fc kısmını tespit ettiği zaman immün efektör hücreler, hedef hücreye saldırır, Trastuzumab'ın ekstraselüler etki gösterdiği bu olaya antikor bağımlı hücrenel sitotoksisite (ADCC) adı verilir (Lazar vd., 2006; Spector ve Blackwell, 2009).

HER2'nin yüksek ifade düzeyi, normal hücre döngüsü proseslerini ve apoptozu düzenleyen proteinlerin işlevini bozar (Spector ve Blackwell, 2009). PI3K-Akt ve MAPK yolakları HER2 yüksek ifade düzeyi ile oldukça aktif hale gelir ve hücrenin çoğalması, hayatta kalması prosesleri çok iyi çalışır, ayrıca apoptoz inhibe olur (Neve vd., 2002; Xia vd., 2004). Yapılan bazı çalışmalarda Trastuzumab'ın HER2 aktivasyonunu inhibe ettiği, PI3K-Akt ve MAPK gibi sinyalizasyon moleküllerinin etkilerini ve apoptoz direncini azalttığı görülmüştür (Yakes vd., 2002; Asanuma vd., 2005).

Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörlerinin anjiyogenez ile tümörü desteklediği bilinmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda VEGF ve HER2'nin yüksek ifade düzeyi ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (Spector ve Blackwell, 2009). Klinik öncesi çalışmalarda, Trastuzumab'ın tümör vaskülatörünün normalleşmesine hatta gerilemesine sebep olmuştur (Izumi vd., 2002).

Kemoterapi ve Radyoterapi sonrasında kanser hücrelerinde DNA hasarı oluşur. Hücre DNA hasarını onarmak için P21/WAF1 proteinlerinin seviyesini artırır (Spector ve Blackwell, 2009). Trastuzumab'ın Cisplatin uygulandıktan 2-24 saat sonra P21/WAF1 ifadesini inhibe ederek DNA hasar onarımını önlediği görülmüştür (Pietras vd., 1998).



**Şekil 2.19.** Trastuzumab'ın HER2 pozitif meme kanserine etki mekanizması (Spector ve Blackwell, 2009).

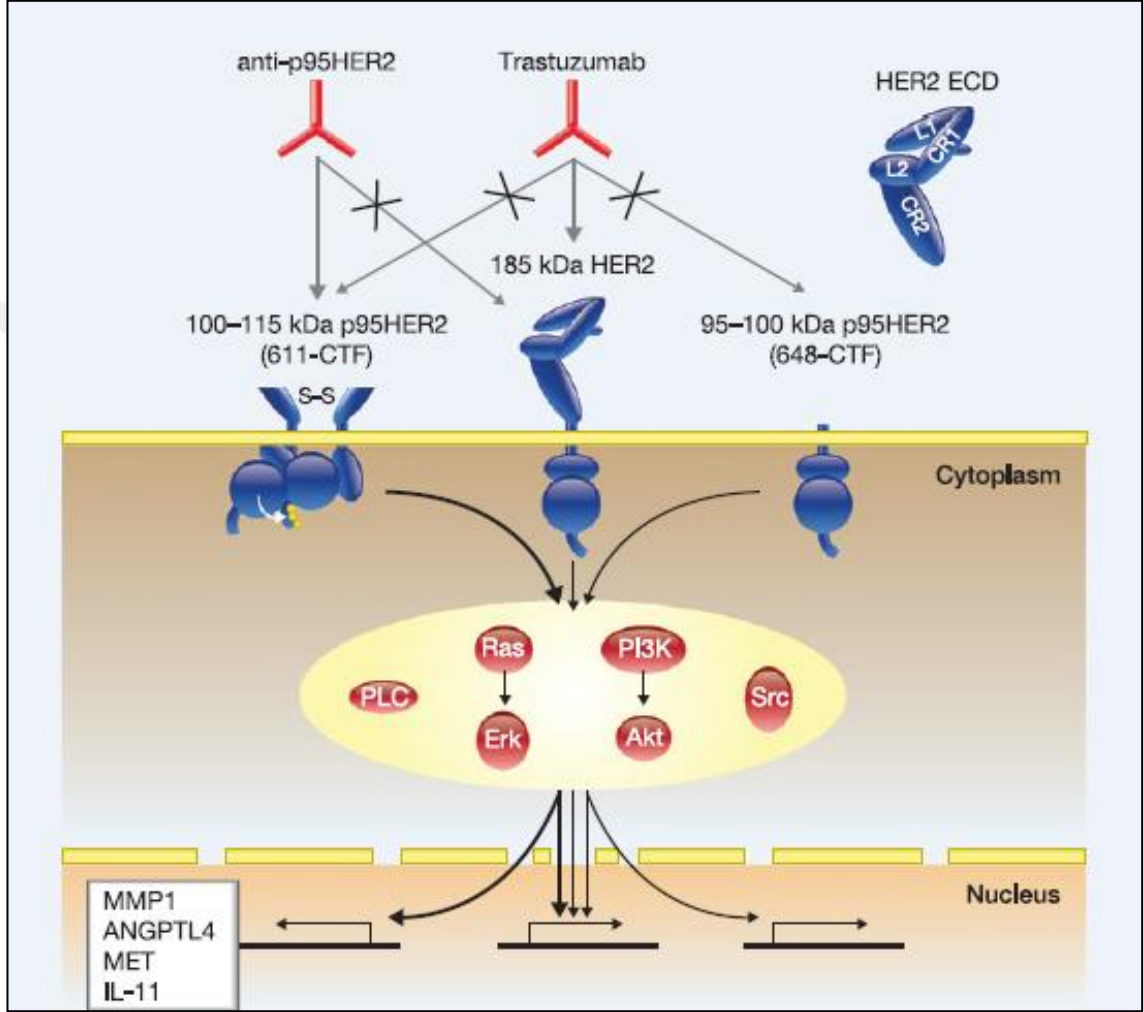
#### 2.4.2. Trastuzumab direnç mekanizmaları

Trastuzumab önemli klinik faydalar sağlamasına rağmen HER2 pozitif tümörlerin bir kısmı Trastuzumab'a karşı direnç kazanmaktadır (Nahta vd., 2006). Preklinik çalışmalar sonucunda Trastuzumab'a karşı bazı direnç mekanizmaları ortaya konulmuş ve bunlardan bazıları tedavinin daha etkili olması için klinik çalışmalarında kullanılmaktadır (Luque-Cabal vd., 2016).

##### 2.4.2.1. p95HER2

Trastuzumab'ın potansiyel direnç mekanizmalarından birtaneside HER2'nin ekstraselüler domainini (ECD) kaybetmesi sonucu oluşan ve p95HER2, CTF (HER2 COOH-terminal fragments) gibi isimlerle anılan trunkat HER2 dir (Scaltriti vd., 2007; Scaltriti vd., 2010). p95HER2'nin HER2 pozitif meme kanserinin %30'unda yüksek ifadesi gözlenmiş ve artan metastaz ile ilişkili olduğu görülmüştür (Molina vd., 2002; Sáez vd., 2006). p95HER2'nin HER2'ye göre daha agresif metastaz olmasını sebebi Trastuzumab'a spesifik bağlanma bölgesinin olmaması ve ECD'den yoksun olmasına rağmen Tirozin kinaz aktivitesini kaybetmemesidir (Codony-Servat vd., 1999; Pedersen vd., 2009; Scaltriti vd., 2010). p95HER2'nin 611-CTF (95-100kDa p95HER2)

ve 648-CTF (100-115kDa p95HER2) olmak üzere iki fragmanı vardır ve bu fragmanları meme kanserine etkileri farklıdır (Arribas vd., 2011; Sasso vd., 2011). 648-CTF dimer oluşturmazken, 611-CTF homodimer oluşturur. Bundan dolayı 611-CTF 'nin tirozin kinaz aktivasyonu daha fazladır (Pedersen vd., 2009).



**Şekil 2.20.** HER2, 95-100kDa p95HER2 ve 100-115kDa p95HER2'nin şematik gösterimi (Arribas vd., 2011).

#### 2.4.2.2. MUC4 ile HER2'nin maskelenmesi

Mucin-4 (MUC4), ASGP-1 ve ASGP-2 domainlerinden oluşan membran ilişkili glikoproteindir. MUC4, HER2'yi maskeleyerek Trastuzumab'ın bağlanmasını önler (Price-Schiavi vd., 2002). Nagy ve arkadaşlarının JIMT-1 hücre hattı ile yaptığı çalışma sonucunda MUC4 glikoproteininin, Trastuzumab'ın HER2'ye bağlanmasını önlediği

görülmüştür (Nagy vd., 2005). Ayrıca bu çalışmada maskelemenin, HER2'nin HER1 ve HER3 ile heterodimer oluşturma kabiliyetini de azalttığı gözlenmiştir (Nagy vd., 2005).

#### **2.4.2.3. PTEN ifadesinin azalması**

PTEN, hücre büyümesi, proliferasyon, migrasyon gibi çok sayıda hücrel faaliyetleri düzenlemede görev alan tümör supresör genlerden bir tanesidir. PTEN, PI3K/Akt sinyal yolunu inhibe ederek anti tümör aktivite gösterir (Parsons ve Simpson, 2003). Nagata ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *PTEN* geninin ifadesini azalttığı, PI3K/Akt sinyalini arttırdığını ve Trastuzumab'ın HER2 pozitif meme kanserine karşı etkinliğini bloke ettiğini göstermişlerdir (Nagata vd., 2004).

#### **2.4.2.4. p27 ifadesinin azalması**

Trastuzumab'ın HER2 aşırı-eksprese meme kanserine karşı etkisi kısmen, bir CDK2 inhibitörü olan p27 proteini üzerindeki etkilerine bağlıdır (Nahta vd., 2006). Trastuzumab'ın etki mekanizmalarından bir tanesi de p27'nin yarı ömrünü artırmasıdır (Le vd., 2003). p27, p27-CDK2 kompleksi oluşturarak hücrenin G1 fazına geçmesini sağlar ve apoptoza yol açar (Yakes vd., 2002). Trastuzumab dirençli meme kanseri hücrelerinde CDK2 aktivitesindeki artma ile p27 aktivitesi azaltılmaktadır (Nahta vd., 2004). Yapılan çalışmalar p27'nin Trastuzumab dirençli meme kanseri için önemli bir terapötik hedef potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (Nahta vd., 2004).

#### **2.4.2.5. IGF-1R ile alternatif sinyal iletimi**

Bazı HER2 pozitif meme kanseri hücreleri, insülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü (Insulin like growth factor-1 receptor, IGF-1R) ve diğer HER ailesi üyelerinden gelen sinyallerle de direnç oluşturabilmektedir (Spector ve Blackwell, 2009). IGF1R'ye ligand bağlanması, PI3K / Akt / mTOR ve MAPK gibi HER ailesi reseptörleriyle aynı yolları aktive eder (Surmacz, 2003). Hem HER2 hem de IGF-1R aşırı-eksprese hücreler Trastuzumab'a karşı dirençlidir çünkü hücre, *IGF-1R* geninin ifade düzeyinin azalmasına yanıt olarak p27 seviyesini azaltır (Lu vd., 2001; Lu vd., 2004; Nahta vd., 2004). Ayrıca prelinik çalışmalar, IGF-1R sinyalinin bozulması ile Trastuzumab

dirençli hücrelerin tekrar duyarlılık kazandığını göstermiştir (Lu vd., 2001; Nahta vd., 2005).

#### **2.4.2.6. c-Met RTK ile alternatif sinyal iletimi**

Birçok epitelyal tümör, HSG (Hepatosit büyüme faktörü) olan c-Met reseptörünü aşırı eksprese eder (Prat vd., 1991; Birchmeier vd., 2003). Meme kanserinde c-Met aşırı ifadesini, tümör ilerlemesi ve zayıf yaşamda kalma ile ilişkilidir (Lengyel vd., 2005). Yapılan prelinik çalışmalar *c-Met* yüksek ifadesinin *p27* aktivasyonunu inhibe edip *Akt* aktivasyonunu arttırarak Trastuzumab direncine yol açtığını göstermiştir (Shattuck vd., 2008).

#### **2.4.2.7. EGFR'nin diğer üyeleri ile alternatif sinyal iletimi**

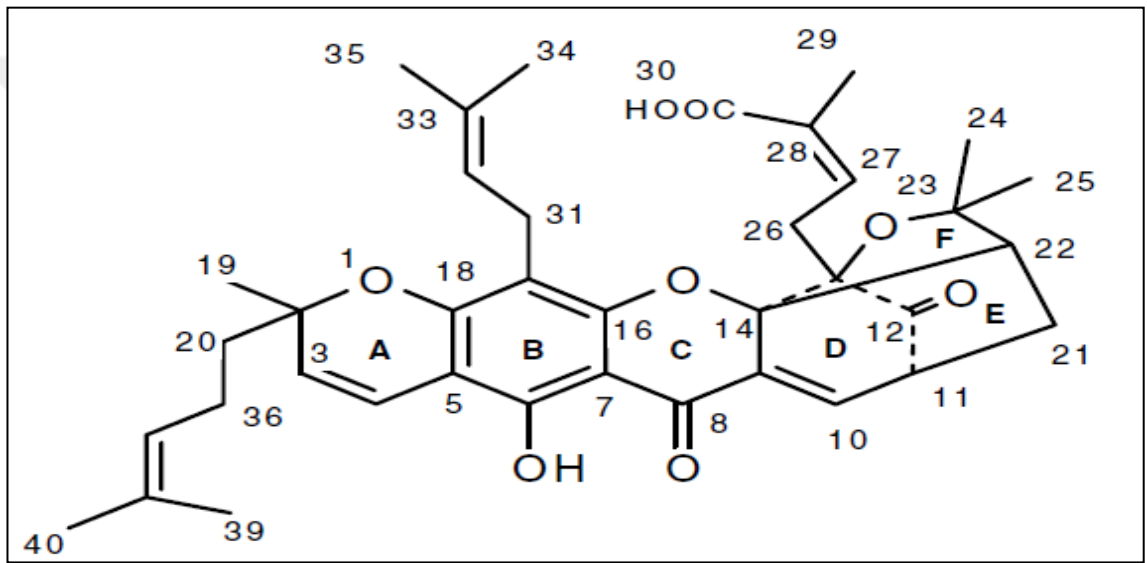
Yapılan bazı çalışmalarda Trastuzumab'a karşı direnç oluşturan meme kanseri hücrelerinde HER1-HER2 ve HER1-HER3 seviyelerinin arttığı gözlenmiştir (Ritter vd., 2007; Narayan vd., 2009). Trastuzumab, HER2'nin diğer EGFR ailesiyle dimerizasyonunu engelleyen Pertuzumab ile kombine edildiğinde anti tümör aktivitenin arttığı gözlemiştir (Scheuer vd., 2009; Yao vd., 2009).

### **2.5. Gambojik Asit**

Gamboge, Hindistan, Vietnam, Endonezya, Brezilya, batı ve orta Afrika'da yaygın olarak bulunan *Garcinia hanburryi* ağacından (*Guttiferae* ailesinin *arcinia* cinsi) salgılanan kahverengimsi turuncu, kuru bir reçinedir (Lin vd., 1993; Yu vd., 2006; Wang ve Chen, 2012). Detoksifikasyon, hemostaz ve parazitisit etkiye sahip olan Gamboge'nin geleneksel Çin tıbbın da soğuk, asidik, aserbik ve zehirli olduğu söylenmektedir (Liu vd., 2005). 1960'lar da gambojik asit, gamboge den ayrıştırılarak yapısı incelenmiş ve 1980'ler de molekül yapısı, in vitro anti tümör etkisi ve absorpsiyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Liu vd., 2005). Sonraki yıllarda gamboge ham etanol ekstraktının antikanser etkileri, toksisitesi ve fareler üzerinde emilimi, dağılımı ve atılımı üzerine çalışmalar yapılmıştır (Sun vd., 1983; Lei vd., 1985; Dong vd., 1988). 1990'lı yıllarda Gamboge'nin çeşitli bileşenleri incelenmiş ve 1996'da

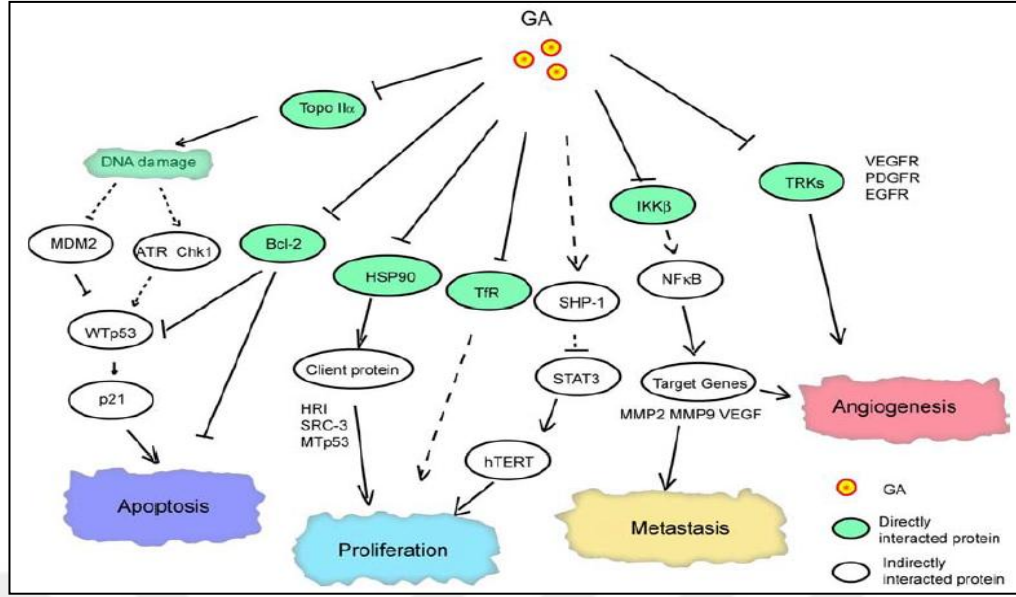
Japon bilim adamları tarafından içeriğindeki 11 bileşik tespit edilmiştir (Kong vd., 1995; Liu vd., 2005).

Gambojik asit (G), gamboge'nin ana aktif bileşimidir (Auterhoff vd., 1962; Ollis vd., 1965). Suda çözünmez fakat DMSO'da iyi çözünür. DMSO'nun hücrelere karşı toksik etkisi olduğu için çalışmalarda seyreltilerek kullanılır. Kansere ilgili pek çok araştırmada kullanılmış olan gambojik asitin mide kanseri, akciğer kanseri, prostat kanseri, melanom, hepatokarsinom ve meme kanseri gibi farklı kanser tiplerinin büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Yi vd., 2008; Gu vd., 2009).



**Şekil 2.21.** Gambojik asit'in (C<sub>38</sub>H<sub>44</sub>O<sub>8</sub>, MA: 628,75 Da) molekül yapısı (Yu vd., 2006).

Yapılan araştırmalarda gambojik asitin: Pek çok kanser türünde apoptozu indüklediği, proliferasyonu ve anjiyogenezi inhibe ettiği, p53'ü indükleyerek mutant p53'ü degrade ettiği, İnsan telomeraz enzimini inhibe ettiği, Bcl-2 protein ailesinin ifade düzeylerini azalttığı, PDGF ve EGF yollarını ve metastaz sinyalini inhibe ettiği bildirilmiştir (Wang ve Chen, 2012).



**Şekil 2.22.** Gambojik asit'in dahil olduğu hücresel sinyal yolağı. (Wang ve Chen, 2012).

Li ve arkadaşlarının MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattı üzerinde yaptıkları çalışmada G'nin hücre büyümesini inhibe ettiğini ve aynı çalışmada 1,5-3 ve 6µM konsantrasyonlarda uygulanan G'nin apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. Ayrıca yaptıkları çalışmada G'nin reaktif oksijen miktarı birikimi ve mitokondriyal apoptotik yolak vasıtasıyla hücreyi apoptoza sürüklediğini bildirmişlerdir (Li vd., 2012).

Yaptıkları bir çalışmada Qi ve arkadaşları, invaziv meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-435'e 1,2µM konsantrasyonda uygulanan G'nin hücre hattının invazyonunu %67,4 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir (Qi vd., 2008).

Gu ve arkadaşlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde yaptıkları çalışma, G'nin p53 vasıtasıyla Bcl-2 ifadesini azaltarak apoptozu indüklediğini göstermiştir (Gu vd., 2009).

Chen ve arkadaşlarının MCF-7 hücre hattı üzerine yaptıkları çalışmada G'nin, mikrotübüllerin depolimerizasyonunda ve JNK1 ile P38'in fosforilasyon seviyelerinde artışa sebep olduğunu gösterdiler. Ayrıca bu sonuca dayanarak apoptozun p38 ya da JNK1 ile de bağlantılı olabileceğini öne sürdüler (Chen vd., 2008).

Wang ve arkadaşları, GA ve Doxorubicin kombinasyonunu MCF-7 hücre hattı üzerinde denemişler ve apoptozis de artış olduğunu bildirmişlerdir (Wang vd., 2015).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

Tez çalışmalarında MDA-MB-453 HER2 pozitif meme kanseri hücre hattı üzerinde Trastuzumab'ın ve gambojik asit'in ayrı ayrı ve sinerjik etkileri incelenmiş olup, tezle ilgili tüm deneysel çalışmalar Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezinde ve Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Hücre Hattı

Tez kapsamında kullanılan MDA-MB-453 hücre hattı HER2 (+) olup ATCC'den ticari olarak satın alınmıştır.

##### 3.1.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

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



### 3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Trastuzumab	: Herceptin, Roche, 150mg
Gambojik asit (5 mg)	: Abcam Lot:GR196920-5
Dulbeco's Modified Eagle's (500ml)	: Biological Industries, REF 01-055-1A
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	: Biowest, Cat no:L0615-500
Fetal Bovine Serum (500ml)	: Panbiotech, Cat no: P30-3304
L-Glutamine Solution	: 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
Human caspase-9 ELISA Kit	: Sinogeneclon REF: SG-10400
Human BAX ELISA Kit	: Sinogeneclon REF: SG-00084
Human HER2 ELISA Kit	: Sinogeneclon REF: SG-10758
RT-qPCR Kit	: Qiagen SYBR Green PCR Master Mix
RNA izolasyon Kiti	: Axyprep Multisource Total RNA Miniprep Kit
cDNA sentez kiti	: Thermofisher High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit
Lizis tamponu	: 150mM NaCl, % 1 Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH: 8.0, 0.2 mM PMSF

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Hücre kültürü çalışmaları

#### 3.2.1.1. Besiyerlerinin hazırlanması

Çalışmada kullanılan MDA-MB-453 hücre hattı için besiyeri olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanıldı. 500 ml DMEM içerisine 10/ml

penislin streptomisin, 5 ml L-glutamin ve 50 ml Fetal bovine serum (FBS) eklenerek hazırlanan besiyeri ile hücre kültürü çalışmaları yapıldı.

Hücre kültür çalışmaları laminar kabinde yapıldı. Kabin her kullanımdan önce ve sonra mutlaka ultraviyole ışın ile steril hale getirildi ve kabinin iç yüzeyi çalışma öncesi ve sonrası %70'lik etanol ile silindi.

### **3.2.1.2.Hücre hattının pasajlanması**

Çalışmada kullanılan MDA-MB4-453 hücre hattı daha önce hazırlanan besiyerinde, 75 cm<sup>2</sup> 'lik flask içerisinde karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon koşulları % 95 nem, % 5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C'ye ayarlandı. İnkübatörün nemli ve steril kalması için otoklavlanarak steril hale getirilmiş saf su içerisine %1 oranında Aquaguard-1 ilave edilerek hazırlanan çözelti inkübatörün içerisindeki hazneye dolduruldu.

İnkübasyonda bulunan hücre hattının besiyeri önce bir gün sonra ardından iki ya da üç gün sonra değiştirildi. Besiyerinin değiştirilmesi işlemi: Flasktaki besiyerinin çekilmesi, ardından flasktaki hücrelerin yaklaşık 5 ml steril fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkanması, yıkama işleminin ardından PBS'nin tekrar çekilerek alınması ve son olarak 8 ml taze besiyerinin eklenmesi suretiyle gerçekleştirildi. Besiyeri değiştirme işlemleri, hücrelerin flask yüzeyinin yaklaşık % 90'ını kaplayana kadar devam ettirildi.

Işık mikroskopunda, MDA-MB-453 hücre hattının yaklaşık bir haftada 75 cm<sup>2</sup> 'lik flaskın yüzeyinin %90'lık kısmını kapladığı görüldü ve pasajlama işlemine başlandı. Pasajlanacak olan hücre hattı inkübatörden çıkartılarak steril kabine getirildi ve besiyeri otomatik pipet ile uzaklaştırıldı. Ardından hücreler 5 ml PBS ile yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra flaska, hücrelerin flask yüzeyinden sökülmesi için 6 ml Tripsin/EDTA (Biological Industries) solüsyonu ilave edilerek yaklaşık 5 dakika inkübe edildi. Beş dakika sonra flask inkübatörden alınarak ışık mikroskopunda incelendi ve hücrelerin sökülüp sökülmediği kontrol edildi. Tamamen flask yüzeyinden ayrılmış olan hücrelerin tripsinden zarar görmemesi ve tripsinin uzaklaştırılması için 24 ml besiyeri içeren 50 ml'lik falkon tüpe eklenerek 30 ml'ye seyreltildi ve 800xg de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından falkon tüp içerisindeki süpernatant

atıldı ve içerisine 12 ml besiyeri ekleyip pipetaj yapılarak hücreler homojenize hale getirildi. Daha sonra 12 ml'lik homojenat, üç ya da dört tane 75cm<sup>2</sup>'lik flasklara paylaştırıldı ve DMEM eklenerek her birinin hacmi 8 ml'ye tamamlandı. Pasajlama işlemi sonunda flasklar 37 °C'de ve %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübasyona bırakıldı.

### **3.2.1.3.Hücre hattı stoklarının oluşturulması**

Çalışmanın tekrarlanması, çalışmaya ara verilmesi ve ilerleyen zamanlarda aynı hücre hattı ile başka bir bilimsel çalışmada kullanılması amacıyla MDA-MB-453 hücre hattının dondurularak stokları oluşturuldu ve bu stok sıvı azot tankında muhafaza edildi.

Dondurulacak hücrelerin yer aldığı flasklar mikroskopla incelenerek doluluk oranı yaklaşık % 80 olanlar steril kabine alınarak besiyerleri uzaklaştırıldı. Flasklar 4 ml PBS ile yıkanarak içerisine 6 ml Tripsin/EDTA solüsyonu eklendi ve 5 dakika boyunca CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübasyon yapıldı. İnkübatörden alınan hücreler mikroskopta incelenerek sökülüp sökülmediği kontrol edildi. Hücrelerin sökülmesi işleminin akabinde 24 ml besiyeri içeren 50 ml'lik falkon tüpe eklenerek 30 ml'ye seyreltildi ve böylece Tripsin/EDTA solüsyonunun hücrelere etkisi tolere edilmiş oldu.50 ml'lik falkon tüpler 800 xg de 5 dakika santrifüj yapıldı ve hücrelerin çökmesi sağlandı. Santrifüj işleminin ardından falkon tüpler steril kabine getirilerek tüplerin içerisindeki süpernatant atıldı. Falkon tüplere hafifçe vurularak hücrelerin falkon yüzeyinden ayrılması sağlandı ve içerisine buz içerisinde bekletilmiş 900 µl FBS ve 100 µl DMSO eklenerek pipetaj yapıldı. Bu işlemin ardından oluşan 1 ml'lik sıvı hızlı bir şekilde 2 ml' lik kriyotüpe konularak sıvı azot tankının içerisine yerleştirildi.

### **3.2.1.4. Hücre çözme**

Çalışmamızda MDA-MB-453 hücre hattına ihtiyaç duyduğumuzda sıvı azotta bulunan stoklardan alınarak hücre çözme işlemi yapıldı.

DMEM, sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış su banyosuna konularak bekletildi. Stoktan hücre alınmadan önce sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış DMEM' den 30 ml alındı ve falkon tüpe konularak çözdürülecek hücrelerdeki DMSO'nun toksik etkisini tolere etmek üzere hazırda bekletildi.

Stoktan alınan MDA-MB-453 hücre hattı 37 °C' ye ayarlanmış su banyosuna konularak hızlıca çözdürüldü ve steril kabine alındı. Steril kabinde bulunan önceden hazırladığımız falkon tüpte bulunan 30 ml DMEM içerisine aktarıldı. Aktarma işleminin ardından falkon tüp 800 xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi ve süpernatant atılarak hücreler DMSO'dan arındırıldı. Falkon tüplere hafifçe vurularak hücrelerin falkon yüzeyinden ayrılması sağlandı. Falkon tüp içerisine 8 ml DMEM eklenerek pipetaj yapıldı ve T75'lik flaska aktarıldı. Flask 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub> şartlarına ayarlanmış inkübatöre konularak 24 saat bekletildi. 24 saat sonra flask mikroskopta incelenerek hücrelerin yapışıp yapışmadığına bakıldı. Hücrelerin flaskın tabanına yapışması canlı olduğunu, yapışmaması canlı olmadığını göstermektedir. Hücrelerin yapıştığı görüldüğünde PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi ve ardından taze besiyeri eklenerek tekrar inkübatöre konuldu. Hücreler flaskın yaklaşık %80'ini doldurana kadar iki günde bir yıkandı ve taze besiyeri eklendi.

Hücre çözdürme işleminden sonra geçen 24 saatin sonunda mikroskopla incelenen hücrelerin flaskın yüzeyine yapışmadığı görüldüğü takdirde çözdürme işlemi tekrarlandı.

### **3.2.1.5. Hücre sayımı**

Sitotoksisite, gen ifade analizi ve protein analizi çalışmalarında hücre sayımı işlemleri gerçekleştirildi. İnkübatörden alınan hücreler steril kabine alınarak otomatik pipet ile flask içerisindeki besiyeri çekilip atıldı ve 5 ml PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra hücreleri flask yüzeyinden sökmek için 6 ml Trypsin/EDTA solüsyonu eklenerek 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda flask alınarak mikroskop altında incelenerek hücrelerin sökülüp sökülmediği kontrol edilmiştir. Hücrelerin sökülmesi işleminin akabinde 24 ml besiyeri içeren 50 ml'lik falkon tüpe eklenerek 30 ml'ye seyreltildi ve böylece Trypsin/EDTA solüsyonunun hücrelere etkisi tolere edilmiş oldu. Falkon tüp 800 xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden çıkartılan falkon tüp steril kabine alınarak süpernatant atıldı ve içerisine 1 ml DMEM eklenerek pipetaj yapıldı. 1 ml' lik hücre homojenatından 20 µl alınarak Thoma lamına eklendi ve mikroskop altında hücre sayımı işlemi gerçekleştirildi. Sayma işlemi Thoma lamının her

iki tarafında da yapıldı ve ortalaması alındı. Hücre sayısını bulmak için şu formül kullanıldı:

$$\text{Hücre sayısı} = \text{sayılan hücre sayısı} \times \text{seyreltme faktörü} \times 10^4$$

### **3.2.2. Sitotoksite çalışmaları**

#### **3.2.2.1. Uygulanacak kimyasalların hazırlanması**

Trastuzumab (Herceptin; Roche, Basel, İsviçre)' dan 0,01 g tartılarak 2 ml DMEM içerisinde çözdürüldü ve 5000 µg/ml derişimde stok hazırlandı. Trastuzumab tüm çalışmalarda taze olarak hazırlandı.

5 mg Gamgojik asit (Abcam, USA) üzerine hacmi 5 ml oluncaya kadar DMSO eklenerek 1,6 mM' lık ana stok oluşturuldu. Ana stoktan 375 µl gambojik asit çözeltisi alınarak 11,625 ml besiyeri ile hacmi 12 ml' ye tamamlandı ve 12 ml ve 50 µM' lık stok oluşturuldu.

#### **3.2.2.2.Hücre canlılık testi**

Hücre canlılık testi için XTT kiti (Biological Industries) kullanıldı. XTT metodu Tetrazolium tuzunun turuncu renk veren formazana dönüşmesi ile canlı hücrelerin boyanması esasına dayanan bir yöntemdir. Oluşan Formazan 450 nm de maksimum absorbands vermektedir.

Çalışmalarımızda 96' lık plate kullanıldı. Her kuyucukta 200 µl DMEM ve 5000 hücre olacak şekilde 12, 24, 48, 72 saatlerde hücre canlılık testi yapmak üzere 4 tane plate' e hücre ekimi yapıldı. Plateler inkübatöre konularak bir gün yapışması için bekletildi. Bir gün sonunda Plateler inkübatörden alınarak PBS ile yıkandı ve her birine ilaç uygulaması yapıldı (Bkz. Tablo 3.1).

**Tablo 3.1.** Hürelere uygulanan kimyasallar ve konsantrasyonları.

<b>Kimyasal Madde</b>	<b>Trastuzumab (µg/ml)</b>	<b>Gambojik asit (µM)</b>	<b>T (µg/ml)+G (µM)</b>
	100	10	100+10
	50	5	50+5
	25	2,5	25+2,5
<b>Konsantrasyonlar</b>	12,5	1,25	12,5+1,25
	6,25	0,625	6,25+0,625
	3,125	0,3125	3,125+0,3125
	1,56	0,156	1,56+0,156

İlaç uygulamasından sonra 12, 24, 48 ve 72. Saatlerde platelerin 450 nm' de absorbansları ölçüldü ve hücre canlılık yüzdeleri hesaplandı.

### **3.2.3. Kombinasyon indeksinin hesaplanması**

Kombinasyon indeksi (CI), maddelerin sinerjik, antagonistik ya da aditif etkilerden hangisini gösterdiğini hatta etkinin derecesini anlamamızı sağlayan, bazı yazılım programlarıyla hesaplanan bir değerdir. Kombinasyon indeksi kavramı: Biyolog, Farmakolog ve kanser araştırmacısı olan Ting-Chao Chou tarafından bulunmuştur.

Çalışmamızda kombinasyon indeksi değerleri Compusyn programı ile hesaplandı. Elde edilen CI değerlerine bakılarak sinerjik etkinin en fazla olduğu konsantrasyonlar belirlenerek bu konsantrasyonlarda Trastuzumab ve gambojik asit' in protein ve gen düzeyinde etkisi incelendi

**Tablo 3.2.** Kombinasyon indeksi sonuçlarına göre, uygulanan kimyasalların hücre hattı üzerine sinerjik, aditif ya da antagonistik etkisi.

<b>Kombinasyon indeksi (CI)</b>	<b>Hücreye Etkisi</b>
CI = 1,1 – 1,2	Hafif Antagonistik etki
CI = 1,2 – 1,45	Orta Antagonistik etki
CI = 1,45 – 3,3	Antagonistik etki
CI = 3,3 - 10	Güçlü Antagonistik etki
CI > 10	Çok güçlü Antagonistik etki
CI = 0,9 – 1,1	Aditif etki
CI = 0,85 – 0,9	Hafif sinerjik etki
CI = 0,7 – 0,85	Orta sinerjik etki
CI= 0,3 – 0,7	sinerjik etki
CI = 0,1- 0,3	Güçlü sinerjik etki
CI < 0.1	Çok güçlü sinerjik etki

#### **3.2.4. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi**

Gen ifade analizleri için CI değerlerine bakılarak; en iyi sinerjik etkinin olduğu 24 saat inkübasyon süresi ve 50 µg/ml Trastuzumab, 5 µM gambojik asit kombinasyonu kullanılarak MDA-MB-453 hücre hatlarından RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Çalışmamızda dört ayrı steril petrinin her birisinin içerisine  $1,8 \times 10^6$  tane hücre ekildi ve petrilere bir gece inkübatörde bırakılarak hücrelerin yapışması sağlandı. Ardından hücreler PBS ile yıkanarak petrilere ilaç uygulaması yapıldı (Bkz. Tablo 3.3).

**Tablo 3.3.** RNA izolasyonu ve cDNA sentezi için petrilere uygulanan kimyasal maddeler ve derişimleri.

<b>Petri no</b>	<b>Trastuzumab</b>	<b>Gambojik asit</b>
1 (Kontrol)	Yok	Yok
2	50 µg/ml	Yok
3	Yok	5 µM
4	50 µg/ml	5 µM

İlaç uygulamasının ardından petriyeler 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 Saat'in sonunda hücreler petriyelerden alınarak 800 xg' de +4 °C'de 5 dakika santrifüjlenerek hemen buz içerisine alındı. RNA kompozisyonunun sabit kalması için hızlı bir şekilde her birine RNA later Reagent (Thermo Fisher) solüsyonu ilave edildi ve Total RNA saflaştırma kiti, Axyprep Multisource Total RNA Miniprep Kit (Axygen®) protokolü uygulanarak total RNA saflaştırıldı.

Saflaştırma işlemi şu şekilde gerçekleştirildi:

- Hücreler Tripsin/EDTA solüsyonu kullanılarak kaldırıldı ve kit içerisinde bulunan eppendorf tüpe konuldu.
- Eppendorf tüp +4 °C 2000 xg' de 5 dk santrifüj edildi.
- Üzerine 1 ml soğuk tampon konularak resüspanse edildi.
- Eppendorf tüp tekrar +4 °C 2000 xg' de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernetant hiç kalmayacak şekilde uzaklaştırıldı
- Tüm tüpler buza yerleştirildi.
- Her bir tüpe 400 µl R-I tamponu eklendi ve 10 defa pipetaj yapıldı.
- 1 ml 21 gauj'luk enjektörün ucu Z şeklinde bükülerek 10 defa pipetaj yapıldı.
- 150 µl R-II tamponu eklenerek her bir tüp 30 saniye vortekslendi.
- Tüpler +22 °C ve 12000 xg' de 5 dk santrifüj yapıldı. Bu işlem sonunda protein ve DNA peletleri dibe çöktü.
- Süpernetant yeni bir Eppendorf tüpe alındı.
- 250 µl 2-Propanol eklenerek 10 saniye vortekslendi.
- Spin kolonu 2 ml' lik Eppendorf tüpe yerleştirildi.
- Yaklaşık 800 µl homojenat spin kolonuna aktarıldı.
- +4 °C 6000 xg' de 1 dk santrifüj edildi.
- Eppendorf tüp'te toplanan sıvı döküldü.
- 500 µl W1A tamponu eklenerek +4 °C 12000 xg' de 1 dk santrifüj edildi.
- Altta biriken sıvı dökülerek tekrar takıldı.
- 700 µl W2 tamponu eklenerek +4 °C 12000 xg' de 1 dk santrifüj edildi.
- Altta biriken sıvı dökülerek tekrar takıldı.
- +4 °C 12000 xg' de 1 dk santrifüj edildi.
- Spin kolonu 1,5 ml'lik yeni Eppendorf tüpe takıldı.



- 100 µl TE tamponu eklenerek 1dk inkübe edildi.
- Oda sıcaklığında 12000 xg'de 1 dk santrifüj edilerek saflaştırma işlemi tamamlandı.

Saflaştırma işleminin ardından High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit içerisinde yer alan protokole göre cDNA sentezi gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA'lar RT-qPCR çalışmasında kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

### 3.2.5. Total RNA ve cDNA konsantrasyonunun ve saflığının belirlenmesi

Biotek marka ELISA cihazına ait Epoch mikro plate kullanarak RNA ve DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı belirlendi. Take-3 mikro hacim okuyucu ile bütün numuneler iki tekrar yapılarak 260 nm, 280 nm ve 320 nm dalga boylarında köre karşı okundu. RNA ve DNA'nın konsantrasyonları 260 nm'deki absorbans değerleri (OD<sub>260</sub>) kullanılarak;

RNA konsantrasyonu (ng/µl) = OD<sub>260</sub> x 40 x Seyreltme faktörü

DNA konsantrasyonu (ng/µl) = OD<sub>260</sub> x 50 x Seyreltme faktörü

formülleri ile hesaplandı.

Ayrıca 280 nm'de tespit edilen absorbans değeri ile protein safsızlıkları ve 320 nm'de elde edilen absorbans değeri ile partikül varlığı değerlendirildi.

Saf RNA; OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub> ≥ 2,0, Saf DNA; OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub> = ~ 1,8 skalaları yardımıyla saflıkları değerlendirilmiştir

### 3.2.6. RT-qPCR ile gen ifade düzeylerinin belirlenmesi

Çalışmamızda MDA-MB-453 hücrelerinin *HER2*, *BAX*, *caspaz-9* ve *GAPDH* gen ifade düzeyleri belirlenmiştir. CI değerinin en düşük olduğu (sinerjik etkinin en fazla olduğu) 24 saat inkübasyon süresi ve 50 µg/ml Trastuzumab, 5 µM gambojik asit kombinasyonu

kullanılarak MDA-MB-453 hücre hatlarından saflaştırılmış mRNA'dan sentezlenen cDNA'lar kullanılmıştır (Bkz. Tablo 3.3).

Primerler, Primer 3.0 programı kullanılarak tasarlandı ve Macrogen Inc. tarafından Tablo 3.4' de belirtilen sekanslara göre sentezlendi (5' ile 3').

**Tablo 3.4.** İfade düzeyleri belirlenecek genler ve primer dizileri.

Gen	Primer dizisi
<i>HER2</i>	forward: TTGTGGCCTTCTTTGAGTTCGGTG reverse: GGTGCCGGTTCAGGTACTCAGTCA
<i>caspase-9</i>	forward: CGAACTAACAGGCAAGCAGC reverse: ACCTCACCAAATCCTCCAGAAC
<i>BAX</i>	forward: CCTGTGCACCAAGGTGCCGGAAC reverse: CCACCCTGGTCTTGGATCCAGCCC
<i>GAPDH</i>	forward: CGAACTAACAGGCAAGCAGC reverse: TCGCCCCACTTGATTTTGG

RT-qPCR işlemi Tablo 3.5, Tablo 3.6, Tablo 3.7 ve Tablo 3.8' de belirtilen sıcaklık protokolüne göre SYBR Green Master Mix (Qiagen-330500) kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımının içeriği: 1 µl cDNA, 2 µl primer ve 12,5 µl SYBR Green Master Mix konularak hazırlandı. Tüm deneyler üç kez yapıldı (Qiagen Rotor Gene).

**Tablo 3.5.** *HER2* geni için RT-qPCR sıcaklık döngü protokolü.

Döngü Adı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	10 dk.	1
Denatürasyon	95 °C	30 sn.	
Bağlanma	59 °C	30 sn.	45
Uzama (Fluoresans tayin)	72 °C	45 sn.	
Bekleme	4 °C	∞	1

**Tablo 3.6.** *caspase-9* geni için RT-qPCR sıcaklık döngü protokolü.

Döngü Adı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	10 dk.	1
Denatürasyon	95 °C	15 sn.	
Bağlanma	60 °C	1dk.	45
Uzama (Fluoresans tayin)	72 °C	45 sn.	
Bekleme	4 °C	∞	1

**Tablo 3.7.** *BAX* geni için RT-qPCR sıcaklık döngü protokolü.

Döngü Adı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	10 dk.	1
Denatürasyon	95 °C	30 sn.	
Bağlanma	59 °C	30 sn.	45
Uzama (Fluoresans tayin)	72 °C	30 sn.	
Bekleme	4 °C	∞	1

**Tablo 3.8.** *GAPDH* geni için RT-qPCR sıcaklık döngü protokolü.

Döngü Adı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	10 dk.	1
Denatürasyon	95 °C	15 sn.	
Bağlanma	64 °C	30 sn.	45
Uzama (Fluoresans tayin)	72 °C	15 sn.	
Bekleme	4 °C	∞	1

### 3.2.7. İstatistiksel hesaplamalar

Gen ifade seviyelerinin primer normalizasyonu Livak ve Schmittgen' in geliştirdiği  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi ile gerçekleştirildi (Livak ve Schmittgen, 2001). Sekonder normalizasyon *HER2*, *BAX* ve *caspaz-9* genlerinin, *GAPDH* genin aynı olgudaki ifade düzeylerinin karşılaştırılması ile tespit edilmiştir.

### 3.2.8. Protein ekstraksiyonu

ELISA çalışmaları için CI değerlerine bakılarak en iyi sinerjik etkinin olduğu zaman ve konsantrasyon olan 24 saat inkübasyon süresi, 50 µg/ml Trastuzumab ve 5 µM gambojik asit' in kullanıldığı şartlarda total protein ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda dört ayrı steril petrinin her birisinin içerisine  $1,8 \times 10^6$  tane hücre ekildi ve petrilere 24 saat inkübatörde bırakılarak hücrelerin yapışması sağlandı. Ardından hücreler yıkanarak petrilere Tablo 3.4'de gösterildiği gibi ilaç uygulaması yapıldı.

**Tablo 3.9.** Protein ekstraksiyon işlemi için Petrilere uygulanan kimyasal maddeler ve derişimleri.

Petri no	Trastuzumab	Gambojik asit
1 (Kontrol)	Yok	Yok
2	50 µg/ml	Yok
3	Yok	5 µM
4	50 µg/ml	5 µM

İlaç uygulamasının ardından petrilere 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 Saat'in sonunda petrilere inkübatörden alınarak içerisine +4 °C' de PBS eklendi ve hücreler petri yüzeyinden scrapper ile kazınarak alındı. Yüzeyden sökülmiş olan hücreler falkon tüplere aktararak 800 xg ve +4 °C' de 10 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atılarak 1 ml PBS eklendi ve +4 °C' de 2000 xg'de 5 dk santrifüj yapıldı ve tekrar süpernatant atıldı. Hücre peleti üzerine Lizis tamponu eklenerek süspansiyon edildi. Uçunu Z şeklinde büküğümüz 21 gauj'luk enjektör ile on defa çek-bırak yaparak hücreler parçalandı. Parçalama işleminin ardından 2000 xg'de 10 dk süreyle santrifüj yapılarak içerisinde total protein olan süpernatant alındı ve ELISA çalışmalarında kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edildi.

### **3.2.9. ELISA ile protein düzeylerinin belirlenmesi**

Çalışmamızda MDA-MB-453 hücrelerinin ELISA yöntemi ile HER2, BAX, caspase-9 ve GADPH protein seviyeleri belirlenmiştir. CI değerinin en düşük olduğu 24 saat inkübasyon süresi ve 50 µg/ml Trastuzumab, 5 µM gambojik asit kombinasyonu kullanılarak MDA-MB-453 hücre hatlarından ekstrakte edilen proteinler kullanılmıştır (Bkz. Tablo 3.3).

ELISA kitlerindeki (Sinogeneclon) protokollere göre; Biotek marka ELISA cihazı kullanılarak her bir genin protein düzeyleri tespit edildi.

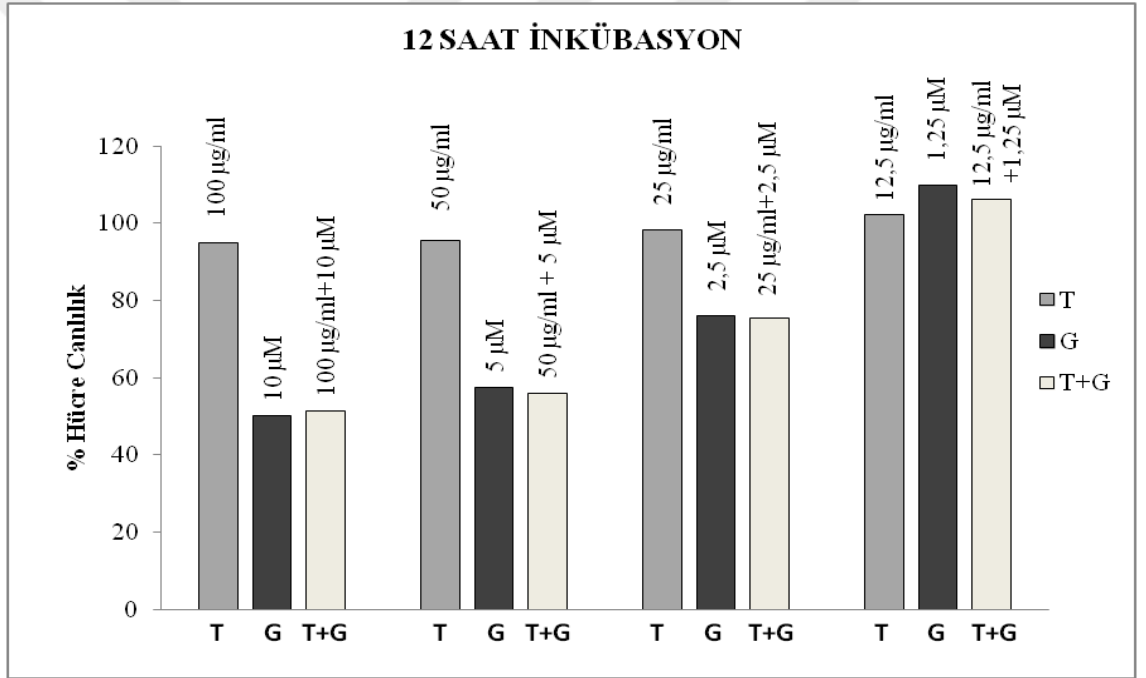


## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

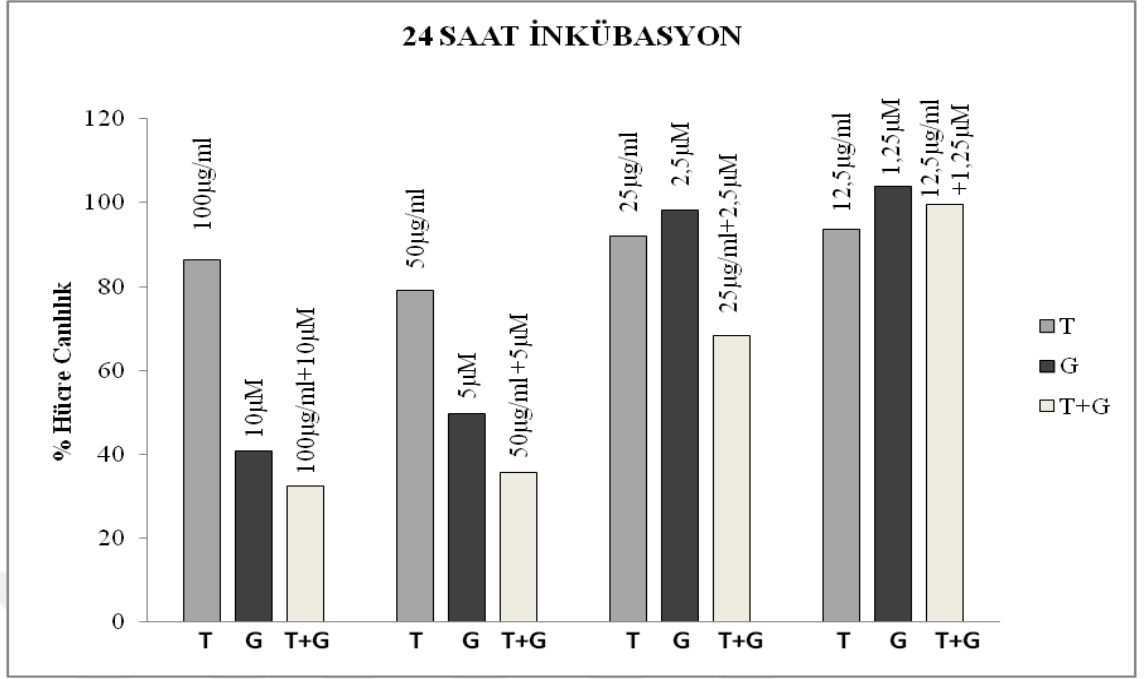
### 4.1. Sitotoksite Çalışmaları

#### 4.1.1. Hücre canlılık testi

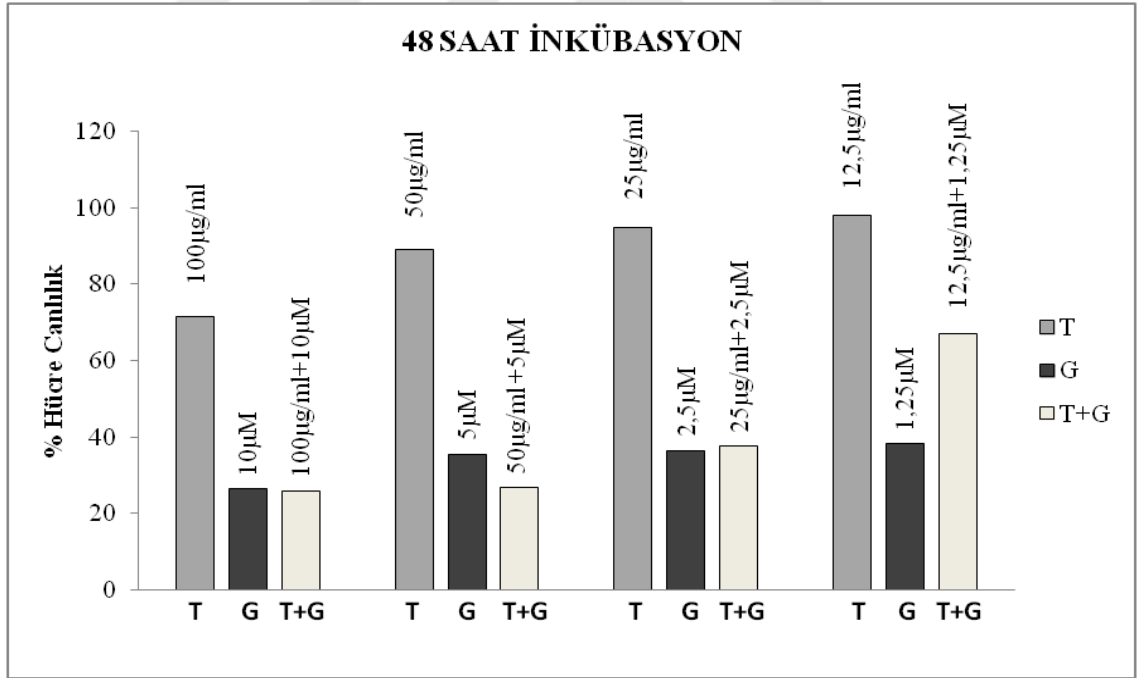
MDA-MB-453 hücre hattı üzerine 12, 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde; Trastuzumab, gambojik asit ve ikisinin kombinasyonları belirli konsantrasyonlarda eklenerek XTT uygulaması yapıldı ve 450 nm’de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak hücre canlılık yüzdeleri hesaplandı. Bu hesaplamalar sonucunda Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’de gösterilen bulgular elde edildi.



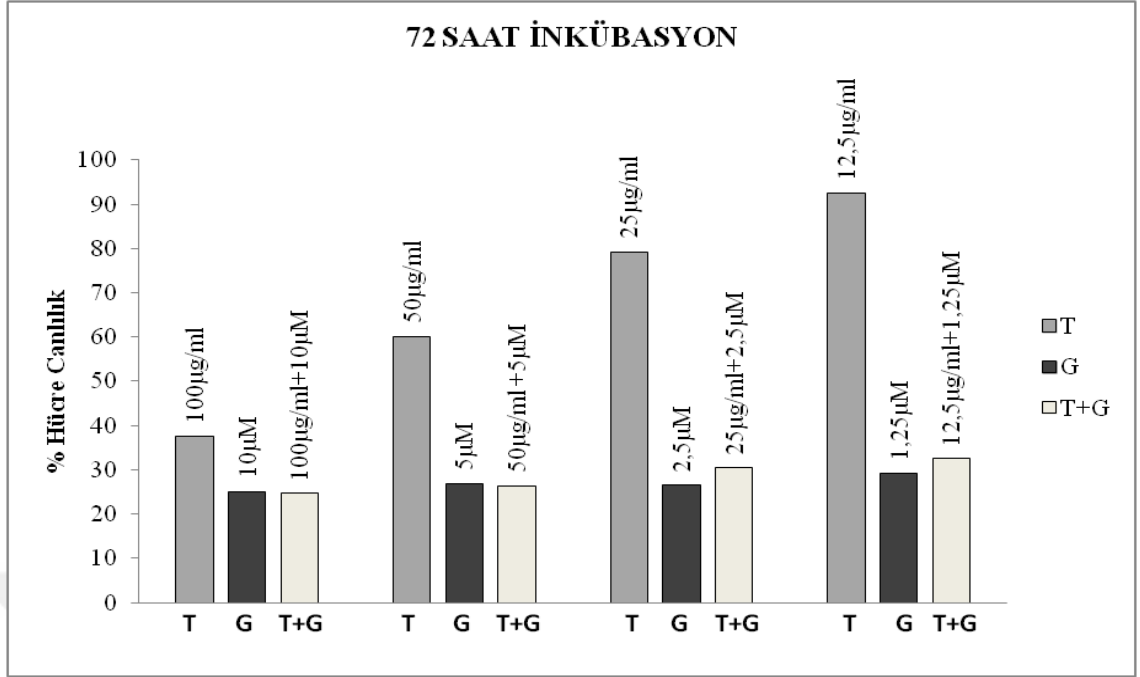
**Şekil 4.1.** 12 saat inkübasyon süresinde MDA-MB-453 hücre hattı üzerine Trastuzumab, gambojik asit ve T+G'nin antikanser aktivitesi.



**Şekil 4.2.** 24 saat inkübasyon süresinde MDA-MB-453 hücre hattı üzerine Trastuzumab, gambojik asit ve T+G'nin antikanser aktivitesi.



**Şekil 4.3.** 48 saat inkübasyon süresinde MDA-MB-453 hücre hattı üzerine Trastuzumab, gambojik asit ve T+G'nin antikanser aktivitesi.



**Şekil 4.4.** 72 saat inkübasyon süresinde MDA-MB-453 hücre hattı üzerine Trastuzumab, gambojik asit ve T+G'nin antikanser aktivitesi.

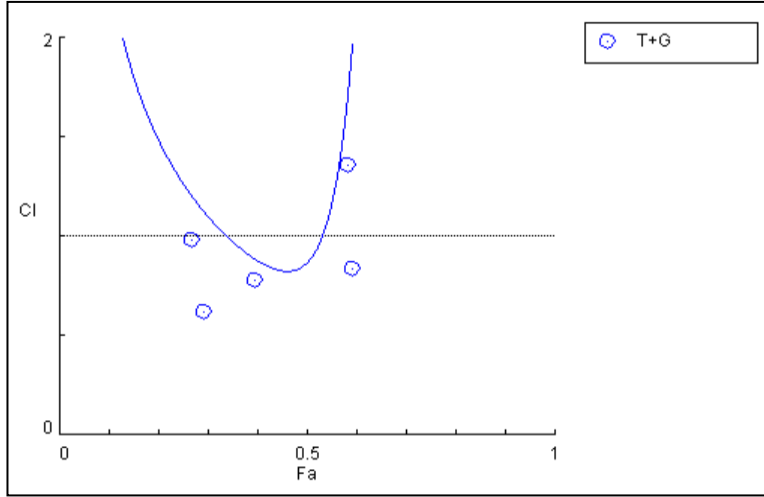
#### 4.1.2. Kombinasyon indeksi

MDA-MB-453 hücre hattı üzerine 12, 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde; Trastuzumab, Gambojik asit ve ikisinin kombinasyonları belirli konsantrasyonlarda eklenerek XTT uygulaması yapıldı ve 450 nm'de ölçülen absorbans değerleri Compusyn programına girilerek kombinasyon indeksleri (CI) hesaplandı.

**Tablo 4.1.** 12 Saat inkübasyon süresinde Trastuzumab ve gambojik asit kombinasyonlarının CI değerleri.

T+G Konsantrasyonu (µM)	CI Değeri	Kombinasyonun Etkisi
700-10	0,9385	Aditif etki
350-5	0,6186	Sinerjik etki
175-2,5	0,7811	Sinerjik etki
87,5-1,25	2,8435	Antagonistik etki

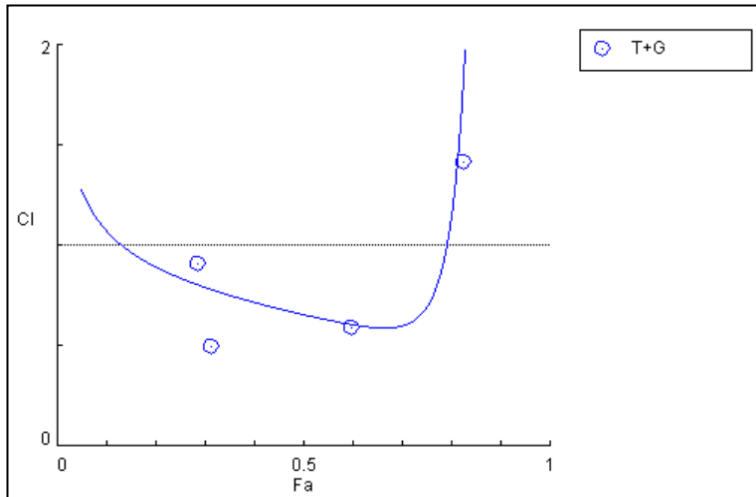




**Şekil 4.5.** 12 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab ve gambojik asit kombinasyonlarının kombinasyon indeksi grafiği.

**Tablo 4.2.** 24 Saat inkübasyon süresinde Trastuzumab ve gambojik asit kombinasyonlarının CI değerleri.

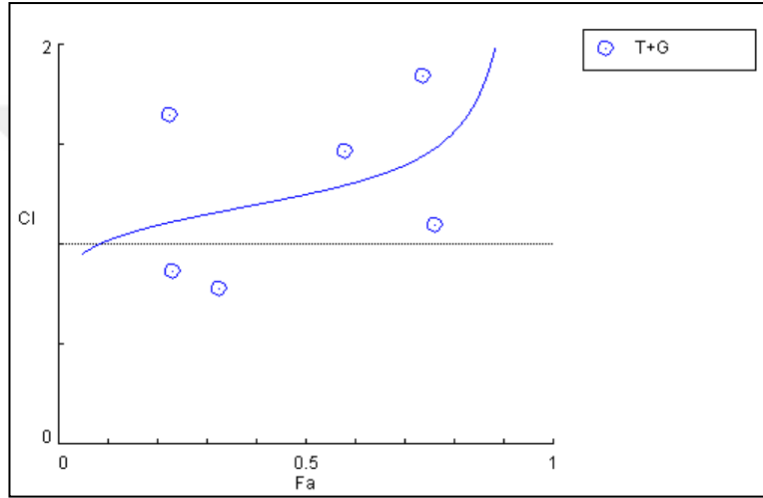
T+G Konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	CI Değeri	Kombinasyonun Etkisi
700-10	0,9061	Aditif etki
350-5	0,4991	Sinerjik etki
175-2,5	0,5892	Sinerjik etki
87,5-1,25	18,3740	Antagonistik etki



**Şekil 4.6.** 24 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab ve gambojik asit kombinasyonlarının kombinasyon indeksi grafiği.

**Tablo 4.3.** 48 Saat inkübasyon süresinde Trastuzumab ve gambojik asit kombinasyonlarının CI değerleri.

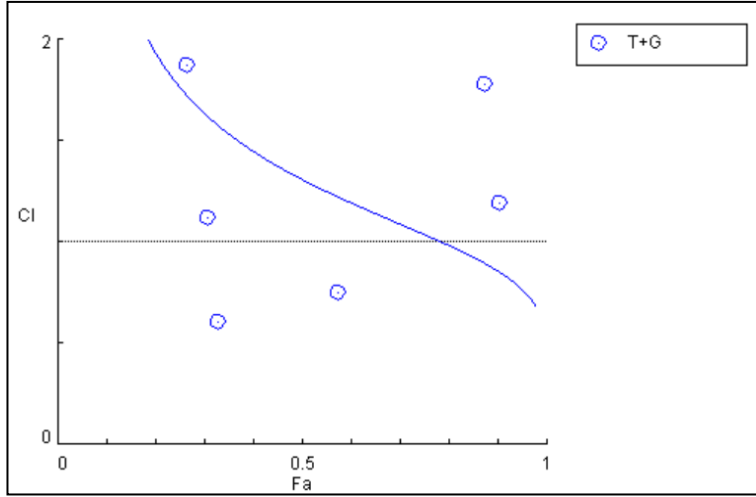
T+G Konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	CI Değeri	Kombinasyonun Etkisi
700-10	1,6474	Antagonistik etki
350-5	0,8625	Sinerjik etki
175-2,5	0,7764	Sinerjik etki
87,5-1,25	1,4659	Antagonistik etki



**Şekil 4.7.** 48 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab ve gambojik asit kombinasyonlarının kombinasyon indeksi grafiği.

**Tablo 4.4.** 72 Saat inkübasyon süresinde Trastuzumab ve gambojik asit kombinasyonlarının CI değerleri.

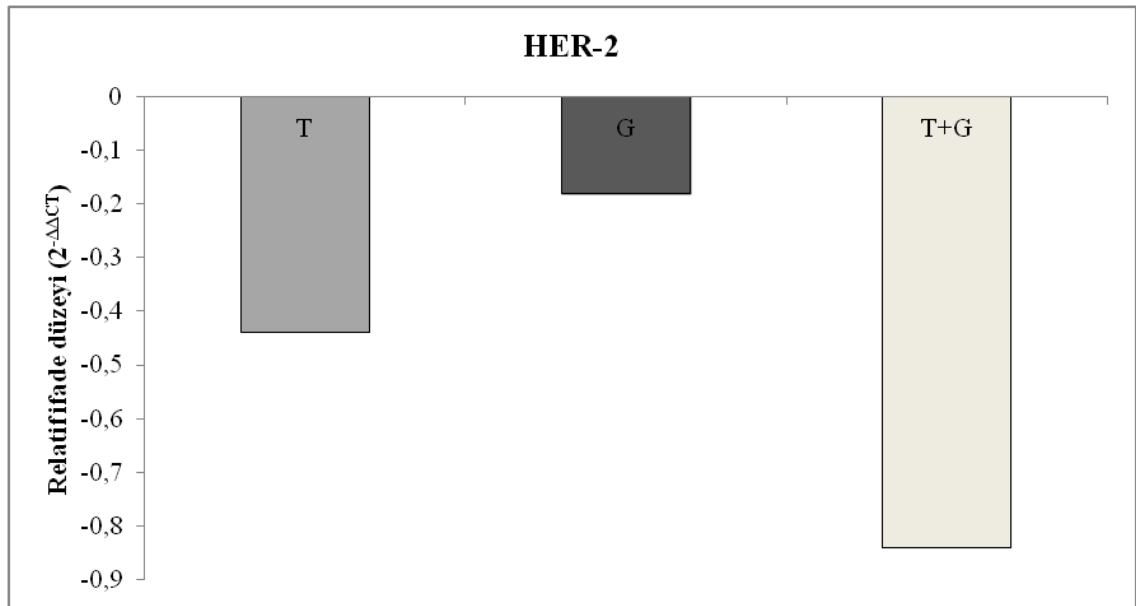
T+G Konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	CI Değeri	Kombinasyonun Etkisi
700-10	3,5271	Antagonistik etki
350-5	1,8746	Antagonistik etki
175-2,5	1,1198	Aditif etki
87,5-1,25	0,6082	Sinerjik etki



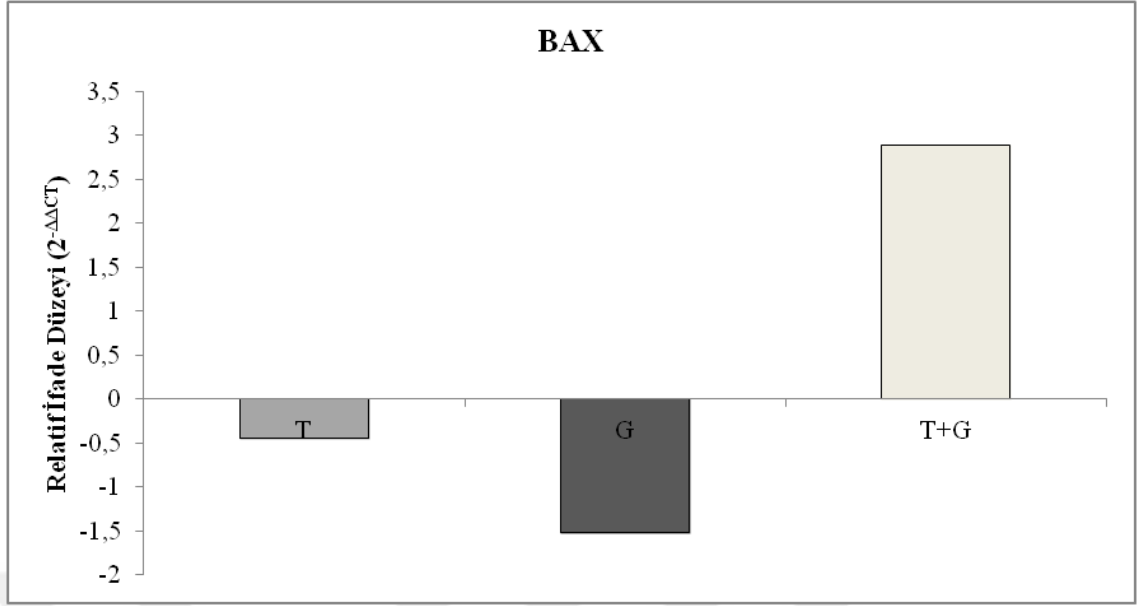
**Şekil 4.8.** 72 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab ve gambojik asit kombinasyonlarının kombinasyon indeksi grafiği.

#### 4.1.3. Gen ifade düzeylerinin belirlenmesi

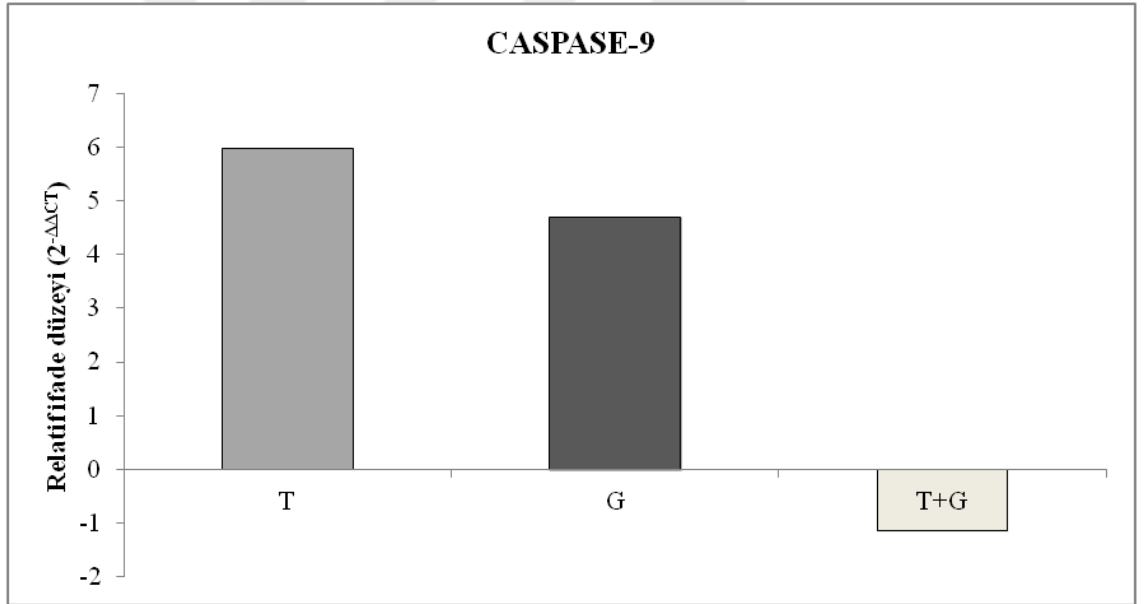
Çalışmamızda en iyi sinerjik etkinin görüldüğü, 24 saat inkübasyon süresi ve 50 µg/ml Trastuzumab, 5 µM gambojik asit kullanıldı. Kontrol, 50 µg/ml Trastuzumab, 5 µM gambojik asit ve kombinasyonunu içeren petriyelerdeki MDA-MB-453 hücre hatları 24 saat inkübasyon süresince bekletilerek *HER2*, *BAX*, *caspase-9* ve *GAPDH* gen ifade düzeyleri belirlendi.



**Şekil 4.9.** Trastuzumab, gambojik asit ve T+G uygulanmış hücrelerde *HER2* geninin ifade düzeyi.



**Şekil 4.10.** Trastuzumab, gambojik asit ve T+G uygulanmış hücrelerde *BAX* geninin ifade düzeyi.



**Şekil 4.11.** Trastuzumab, gambojik asit ve T+G uygulanmış hücrelerde *caspase-9* geninin ifade düzeyi.

#### 4.2. Protein seviyelerinin belirlenmesi

Çalışmamızda; kontrol, 50 µg/ml Trastuzumab, 5 µM gambojik asit ve kombinasyonunu içeren petrillerdeki MDA-MB-453 hücre hatları 24 saat inkübasyonda bekletilerek HER2, BAX ve caspase-9 protein seviyeleri belirlendi.

**Tablo 4.5.** BAX, caspase-9 ve HER2 protein seviyeleri.

	<b>BAX (ng/ml)</b>	<b>caspase-9 (ng/ml)</b>	<b>HER2 (ıu/L)</b>
Kontrol	10,26897	28,5	91,4
Trastuzumab(50 µg/ml)	9,902299	46,5	80,3
Gambojik asit(5 µM)	9,593103	37,08333	51,33333
T (50 µg/ml) + G (5 µM)	12,05172	21	36,4

İstatistiksel analiz SPSS 17.0 programı (Tek Değişkenli Varyans Analizleri ve Pearson Korelasyonu) kullanılarak değerlendirildi (p <0.05).

## 5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Meme kanseri dünyada en çok karşılaşılan kanser türleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Özellikle kadınlarda ölüm oranının en fazla olduğu kanser türüdür. Bazı meme kanseri hücrelerinde epidermal büyüme (HER2), östrojen (ER) ve progesteron (PR) reseptörlerinin ifade düzeylerinde artış görülebilir. Bu reseptörlerin birinin veya birden fazlasının miktarındaki artış hastalığın prognozunda önemli bir yere sahiptir. Reseptör pozitif olan kanser hücrelerindeki; apoptozu baskılama, çoğalma, hayatta kalma, yapışma, hareket kabiliyeti gibi faaliyetlerde bu reseptörlerin önemli ölçüde rolü olduğu anlaşılmıştır. Bir çok bilim insanı bu reseptörleri hedef alan akıllı ilaçlar üzerinde çalışmalar yapmış ve kanserle mücadelede immün terapi yöntemleri arasında en sık tercih edilen monoklonal antikolar geliştirilmiştir.

Meme kanseri olan hastaların yaklaşık dörtte birinde HER2 yüksek ifadesine rastlanmaktadır (Hudis, 2007). Trastuzumab, HER2' yi hedef alan Herceptin ticari ismiyle HER2 pozitif meme kanseri tedavisinde kullanılan bir monoklonal antikordur. Trastuzumab, HER2 pozitif meme kanseri hastalarında önemli klinik faydalar sağlamasına rağmen bazı hastaların tedavisinde istenilen yanıt alınamamıştır. Ayrıca HER2 pozitif tümörlerin bir kısmı Trastuzumab'a karşı direnç kazanmaktadır (Nahta vd., 2006). Kanser immün terapiden daha etkili sonuçların alınabilmesi için ilacın başka bir sitotoksik ajanla kombine edilerek sinerjik etki oluşturulması üzerine yapılan çalışmalar oldukça yaygınlaşmıştır. Gambojik asit meme kanseri de dâhil olmak üzere pek çok kanser türüne karşı güçlü antitümör aktiviteye sahip olması nedeniyle Trastuzumab da dahil olmak üzere bir çok kemoterapi küründe yardımcı molekül olarak kullanım potansiyeline sahiptir.

MDA-MB-453 hücre hattı üzerine 12, 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde; Trastuzumab, gambojik asit ve ikisinin kombinasyonlarının belirli konsantrasyonlarda uygulanması ile yapılan XTT uygulaması sonuçlarına göre: 12 saat inkübasyon süresinde, 50 µg/ml Trastuzumab ve 5 µM gambojik asit kombinasyonunda ayrı ayrı uygulandığı duruma göre daha fazla sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür (Bkz. Şekil 4.1). 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde, 100-50-25 µg/ml Trastuzumab ve 10-5-2,5 µM gambojik asit kombinasyonlarının kullanıldığı şartlarda oldukça iyi sitotoksik

etki görülmüştür (Bkz.Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4). Sitotoksisite çalışmalarımızda, 100 µg/ml ve daha düşük konsantrasyonlarda Trastuzumab'ın tek başına daha az antikanser etkisinin olduğu ayrıca 2,5 µM'dan daha fazla gambojik asit konsantrasyonlarında oldukça yüksek sitotoksik etki oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Sinerjik etkinin en fazla olduğu zaman ve konsantrasyonu tespit etmek için CI değerleri hesaplandı ve sonuç olarak 24 saat inkübasyon süresi, 50 µg/ml Trastuzumab ve 5 µM gambojik asit kombinasyonu şartlarında CI değerinin 0,4991 ile en az olduğu tespit edildi (Bkz. Tablo.4.2). Kombinasyonel indeksin en düşük olduğu bu şartlarda sinerjik etkinin daha somut ortaya koyulabilmesi için belirlenen genlerin ifade düzeyleri ve bu proteinlerin bulunma miktarlarının tespiti için RT-qPCR ve ELISA yöntemleri kullanılmıştır.

Yapılan RT-qPCR çalışmaları sonucunda 50 µg/ml Trastuzumab, 5 µM gambojik asit ve kombinasyonlarının uygulandığı tüm örneklerde *HER2* ifade düzeylerinde düşüş gözlenmiştir. Bununla birlikte *HER2* ifade düzeyinin, Trastuzumab ve gambojik aside göre Trastuzumab+gambojik asit kombinasyonunda çok daha fazla düşüş gösterdiği belirlenmiştir (Bkz. Şekil.4.9). Maddelerin *HER2* geni üzerinde beraber etkisinin tek tek uygulanmasına göre daha güçlü bir represyon gösterdiği ortaya çıkmıştır.

Yapılan ELISA çalışmaları sonucunda Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonlarının uygulandığı tüm örneklerde *HER2* protein seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir. Bununla birlikte kombinasyon uygulanan örnekte *HER2* protein düzeyinin % 60,17 ile Trastuzumab ve gambojik asit uygulanmış örneklere göre daha fazla düşüş olduğu görülmüştür (Bkz. Tablo.4.5). *HER2* gen ifade düzeylerindeki değişimle paralellik gösteren bu sonuç: Trastuzumab'ın antikanser aktivitesini artıran gambojik asit'in, *HER2* pozitif meme kanseri tedavisinde yardımcı kür elemanı olarak kullanımının daha etkili olabileceğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda *caspase-9*'un gen ifade seviyesinin Trastuzumab ve gambojik asit uygulanan örneklerde sırasıyla yaklaşık 6 ve 5 kat arttığı görülmüştür. Bu sonuç Trastuzumab ve gambojik asidin, intrinsek apoptotik yolağı bireysel olarak indüklediğini göstermektedir. Diğer yandan 50 µg/ml Trastuzumab ve 5 µM gambojik

asit kombinasyonu uygulanan hücrelerde, *caspase-9* gen ifade seviyesinin düştüğü görülmektedir (Bkz. Şekil.4.11). ELISA ile gerçekleştirilen çalışmalarda da RT-qPCR sonuçları ile korelasyonlu olarak, *caspase-9* protein seviyesinin kombinasyon tedavisinde en düşük (21 ng / ml) seviyede olduğu bulunmuştur (Bkz. Tablo.4.5).

Bad proteininin Bcl-2 proteinine bağlanması, BAX (B-hücresi lenfoma-2-ilişkili X) proteinin mitokondriyal membranın geçirgenliğinde bir değişikliğe neden olmasını sağlamakta ve sitokrom-C'nin (Cyt-C) mitokondriyal membrandan sitozole salınmasına sebep olmaktadır. Cyt-C'nin serbest bırakılmasının ardından apoptotik Proteaz Aktifleştirici Faktör-1 (Apaf-1), dATP ya da ATP'ye bağımlı bir mekanizma ile Cyt-C'ye bağlanır, oluşan kompleks *caspase-9*'a bağlanarak apoptozomun oluşumunu sağlar ve böylece kaspaz kaskatı başlamış olur (Riedl vd., 2005; Riedl ve Salvesen, 2007; Zou vd., 1997).

Bu bilgiler ışığında, sinerjik etki gördüğümüz bu çalışmada *caspase-9* gen ve protein seviyelerinde artış beklememize rağmen düşündüğümüzün aksine azalma görülmüştür. Bu sonuç bizlere Trastuzumab ve gambojik asit kombinasyonu ile tedavi edilen örneklerde apoptozun, intrinsek apoptozdan başka bir yolla indüklelediğini düşündürmektedir. Bu durumu daha net olarak açıklayabilmek için ilerleyen çalışmalarımızda yaptığımız çalışmalara ek olarak *Bcl2*, *Apaf-1* gibi bazı genlerin ifade düzeylerinin araştırılması ve Western-Blot ile protein seviyelerine bakılması çok büyük fayda sağlayacaktır.

Gen ifade analizi sonuçlarına göre, Trastuzumab ve gambojik asit ayrı ayrı uygulandığında, *BAX* geninin ifade düzeyini azalttığı bulundu (sırasıyla 0.5 ve 1.5 kat değişim). ELISA sonuçları incelendiğinde de, RT-qPCR sonuçlarını destekleyecek şekilde Trastuzumab ve gambojik asit uygulanan örneklerde *BAX* protein seviyelerinde azalma olduğu görülmektedir (Bkz. Şekil.4.10). Buna karşılık, Trastuzumab+gambojik asit (50 µg / ml Trastuzumab ve 5 µM gambojik asit) kombinasyonu uygulanan örneklerde *BAX* gen ifade seviyesi ve protein düzeyinin arttığı görülmüştür (Bkz. Şekil.4.10, Tablo.4.5). ). İntrensek apoptotik yolağa göre *BAX* geninin ifade düzeyindeki azalmayla korelatif olarak *caspase-9* geni ifade düzeyinde de azalma beklenmesine rağmen sonuçlarda bu durumun aksi ortaya çıkmıştır. Bu durum



literatürde ortaya konulan bilgilerin paralelinde, MDA-MB-453 hücre hattında Trastuzumab direnci oluşumunun bir göstergesi olarak düşünülebilir (Nahta vd., 2006; Luque-Cabal vd., 2016).

RT-qPCR ve ELISA çalışmalarında ortaya çıkan bulgulara göre, 24. saatte 50 µg / ml Trastuzumab ve 5 µM gambojik asit uygulanan MDA-MB-453 hücrelerinde önemli derecede agonistik sitotoksik etki görülmüştür.

Trastuzumab, HER2 pozitif meme kanseri tedavisinde önemli klinik sonuçların alındığı standart bir tedavidir. Bununla birlikte, HER2 pozitif meme kanseri hastalarının yaklaşık % 50'si Trastuzumab tedavisine yanıt vermemektedir (Perez Vd., 2014). Yaptığımız çalışmada, monoterapiyle karşılaştırıldığında gambojik asit ve Trastuzumab'ın kombinasyon tedavisi ile daha fazla agonistik sitotoksik etki elde edilmiştir.

Bu çalışma, kombinasyonun *HER2* gen ve protein düzeyinde ifade seviyesini önemli ölçüde azalttığını, gambojik asit'in Trastuzumab'ın antikanser aktivitesini artırdığını göstermiştir. Ayrıca BAX ve caspase-9'un korelasyonsuz protein ve gen düzeylerinden de anlaşılacağı üzere bu kombinasyon, MDA-MB-453 hücre hattında hücre ölümünü intrinsek apoptoz dışında başka bir yolak vasıtasıyla uyarmaktadır. Sonuç olarak gambojik asit, HER2 pozitif meme kanseri tedavisi için kullanılan Trastuzumab'ın etkinliğini arttırmasından dolayı ilerleyen çalışmaların getireceği sonuçlarında değerlendirilmesiyle yardımcı kür maddesi olarak önerilebilecektir.

## KAYNAKLAR

- ACS." Breast Cancer Risk Factors and Prevention Methods" <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/risk-and-prevention.html>, Son erişim tarihi: 29.07.2019.
- Albanell, J., Bellmunt, J., Molina, R., Garcia, M., Caragol, I., Bermejo, B., Ribas, A., Carulla, J., Gallego, O., Espanol, T. (1996) "Node-negative breast cancers with p53 (-)/HER2-neu (-) status may identify women with very good prognosis", *Anticancer research*, 16 (2), 1027-1032.
- Alimandi, M., Romano, A., Curia, M. C., Muraro, R., Fedi, P., Aaronson, S. A., Di Fiore, P. P., Kraus, M. H. (1995) "Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas", *Oncogene*, 10 (9), 1813-1822.
- Arribas, J., Baselga, J., Pedersen, K., Parra-Palau, J. L. (2011) "p95HER2 and breast cancer", *Cancer research*, 71 (5), 1515-1519.
- Asanuma, H., Torigoe, T., Kamiguchi, K., Hirohashi, Y., Ohmura, T., Hirata, K., Sato, M., Sato, N. (2005) "Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells", *Cancer Res*, 65 (23), 11018-11025.
- ASM." Meme Kanseri Tarama Yöntemleri", <https://www.anadolusaglik.org/blog/meme-kanserinde-tarama-yontemleri>, son erişim tarihi: 29.07.2019.
- Auterhoff, H., Frauendorf, H., Liesenklas, W., Schwandt, C. (1962) "The chief constituents of gamboge resins. 1. Chemistry of gamboge", *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, 295 833-846.
- Bedard, P. L., Cardoso, F., Piccart-Gebhart, M. J. (2009) "Stemming resistance to HER-2 targeted therapy", *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 14 (1), 55-66.
- Berns, E. M., Klijn, J. G., van Staveren, I. L., Portengen, H., Noordegraaf, E., Foekens, J. A. (1992) "Prevalence of amplification of the oncogenes c-myc, HER2/neu, and int-2 in one thousand human breast tumours: correlation with steroid receptors", *European journal of cancer*, 28 (2-3), 697-700.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., Woude, G. F. V. (2003) "Met, metastasis, motility and more", *Nature reviews Molecular cell biology*, 4 (12), 915.
- Bishayee, A., Block, K. (2015) "A broad-spectrum integrative design for cancer prevention and therapy: The challenge ahead", *Elsevier*, p S1-S4.
- Blows, F. M., Driver, K. E., Schmidt, M. K., Broeks, A., Van Leeuwen, F. E., Wesseling, J., Cheang, M. C., Gelmon, K., Nielsen, T. O., Blomqvist, C.

- (2010) "Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies", *PLoS medicine*, 7 (5), e1000279.
- Bozzuto, G., Ruggieri, P., Molinari, A. (2010) "Molecular aspects of tumor cell migration and invasion", *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 46 66-80.
- Brudnak, M. (2013) "Cancer-preventing properties of essential oil monoterpenes D-limonene and perillyl alcohol", *Complementary Medicine Magazine*, 1-8.
- Brufsky, A. (2010) "Trastuzumab-based therapy for patients with HER2-positive breast cancer: from early scientific development to foundation of care", *American journal of clinical oncology*, 33 (2), 186-195.
- Bulut, G. (2012) "İnsan Her2/Neu Pozitif, İnvaziv Meme Karsinomu Hücre Hattı Olan Mda-Mb453 de Trastuzumab Ve Gossipol (At-101) Kombinasyonunun Sitotoksikite Ve Apoptozis Üzerine Etkisi" Uzmanlık Tezi, *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı*, İzmir, 55-62.
- Campbell, J. B. (2002) "Breast cancer-race, ethnicity, and survival: a literature review", *Breast cancer research and treatment*, 74 (2), 187-192.
- Cancer Quest (Emory Winship Cancer Institute) " Trastuzumab", <https://www.cancerquest.org/patients/drug-reference/trastuzumab>, , son erişim tarihi: 08.08.2019.
- Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J., Henner, D., Wong, W., Rowland, A. M., Kotts, C., Carver, M. E., Shepard, H. M. (1992) "Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89 (10), 4285-4289.
- Chen, J.-S., Lan, K., Hung, M.-C. (2003) "Strategies to target HER2/neu overexpression for cancer therapy", *Drug resistance updates*, 6 (3), 129-136.
- Chen, J., Gu, H.-Y., Lu, N., Yang, Y., Liu, W., Qi, Q., Rong, J.-J., Wang, X.-T., You, Q.-D., Guo, Q.-L. (2008) "Microtubule depolymerization and phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase-1 and p38 were involved in gambogic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in human breast carcinoma MCF-7 cells", *Life sciences*, 83 (3-4), 103-109.
- Codony-Servat, J., Albanell, J., Lopez-Talavera, J. C., Arribas, J., Baselga, J. (1999) "Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells", *Cancer research*, 59 (6), 1196-1201.
- Çömez, S. (2016) "Meme kanseri olan kadınlar ve eşleri için oluşturulan web tabanlı eğitimin yaşam kalitesi ve eş uyumuna etkisi", Doktora Tezi, *Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 14-16.

- Dong, C., Jin, T., Lv, F., Dong, R., Liu, J., Lei, Q., Chen, B. (1988) "In vitro experimental investigation for anticancer effect of gaboge", *Chin Bull Pharm*, 23 89-90.
- Dowsett, M. (2001) "Overexpression of HER-2 as a resistance mechanism to hormonal therapy for breast cancer", *Endocrine-related cancer*, 8 (3), 191-195.
- Dumitrescu, R., Cotarla, I. (2005) "Understanding breast cancer risk-where do we stand in 2005", *Journal of cellular and molecular medicine*, 9 (1), 208-221.
- Eble, J. N., Tavassoli, F. A., Devilee, P. (2003) "Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs, *Iarc*,.
- Edge, S. B., Compton, C. C. (2010) "The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM", *Annals of surgical oncology*, 17 (6), 1471-1474.
- Eliyatkin, N., Yalçın, E., Zengel, B., Aktaş, S., Vardar, E. (2015) "Meme Karsinomunda Moleküler Sınıflama: Gelenekselden Yeni Döneme Yolculuk", *Meme Sağlığı Dergisi/Journal of Breast Health*, 11 (2).
- Eser, S., Yakut, C., Ozdemir, R., Karakilinc, H., Ozalan, S., Marshall, S. F., Karaoglanoglu, O., Anbarcioglu, Z., Ucuncu, N., Akin, U. and others. (2010) "Cancer incidence rates in Turkey in 2006: a detailed registry based estimation", *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 11 (6), 1731-1739.
- Ferlicot, S., Vincent-Salomon, A., Medioni, J., Genin, P., Rosty, C., Sigal-Zafrani, B., Freneaux, P., Jouve, M., Thiery, J.-P., Sastre-Garau, X. (2004) "Wide metastatic spreading in infiltrating lobular carcinoma of the breast", *European journal of cancer*, 40 (3), 336-341.
- Giuliano, A. E.(2009) "Breast disorders", Current Medical Diagnosis & Treatment 48<sup>nd</sup> ed., Ed. McPhee S.J., Papadakis M.A., *McGraw-Hill Companies*, Inc. USA.;17:630-54.
- GLOBOCAN." Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2018" <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars>, Son erişim tarihi: 19.07.2019
- Gradishar, W. J., Anderson, B. O., Balassanian, R., Blair, S. L., Burstein, H. J., Cyr, A., Elias, A. D., Farrar, W. B., Forero, A., Giordano, S. H. (2016) "Invasive breast cancer version 1.2016, NCCN clinical practice guidelines in oncology", *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 14 (3), 324-354.
- Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M., Hynes, N. E. (1997) "ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling", *The EMBO journal*, 16 (7), 1647-1655.

- Gu, H., Rao, S., Zhao, J., Wang, J., Mu, R., Rong, J., Tao, L., Qi, Q., You, Q., Guo, Q. (2009) "Gambogic acid reduced bcl-2 expression via p53 in human breast MCF-7 cancer cells", *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 135 (12), 1777-1782.
- Güneş, M. E., Çelik, G., Trabulus, F. D., Aksoy, Ş., Özorun, E., Aren, A., Gücin, Z., Bahadır, F. (2012) "Üçlü (ER, PGR, HER2) Negatif 47 Meme Kanseri Hastanın Değerlendirilmesi", *İstanbul Tıp Dergisi*, 13(4), 166-168
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011) "Hallmarks of cancer: the next generation", *Cell*, 144 (5), 646-674.
- Hong, R.-L., Spohn, W. H., Hung, M.-C. (1999) "Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of p185neu and also depletes p185neu", *Clinical Cancer Research*, 5 (7), 1884-1891.
- HSGM." Türkiye Kanser İstatistikleri, 2015" [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye Kanser Istatistikleri 2015.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf), son erişim tarihi: 23.07.2019.
- Huang, H., Chen, D., Li, S., Li, X., Liu, N., Lu, X., Liu, S., Zhao, K., Zhao, C., Guo, H. (2011) "Gambogic acid enhances proteasome inhibitor-induced anticancer activity", *Cancer letters*, 301 (2), 221-228.
- Hudis, C. A. (2007) "Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice", *New England journal of medicine*, 357 (1), 39-51.
- Hulka, B. S., Moorman, P. G. (2001) "Breast cancer: hormones and other risk factors-Discussion", *Elsevier*, 38, 103–116
- Hung, M.-C., Schechter, A. L., Chevray, P., Stern, D. F., Weinberg, R. A. (1986) "Molecular cloning of the neu gene: absence of gross structural alteration in oncogenic alleles", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83 (2), 261-264.
- Huston, J. S., George, A. J. (2001) "Engineered antibodies take center stage", *Human antibodies*, 10 (3-4), 127-142.
- Hynes, N. E., Stern, D. F. (1994) "The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1198 (2-3), 165-184.
- IARC." Latest global cancer data: cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018" <https://www.iarc.fr/pressrelease/>, Son erişim tarihi: 19.07.2019.
- Izumi, Y., Xu, L., Di Tomaso, E., Fukumura, D., Jain, R. K. (2002) "Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail", *Nature*, 416 (6878), 279.

- Jianga W.G., Sandersa A.J., Katohb M., Ungefrorenc H., Gieselerc F., Princed M., Thompsone S.K. and others. (2015) "Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives" ,*Seminars in Cancer Biology*, 35, 244–275.
- Kaymakçı, Ş. (2014) "Meme Hastalıkları", Dahili ve Cerrahi Hastalıklarda Bakım, 3. Basım, ed., Karadakovan A, Eti Aslan F., *Akademisyen Kitabevi*, , Ankara, 917-946.
- KEGG "Breast cancer - Reference pathway" [https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight\\_pathway?scale=1.0&map=map04012&keyword=erbb](https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04012&keyword=erbb), son erişim tarihi: 02.08.2019.
- Keleg, S., Büchler, P., Ludwig, R., Büchler, M. W., Friess, H. (2003) "Invasion and metastasis in pancreatic cancer", *Molecular Cancer*, 2 (1), 14.
- Koçak, S., Çelik, L., Özbaş, S., Sak, S. D., Tükün, A., Yalçın, B. (2011) "Meme Kanserinde Risk Faktörleri, Riskin Değerlendirilmesi ve Prevansiyon: İstanbul 2010 Konsensus Raporu", *Meme Sağlığı Dergisi/Journal of Breast Health*, 7 (2),
- Kong, L., Ye, D., Wu, H. (1995) "General surveys for modern study of gamboge", *Chin J Tradit Chin Med*, 20 89-91.
- Kurt, N. (2016) " MCF-7 Meme Kanseri Hücre Kültüründe Dositaksin SİN3A, MDM2 ve P53 Gen Ekspresyonu üzerine Etkisi" Doktora tezi, *Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 14-46.
- Kushi, L. H., Doyle, C., McCullough, M., Rock, C. L., Demark-Wahnefried, W., Bandera, E. V., Gapstur, S., Patel, A. V., Andrews, K., Gansler, T. (2012) "American Cancer Society 2010 Nutrition and Physical Activity Guidelines Advisory Committee. American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity", *CA Cancer J Clin*, 62 (1), 30-67.
- Land, C. E., Tokunaga, M., Koyama, K., Soda, M., Preston, D. L., Nishimori, I., Tokuoka, S. (2003) "Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950–1990", *Radiation Research*, 160 (6), 707-717.
- Lazar, G. A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J. S., Hyun, L., Chan, C., Chung, H. S., Eivazi, A., Yoder, S. C. (2006) "Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (11), 4005-4010.
- Le, X.-F., Claret, F.-X., Lammayot, A., Tian, L., Deshpande, D., LaPushin, R., Tari, A. M., Bast, R. C. (2003) "The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition", *Journal of Biological Chemistry*, 278 (26), 23441-23450.

- Lechner, L., De Nooijer, J., De Vries, H. (2004) "Breast self-examination: longitudinal predictors of intention and subsequent behaviour", *European journal of cancer prevention*, 13 (5), 369-376.
- Lei, Q., Liu, J., Gong, D. (1985) "Experimental study on anticancer activity of gamboge", *Chin J Tumor*, 7 282.
- Lengyel, E., Prechtel, D., Resau, J. H., Gauger, K., Welk, A., Lindemann, K., Salanti, G., Richter, T., Knudsen, B., Vande Woude, G. F. and others. (2005) "C-Met overexpression in node-positive breast cancer identifies patients with poor clinical outcome independent of Her2/neu", *Int J Cancer*, 113 (4), 678-682.
- Li, C., Qi, Q., Lu, N., Dai, Q., Li, F., Wang, X., You, Q., 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, C., Uribe, D., Daling, J. (2005) "Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer", *British Journal of Cancer*, 93 (9), 1046.
- Lilleby, W., Solca, F., Røe, K. (2011) "Radiotherapy and inhibition of the EGF family as treatment strategies for prostate cancer: combining theragnostics with theragates", *Oncology Reviews*, 5 (2), 119-128.
- Lin, L. J., Lin, L. Z., Pezzuto, J. M., Cordell, G. A., Ruangrunsi, N. (1993) "Isogambogic acid and isomorellinol from *Garcinia hanburyi*", *Magnetic resonance in chemistry*, 31 (4), 340-347.
- Little, M. P., McElvenny, D. M. (2016) "Male breast cancer incidence and mortality risk in the Japanese atomic bomb survivors—differences in excess relative and absolute risk from female breast cancer", *Environmental Health Perspectives*, 125 (2), 223-229.
- Liu, W., Guo, Q. L., You, Q. D., Zhao, L., Gu, H. Y., Yuan, S. T. (2005) "Anticancer effect and apoptosis induction of gambogic acid in human gastric cancer line BGC-823", *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 11 (24), 3655.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001) "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method", *Methods*, 25 (4): 402-408.
- Lowe, S. W., Lin, A. W. (2000) "Apoptosis in cancer", *Carcinogenesis*, 21 (3), 485-495.
- Lu, Y., Zi, X., Pollak, M. (2004) "Molecular mechanisms underlying IGF-I-induced attenuation of the growth-inhibitory activity of trastuzumab (Herceptin) on SKBR3 breast cancer cells", *International Journal of Cancer*, 108 (3), 334-341.

- Lu, Y., Zi, X., Zhao, Y., Mascarenhas, D., Pollak, M. (2001) "Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin)", *Journal of the National Cancer Institute*, 93 (24), 1852-1857.
- Lupu, R., Cardillo, M., Harris, L., Hijazi, M., Rosenberg, K. (1995) "Interaction between erbB-receptors and heregulin in breast cancer tumor progression and drug resistance", *Elsevier*, p 135-145.
- Luque-Cabal, M., García-Tejido, P., Fernández-Pérez, Y., Sánchez-Lorenzo, L., Palacio-Vázquez, I. (2016) "Mechanisms behind the resistance to trastuzumab in HER2-amplified breast cancer and strategies to overcome it", *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 10 CMO. S34537.
- Maricic, M. (2006) "The use of zoledronic acid for Paget's disease of bone", *Current Osteoporosis Reports*, 4 (1), 40-44.
- MEMORIAL," PET/CT" <https://www.memorial.com.tr/bolumler/pet-ct/>, son erişim tarihi: 31.07.2019.
- Miles, D., von Minckwitz, G., Seidman, A. D. (2002) "Combination versus sequential single-agent therapy in metastatic breast cancer", *The Oncologist*, 7 (Supplement 6), 13-19.
- Molina, M. A., Sáez, R., Ramsey, E. E., Garcia-Barchino, M.-J., Rojo, F., Evans, A. J., Albanell, J., Keenan, E. J., Lluch, A., García-Conde, J. (2002) "NH2-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer", *Clinical Cancer Research*, 8 (2), 347-353.
- Nagata, Y., Lan, K.-H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F. J., Sahin, A. A., Klos, K. S., Li, P., Monia, B. P., Nguyen, N. T. (2004) "PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients", *Cancer Cell*, 6 (2), 117-127.
- Nagy, P., Friedländer, E., Tanner, M., Kapanen, A. I., Carraway, K. L., Isola, J., Jovin, T. M. (2005) "Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line", *Cancer Research*, 65 (2), 473-482.
- Nahta, R., Takahashi, T., Ueno, N. T., Hung, M.-C., Esteva, F. J. (2004) "P27kip1 down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells", *Cancer Research*, 64 (11), 3981-3986.
- Nahta, R., Yuan, L. X., Zhang, B., Kobayashi, R., Esteva, F. J. (2005) "Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells", *Cancer Research*, 65 (23), 11118-11128.
- Nahta, R., Yu, D., Hung, M.-C., Hortobagyi, G. N., Esteva, F. J. (2006) "Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer", *Nature Reviews Clinical Oncology*, 3 (5), 269.



- Narayan, M., Wilken, J. A., Harris, L. N., Baron, A. T., Kimbler, K. D., Maihle, N. J. (2009) "Trastuzumab-induced HER reprogramming in "resistant" breast carcinoma cells", *Cancer Research*, 69 (6), 2191-2194.
- Navolanic, P. M., Steelman, L. S., McCubrey, J. A. (2003) "EGFR family signaling and its association with breast cancer development and resistance to chemotherapy", *International Journal of Oncology*, 22 (2), 237-252.
- NCBI "Erb-B2 Reseptör Tirozin Kinaz" <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2064>, son erişim tarihi: 02.08.2019.
- Neve, R. M., Holbro, T., Hynes, N. E. (2002) "Distinct roles for phosphoinositide 3-kinase, mitogen-activated protein kinase and p38 MAPK in mediating cell cycle progression of breast cancer cells", *Oncogene*, 21 (29), 4567.
- Normanno, N., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M., Luca, A., Caponigro, F., Salomon, D. (2005) "The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview", *Current Drug Targets*, 6 (3), 243-257.
- O'Shaughnessy, J. (2005) "Extending survival with chemotherapy in metastatic breast cancer", *The Oncologist*, 10 (Supplement 3), 20-29.
- Ollis, W., Ramsay, M., Sutherland, I., Mongkolsuk, S. (1965) "The constitution of gambogic acid", *Tetrahedron*, 21 (6), 1453-1470.
- Orvieto, E., Maiorano, E., Bottiglieri, L., Maisonneuve, P., Rotmensz, N., Galimberti, V., Luini, A., Brenelli, F., Gatti, G., Viale, G. (2008) "Clinicopathologic characteristics of invasive lobular carcinoma of the breast: results of an analysis of 530 cases from a single institution", *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 113 (7), 1511-1520.
- Pandey, M. K., Sung, B., Ahn, K. S., Kunnumakkara, A. B., Chaturvedi, M. M., Aggarwal, B. B. (2007) "Gambogic acid, a novel ligand for transferrin receptor, potentiates TNF-induced apoptosis through modulation of the nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway", *Blood*, 110 (10), 3517-3525.
- Park, B. W., Kim, S. I., Kim, M. H., Kim, E. K., Park, S. H., Lee, K. S. (2000) "Clinical breast examination for screening of asymptomatic women: the importance of clinical breast examination for breast cancer detection", *Yonsei Medical Journal*, 41 (3), 312-318.
- Parsons, R., Simpson, L. (2003) "PTEN and cancer", *Tumor Suppressor Genes*, Springer, 147-166.
- Pedersen, K., Angelini, P.-D., Laos, S., Bach-Faig, A., Cunningham, M. P., Ferrer-Ramón, C., Luque-García, A., García-Castillo, J., Parra-Palau, J. L., Scaltriti, M. (2009) "A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumor growth and metastasis", *Molecular and Cellular Biology*, 29 (12), 3319-3331.

- Perez, E.A., Cortés. J., Gonzalez-Angulo, A.M., Bartlett, J.M. (2014) "HER2 testing: current status and future direction", *Cancer Treat Rev.* 40:276–84.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A. (2000) "Molecular portraits of human breast tumours", *Nature*, 406 (6797), 747.
- Pietras, R. J., Pegram, M. D., Finn, R. S., Maneval, D. A., Slamon, D. J. (1998) "Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs", *Oncogene*, 17 (17), 2235.
- Prat, M., Narsimhan, R. P., Crepaldi, T., Rita Nicotra, M., Natali, P. G., Comoglio, P. M. (1991) "The receptor encoded by the human c-MET oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors", *International journal of Cancer*, 49 (3), 323-328.
- Price-Schiavi, S. A., Jepson, S., Li, P., Arango, M., Rudland, P. S., Yee, L., Carraway, K. L. (2002) "Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance", *International Journal of Cancer*, 99 (6), 783-791.
- Qi, Q., Gu, H., Yang, Y., Lu, N., Zhao, J., Liu, W., Ling, H., You, Q.-d., Wang, X., Guo, Q. (2008) "Involvement of matrix metalloproteinase 2 and 9 in gambogic acid induced suppression of MDA-MB-435 human breast carcinoma cell lung metastasis", *Journal of Molecular Medicine*, 86 (12), 1367.
- Rayson, D., Richel, D., Chia, S., Jackisch, C., Van Der Vegt, S., Suter, T. (2008) "Anthracycline–trastuzumab regimens for HER2/neu-overexpressing breast cancer: current experience and future strategies", *Annals of Oncology*, 19 (9), 1530-1539.
- Reis-Filho, J. S., Pusztai, L. (2011) "Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction", *The Lancet*, 378 (9805), 1812-1823.
- Riedl, S.J., Li, W., Chao, Y., Schwarzenbacher R, Shi Y. (2005) "Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP", *Nature*, 434:926-933.
- Riedl, S.J., Salvesen, G.S. (2007) "The apoptosome: signalling platform of cell death", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 405–413.
- Ritter, C. A., Perez-Torres, M., Rinehart, C., Guix, M., Dugger, T., Engelman, J. A., Arteaga, C. L. (2007) "Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network", *Clinical Cancer Research*, 13 (16), 4909-4919.

- Ross, J. S., 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.
- Ross, J. S., Fletcher, J. A., Bloom, K. J., Linette, G. P., Stec, J., Symmans, W. F., Pusztai, L., Hortobagyi, G. N. (2004) "Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein", *Molecular & Cellular Proteomics*, 3 (4), 379-398.
- Rouzier, R., Perou, C. M., Symmans, W. F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K. R., Stec, J., Ayers, M., Wagner, P. (2005) "Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy", *Clinical cancer research*, 11 (16), 5678-5685.
- Sáez, R., Molina, M. A., Ramsey, E. E., Rojo, F., Keenan, E. J., Albanell, J., Lluch, A., García-Conde, J., Baselga, J., Clinton, G. M. (2006) "p95HER-2 predicts worse outcome in patients with HER-2-positive breast cancer", *Clinical Cancer Research*, 12 (2), 424-431.
- Sasso, M., Bianchi, F., Ciravolo, V., Tagliabue, E., Campiglio, M. (2011) "HER2 splice variants and their relevance in breast cancer", *Journal of Nucleic Acids Investigation*, 29.
- Scaltriti, M., Chandarlapaty, S., Prudkin, L., Aura, C., Jimenez, J., Angelini, P. D., Sánchez, G., Guzman, M., Parra, J. L., Ellis, C. (2010) "Clinical benefit of lapatinib-based therapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast tumors coexpressing the truncated p95HER2 receptor", *Clinical Cancer Research*, 16 (9), 2688-2695.
- Scaltriti, M., Rojo, F., Ocaña, A., Anido, J., Guzman, M., Cortes, J., Di Cosimo, S., Matias-Guiu, X., Ramon y Cajal, S., Arribas, J. (2007) "Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer", *Journal of the National Cancer Institute*, 99 (8), 628-638.
- Scheuer, W., Friess, T., Burtscher, H., Bossenmaier, B., Endl, J., Hasmann, M. (2009) "Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models", *Cancer Research*, 69 (24), 9330-9336.
- Schwartz, G. F., Hughes, K. S., Lynch, H. T., Fabian, C. J., Fentiman, I. S., Robson, M. E., Domchek, S. M., Hartmann, L. C., Holland, R., Winchester, D. J. (2008) "Proceedings of the international consensus conference on breast cancer risk, genetics, & risk management, April, 2007", *Cancer*, 113 (10), 2627-2637.
- Seçginli, S. (2011) "Meme Kanseri Taraması: Son Yenilikler Neler?", *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 10 (2),

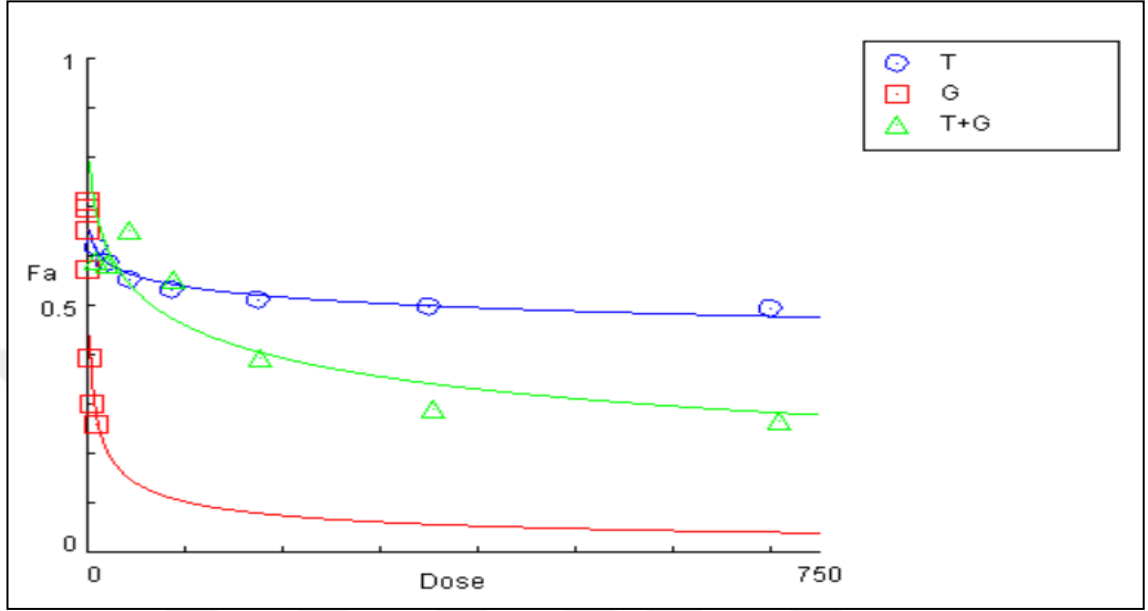
- Semiglazov, V. F., Sagaidak, V. N., Moiseyenko, V. M., Mikhailov, E. A. (1993) "Study of the role of breast self-examination in the reduction of mortality from breast cancer", *European Journal of Cancer*, 29 (14), 2039-2046.
- Senkus, E., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rutgers, E., Zackrisson, S., Cardoso, F. (2015) "Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up", *Annals of Oncology*, 26 (suppl\_5), v8-v30.
- Shattuck, D. L., Miller, J. K., Carraway, K. L., Sweeney, C. (2008) "Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells", *Cancer Research*, 68 (5), 1471-1477.
- Sigerist, H. E. (1932) "The Historical Development of the Pathology and Therapy of Cancer", *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 8 (11), 642-653.
- Singletery, S. E., Allred, C., Ashley, P., Bassett, L. W., Berry, D., Bland, K. I., Borgen, P. I., Clark, G., Edge, S. B., Hayes, D. F. (2002) "Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer", *Journal of Clinical Oncology*, 20 (17), 3628-3636.
- Singletery, S. E., Allred, C., ashley, P., Bassett, L. W., Berry, D., Bland, K. I., Borgen, P. I., Clark, G. M., Edge, S. B. & Hayes, D. F. (2003) Staging system for breast cancer: revisions for the 6th edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *Surgical Clinics*, 83, 803-819.
- Singletery, S. E., Connolly, J. L. (2006) "Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual", *CA: A Cancer journal for Clinicians*, 56 (1), 37-47.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., 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.
- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M. (2001) "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2", *New England Journal of Medicine*, 344 (11), 783-792.
- Sørli, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S. (2001) "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (19), 10869-10874.
- Spector, N. L., Blackwell, K. L. (2009) "Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer", *Journal of Clinical Oncology*, 27 (34), 5838-5847.

- Sun, Z., Jiang, X., Chen, W., Gao, W., Li, Y., Tan, Q. (1983) "Some toxicity for injection of gamboge", *Jiangxi Med*, 3 5-7.
- Surmacz, E. (2003) "Growth factor receptors as therapeutic targets: strategies to inhibit the insulin-like growth factor I receptor", *Oncogene*, 22 (42), 6589.
- Şakalar, Ç., İzgi, K., Canatan, H. (2013) "Kanser immün terapi ve monoklonal antikorlar", *FÜ Sağ Bil Tıp Derg 2013*, 27 (2): 105, 111
- Thomas, D. B., Gao, D. L., Ray, R. M., Wang, W. W., Allison, C. J., Chen, F. L., Porter, P., Hu, Y. W., Zhao, G. L., Pan, L. D. (2002) "Randomized trial of breast self-examination in Shanghai: final results", *Journal of the National Cancer Institute*, 94 (19), 1445-1457.
- TMHDF,"Meme kanseri eğitim modülü" <http://www.tmhdf.org.tr/icerik/egitim-modulleri-26.html>, son erişim tarihi: 29.07.2019.
- TÜİK." Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2015" <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=21526> , son erişim tarihi: 23.07.2019.
- Valabrega, G., Montemurro, F., Aglietta, M. (2007) "Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer", *Annals of Oncology*, 18 (6), 977-984.
- Vogel, V. G., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Cronin, W. M., Cecchini, R. S., Atkins, J. N., Bevers, T. B., Fehrenbacher, L., Pajon, E. R., Wade, J. L. (2006) "Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial", *Jama*, 295 (23), 2727-2741.
- Waldmann, T. A. (2003) "Immunotherapy: past, present and future", *Nature Medicine*, 9 (3), 269.
- Wang, S., Wang, L., Chen, M., Wang, Y. (2015) "Gambogic acid sensitizes resistant breast cancer cells to doxorubicin through inhibiting P-glycoprotein and suppressing survivin expression", *Chemico-biological interactions*, 235 76-84.
- Wang, X., Chen, W. (2012) "Gambogic acid is a novel anti-cancer agent that inhibits cell proliferation, angiogenesis and metastasis", *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 12 (8), 994-1000.
- WHO." Cancer Fact sheet February 2018" <http://www.who.int/en/newsroom/fact-sheets/detail/cancer>, son erişim tarihi: 23.07.2019.
- Xia, W., Chen, J. S., Zhou, X., Sun, P. R., Lee, D. F., Liao, Y., Zhou, B. P., Hung, M. C. (2004) "Phosphorylation/cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 is associated with HER2/neu overexpression and provides a novel combination predictor for poor prognosis in breast cancer patients", *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10 (11), 3815-3824.

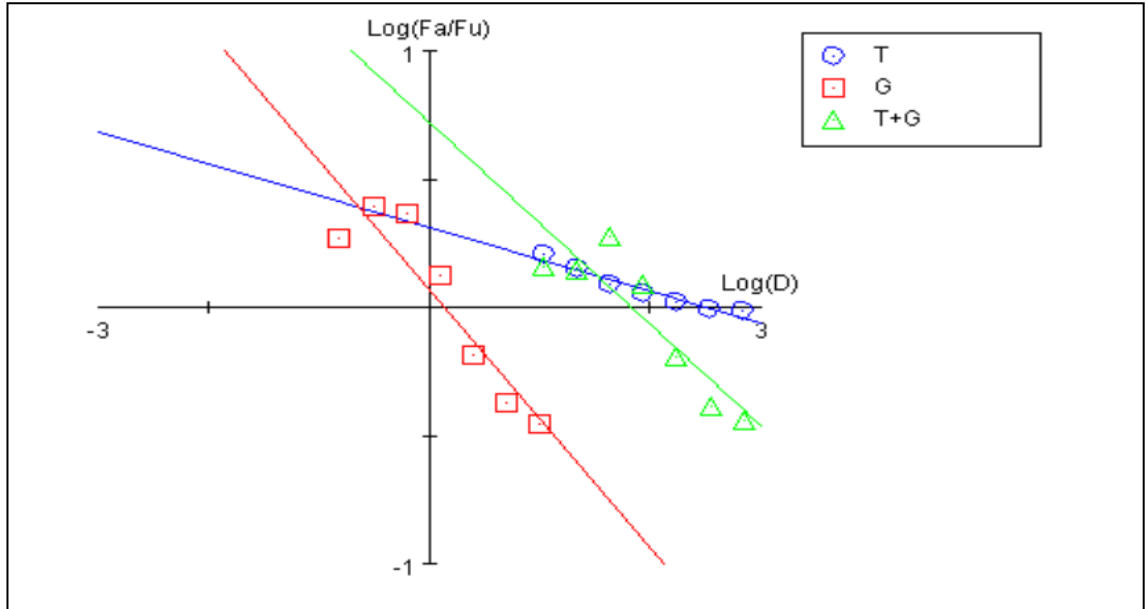
- Yakes, F. M., Chinratanalab, W., Ritter, C. A., King, W., Seelig, S., Arteaga, C. L. (2002) "Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt Is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action", *Cancer Res*, 62 (14), 4132-4141.
- Yakes, F. M., Chinratanalab, W., Ritter, C. A., King, W., Seelig, S., Arteaga, C. L. (2002) "Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt Is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action", *Cancer Research*, 62 (14), 4132-4141.
- Yao, E., Zhou, W., Lee-Hoeflich, S. T., Truong, T., Haverty, P. M., Eastham-Anderson, J., Lewin-Koh, N., Gunter, B., Belvin, M., Murray, L. J. (2009) "Suppression of HER2/HER3-mediated growth of breast cancer cells with combinations of GDC-0941 PI3K inhibitor, trastuzumab, and pertuzumab", *Clinical Cancer Research*, 15 (12), 4147-4156.
- Yarden, Y. (2001) "Biology of HER2 and its importance in breast cancer", *Oncology*, 61 (Suppl. 2), 1-13.
- Yi, T., Yi, Z., Cho, S.-G., Luo, J., Pandey, M. K., Aggarwal, B. B., Liu, M. (2008) "Gambogic acid inhibits angiogenesis and prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2 signaling", *Cancer Research*, 68 (6), 1843-1850.
- Yu, J., Guo, Q.-L., You, Q.-D., Lin, S.-S., Li, Z., Gu, H.-Y., Zhang, H.-w., Tan, Z., Wang, X. (2006) "Repression of telomerase reverse transcriptase mRNA and hTERT promoter by gambogic acid in human gastric carcinoma cells", *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 58 (4), 434-443.
- Zhang, L., Chang, C.-j., Bacus, S. S., Hung, M.-C. (1995) "Suppressed transformation and induced differentiation of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells by emodin", *Cancer Research*, 55 (17), 3890-3896.
- Zhao, Q., Yang, Y., Yu, J., You, Q.-D., Zeng, S., Gu, H.-Y., Lu, N., Qi, Q., Liu, W., Wang, X.-T. (2008) "Posttranscriptional regulation of the telomerase hTERT by gambogic acid in human gastric carcinoma 823 cells", *Cancer Letters*, 262 (2), 223-231.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. (1997) "Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3", *Cell*, 90(5), 405-413.

## EKLER

**EK-1. 12 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonlarının Doz-Effect ve Median-Effect Eğrileri**

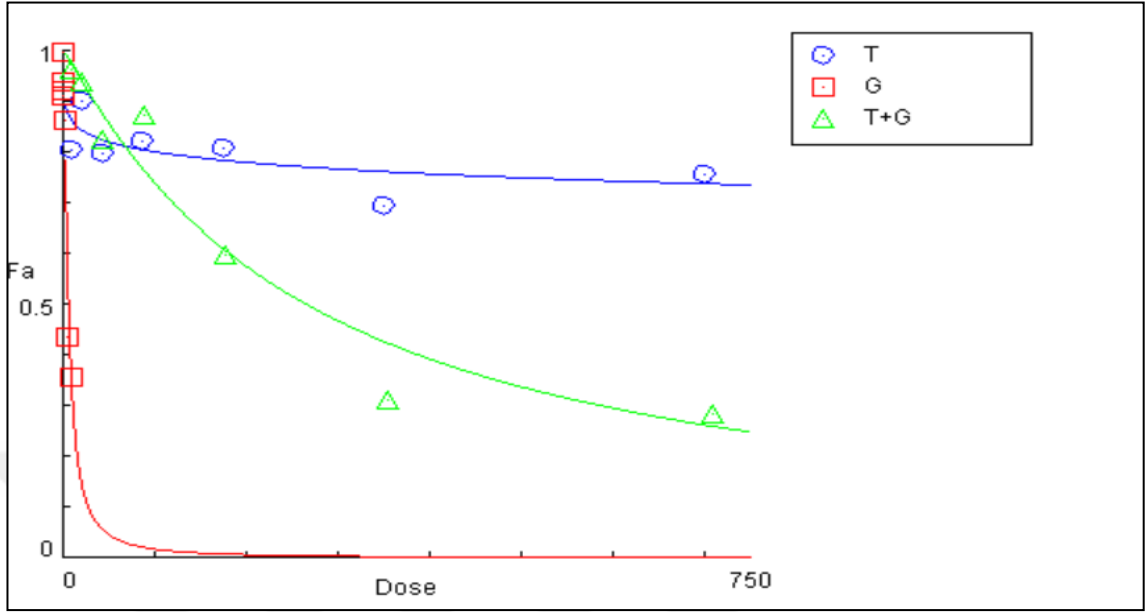


**Şekil Ek-1.1** 12 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonlarının Dose-Effect eğrisi.

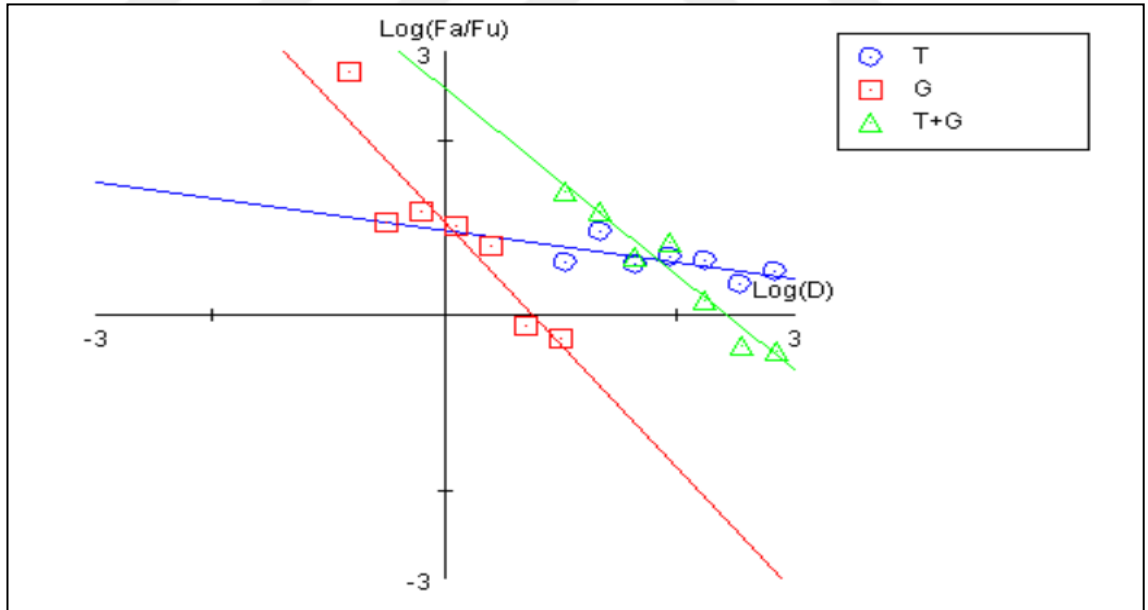


**Şekil Ek-1.2.** 12 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonlarının Median-Effect grafiği.

**EK-2. 24 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonlarının Dose-Effect ve Median-Effect Eğrileri**



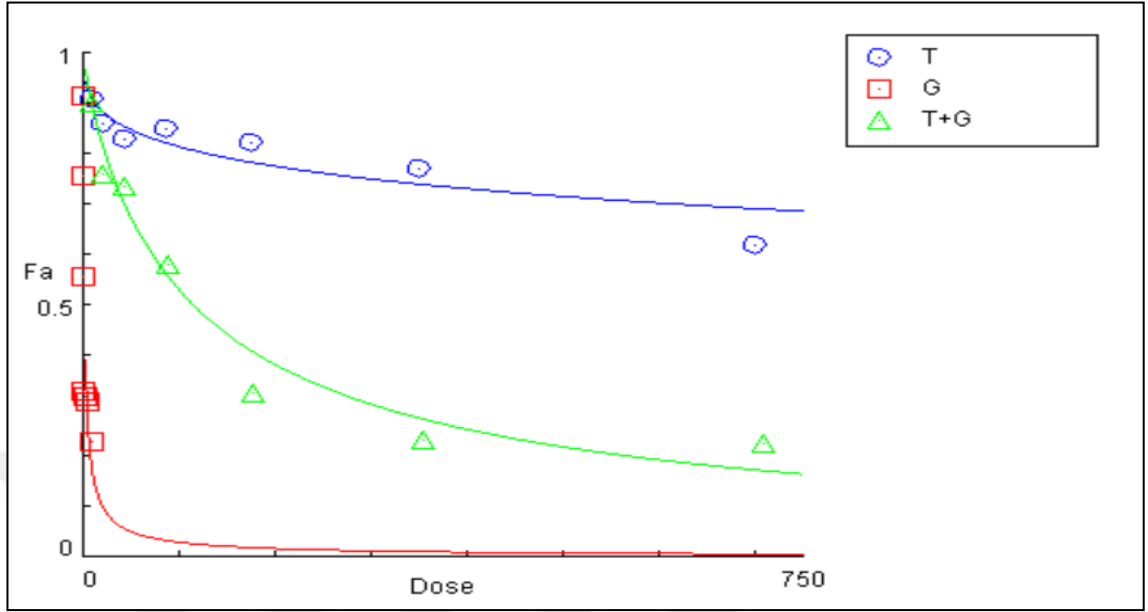
**Şekil Ek-2.1.** 24 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonlarının Dose-Effect eğrisi.



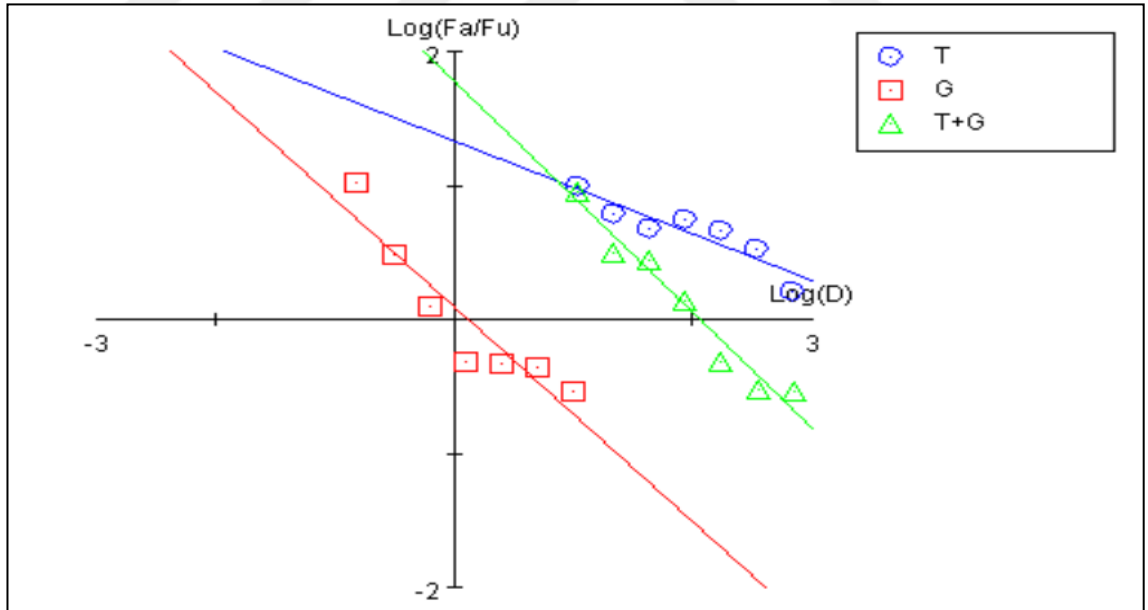
**Şekil Ek-2.2.** 24 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonlarının Median-Effect grafiği.



**EK-3. 48 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonlarının Dose-Effect ve Median-Effect Eğrileri**

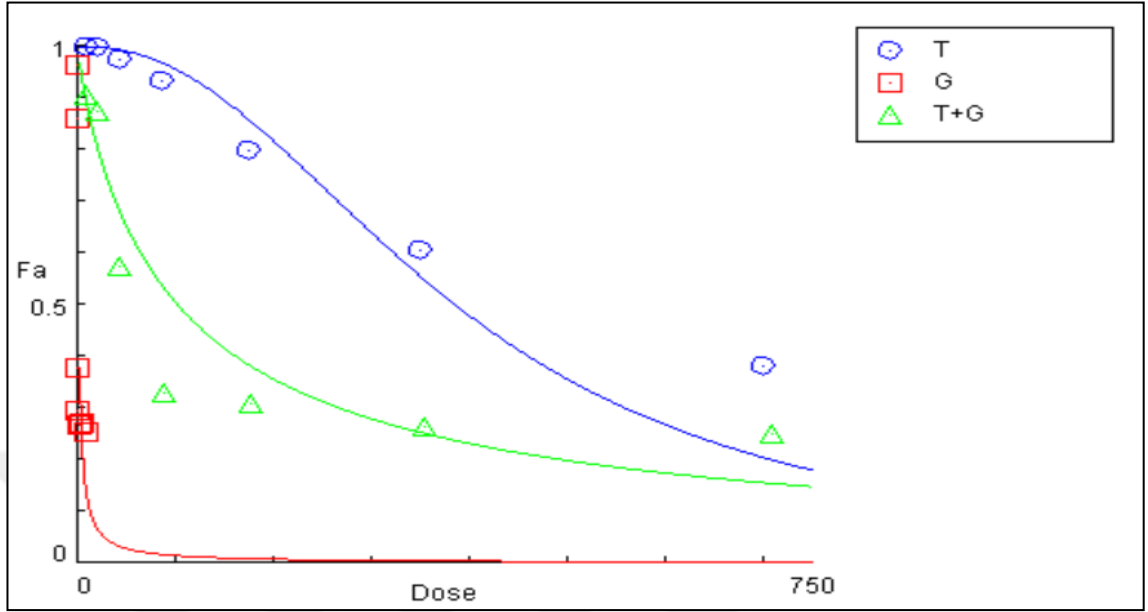


**Şekil Ek-3.1.** 48 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonlarının Dose-Effect eğrisi.

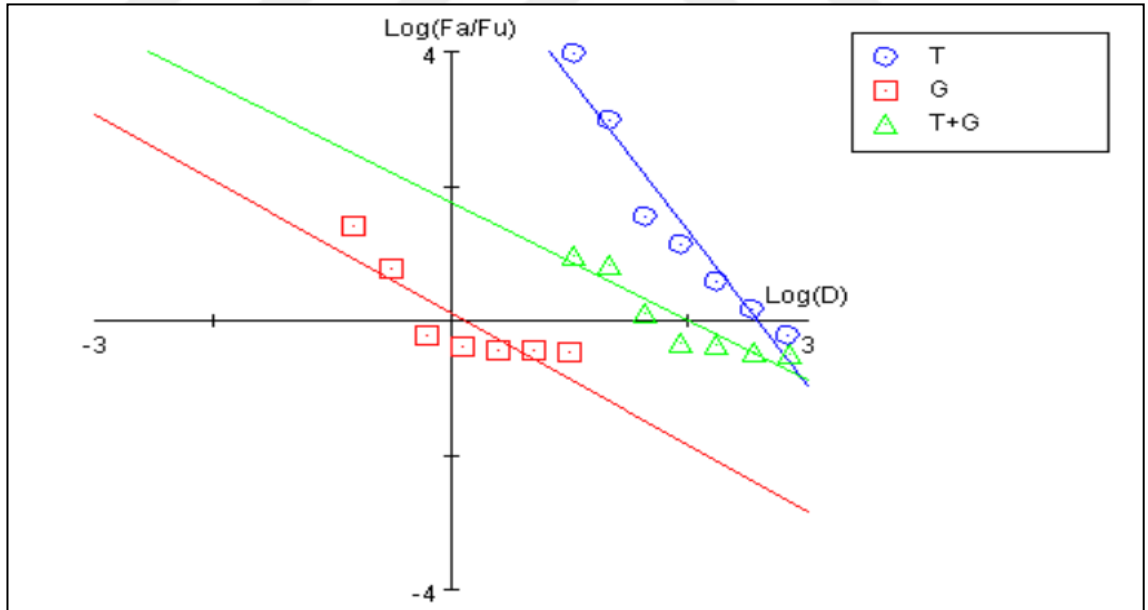


**Şekil Ek-3.2.** 48 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonlarının Median-Effect grafiği.

**EK-4. 72 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonlarının Dose-Effect ve Median-Effect Eğrileri**



**Şekil Ek-4.1.** 72 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonlarının Dose-Effect eğrisi.



**Şekil Ek-4.2.** 72 saat inkübasyon süresinde Trastuzumab, gambojik asit ve kombinasyonlarının Median-Effect grafiği.

## ÖZGEÇMİŞ

Ahmet Çetin, 1979 yılında Ankaranın Şereflikoçhisar ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Şereflikoçhisar' da, lise öğrenimini ise Ankara Hasanoğlan Atatürk Anadolu Öğretmen Lisesinde tamamladı. 2004 Yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği bölümünden mezun oldu. 2009 Yılında Erzincan Binali Yıldırım üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim dalında yüksek lisansa başladı ve 2012 yılında tamamladı. 2012 Yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim dalında doktora programına kabul edildi. 2013 Yılında Erzincan Binali Yıldırım üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim dalında doktora başladı. 2004-2014 yılları arasında özel sektörde, 2014' den sonra ise Devlet okullarında Kimya öğretmenliği yaptı ve halen Erzincan' da Kimya öğretmeni olarak çalışmaktadır.