

**T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**

**BÜYÜME HORMONU GEN ANLATIMI ARTTIRILMIŞ MEME KANSERİ
HÜCRELERİNDE CURCUMİNİN APOPTOTİK HÜCRE
ÖLÜMÜ ÜZERİNE ETKİSİNDE İNFLAMASYONUN ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Buse ÖZAKALTUN
(1600006506)**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

OCAK - 2018

**T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**

**BÜYÜME HORMONU GEN ANLATIMI ARTTIRILMIŞ MEME KANSERİ
HÜCRELERİNDE CURCUMİNİN APOPTOTİK HÜCRE
ÖLÜMÜ ÜZERİNE ETKİSİNDE İNFLAMASYONUN ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Buse ÖZAKALTUN
(1600006506)**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans**

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Tunç AKKOÇ

Doç. Dr. Elif Damla ARISAN

OCAK - 2018

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, her konuda desteğini esirgemeyen, her zaman saygı ve sevgi ile hatırlayacağım değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a,

Tez çalışmam boyunca akademik alanda sahip oldukları bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL, Sayın Doç. Dr. Elif Damla ARISAN ve Sayın Doç. Dr. Pınar OBAKAN'a,

Her zaman desteklerini hissettiğim Araş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ ve Araş. Gör. Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI'na,

Tez çalışmamda yardımları ve destekleriyle yanımda olan sevgili laboratuvar arkadaşlarıma,

Her şeyimi borçlu olduğum, sonsuz sevgi ve fedakarlıkları ile her koşulda arkamda olan, canım annem Buket ÖZAKALTUN, canım babam Adil ÖZAKALTUN, hayatımdaki kritik kararları ile dünyamı değiştiren ve güzelleştiren diğer yarım canım abim Yılmaz ÖZAKALTUN ve eşi canım ablam Ayşe ÖZAKALTUN'a,

Tez çalışmamın gerçekleşmesi için deneysel süreçte İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarlarına vermiş oldukları destek ve olanaklar için teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim sırasında dünyamıza girdiği andan itibaren kalbimize güneş gibi doğan bana ve aileme sevgi, mutluluk, güzellik ve şans getiren bir tanecik yeğenim canım kızım Doğa ÖZAKALTUN'a ve üzerimde büyük emeği olan canım dedem merhum Yılmaz TANINMIŞ'a ithafen...

Ocak, 2018

Buse ÖZAKALTUN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
BÖLÜM I	1
1.1. GİRİŞ	1
1.2. AMAÇ.....	3
BÖLÜM II	4
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Meme Kanseri	4
2.3. Meme Kanseri Epidemiyolojisi.....	8
2.4. Meme Kanseri Etiyolojisi	9
2.5. Meme Kanseri Risk Faktörleri	10
2.6. Meme Kanseri Patogenezi.....	14
2.7. Büyüme Faktörleri ve Meme Kanseri Gelişimi	15
2.8. Büyüme hormonu	16
2.9. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri	18
2.9.1. Cerrahi Yöntem	19
2.9.2. Radyoterapi	19
2.9.3. Kemoterapi	19
2.9.4. Hormonal Terapi	20

2.10. Curcumin.....	20
2.11. Curcumin ve Kanser.....	22
2.12. Sitokinler.....	24
2.13. Curcuminin klinik uygulamaları.....	25
2.14. Atiprimod.....	27
2.15. Atiprimod ve kanser.....	28
2.16. Apoptoz.....	29
2.12.1. Ekstrinsik Sinyal Yolağı.....	30
2.16.2. İntrensik Sinyal Yolağı.....	31
BÖLÜM III.....	33
3.1. MATERYAL VE METOT.....	33
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	33
3.1.2. Hücre Kültürü Donanımları.....	33
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar.....	33
3.1.4. Kullanılan Tamponlar.....	33
3.2. YÖNTEMLER.....	34
3.2.1. Hücre Kültürü.....	34
3.2.2. ELİZA Tekniği.....	35
3.2.3. Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	36
3.2.4. Hücre Sağkalım Analizi.....	36
3.2.5. Floresans Boyama.....	37
3.2.7. Annexin V/PI Boyama.....	38
3.2.8. Gradyent PZR Analizler.....	39
3.2.9. Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Analizleri.....	40
3.2.10. Total Protein İzolasyonu.....	40
3.2.11. Bradford Protein Miktar Tayini.....	40
3.2.12. İmmunoblotlama Yöntemi.....	41

3.2.13. İstatiksel Analiz	41
BÖLÜM IV.	43
4. SONUÇLAR	43
4.1. Curcuminin Prolaktin, IGF-I, IL-6, IL-10 seviyeleri üzerine etkisinin MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücre hatlarında ELİZA ile gösterilmesi	43
4.2. Curcumin'nin BH ve IL-6 anlatımı üzerine etkisinin MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında immunoblotlama ile gösterilmesi	56
4.3. Curcumin'in MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve otokrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında pro-inflammatuar sitokinler üzerine etkisinin gösterilmesi	59
4.4. Atiprimodun curcumin hücre canlılığı üzerine etkisindeki rolünün MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında incelenmesi.....	62
4.5. Curcumin ve atiprimod'un MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve otokrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında hücre ölümü üzerine etkisi	67
4.6. Curcumin ve atiprimod'un MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında hücre döngüsü üzerine etkisi	79
4.7. Curcumin ve atiprimod'un MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında apoptotik hücre ölümü üzerine etkisi	83
TARTIŞMA	94
KAYNAKLAR.....	104
EKLER.....	112
ÖZGEÇMİŞ.....	116

KISALTMALAR

AIF	: Apoptozu indükleyen faktör
Akt	: Protein kinaz B
AP-1	: Aktif protein-1
APS	: Amonyum Persülfat
ARNT	: Aril hidrokarbon reseptörü nüklear translokatorü
Bax	: Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl-2	: B hücreli lenfoma 2
BH	: Büyüme Hormunu
BH+	: Büyüme hormonu anlatımı arttırılmış
BMSC	: Kemik iliği stromal hücreleri
BRCA	: Meme kanseri duyarlılığı
cDNA	: Komplementer DNA
CO₂	: Karbondioksit
COX	: Siklooksijenaz
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DISC	: ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DIABLO	: Bağlayıcı protein
DiOC6	: 3, 3'-diheksiloksakarbosianin iyodür
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktör reseptörleri
EMT	: Epitelial mezenkimal geçişe
ER	: Östrojen Reseptörü
ERK	: Hücre dışı düzenlenmiş kinaz
FASL	: Fas Ligandı

FADD	: Fas ile ilişkili ölüm bölgesi
Fen1	: Flep endonükleaz 1
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HER2/neu	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü
HIF	: Hipoksiyle indüklenen faktör
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HR	: Hormon Reseptörü
HUVEC	: İnsan göbek başı endotel hücrelerinden
IAP	: Apoptoz protein inhibitörü
IL-1β	: İnterlökin 1 β
IL-6	: İnterlökin 6
IL-8	: İnterlökin 8
IL-10	: İnterlökin 10
JAK	: Janus kinaz
JNK	: c-Jun N-terminal protein kinaz
LOX	: Lipooksijenaz
LTHT	: Lütein hormon salgılatan hormon
MAPK	: Mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz
MAPKK	: MAP kinaz kinaz
MAPKKK	: MAP kinaz kinaz kinaz
MCP1	: Monosit kemoatraktan protein-1
MG	: Mammografi
MIP1α	: Makrofaj enflamatuvar protein-1 α
MMP	: Matriks metalloproteinaz
mTOR	: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
MTT	: Metil tiazol difeniltetrazolyum bromür

NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
n.s.	: Non-significant, anlamlı değil
Nrf	: NF-E2 ile ilişkili faktör 2
Omi/HtrA2	: Yüksek sıcaklık gerektiren protein- A2
PARP	: Poli ADP riboz polimeraz
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PI	: Propidyum iyodür
PI3K	: Fosfotidilinositol-3 kinaz
PKC-α	: Protein kinaz C-α
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	: Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
SCID	: Ağır kombine bağışıklık eksikliği
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SKP2	: S-faz kinaz-ilişkili protein 2
SMAC	: İkinci mitokondriumdan üretilen kaspaz aktivatörü
STAT	: Sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatör proteini
TBS	: Tris tamponlu tuz çözeltisi
TEMED	: Tetrametletilendiamin
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TNFR1	: Tip 1 TNF reseptörü
TPA	: 12-O-tetradekanoilflorbol-13-asetat
TRADD	: TNF reseptörüne bağlı ölüm bölgesi
TRAIL	: TNF ile ilişkisi apoptoz indükleyici ligand reseptör
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

SEMBOL LİSTESİ

%	: Yüzde
bç	: Baz çifti
cm	: Santimetre
cm²	: Santimetre kare
cm³	: Santimetre küp
IC₅₀	: Yüzde 50 inhibitör konsantrasyonu
kDa	: Kilo Dalton
mA	: Miliamper
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat derece
V	: Volt
$\Delta\psi_m$: Mitokondri membran potansiyeli
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
μm	: Mikrometre

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Meme kanseri evreleri.	7
Tablo 2. Meme kanserinin biyolojik alt üniteleri.....	7
Tablo 3. Curcumin'nin interlökinler üzerine etkisi.....	25
Tablo 4. RT-PZR'da kullanılan primerlerin optimum bağlanma sıcaklıkları.....	39
Tablo 5. Gradyent PZR bağlanma sıcaklıkları.....	39
Tablo 6. Curcumin'in otokrin BH salınımı yapan MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D meme kanseri hücrelerinde hormon ve sitokinler üzerine etkisi	103
Tablo 7. Curcumin ile beraber atiprimod uygulamasının sadece curcumin uygulamasına kıyasla otokrin BH salınımı yapan meme kanseri hücrelerinde hücre ölümü ve apoptotik ölüm üzerine etkisi.....	103
Tablo 8. Kullanılan cihazların listesi	112
Tablo 9. Hücre kültürü donanımları.....	113
Tablo 10. Kullanılan kimyasalların listesi	113
Tablo 11. %12'lik SDS-PAGE jel içeriği	115

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 Kadınlarda meme anatomisi ¹	5
Şekil 2. Meme kanseri çeşitleri ²	8
Şekil 3. Meme kanseri patofizyolojisi ³	14
Şekil 4. Büyüme hormonu salınımı ve biyolojik fonksiyonları ⁴	17
Şekil 5. Büyüme Hormonu Sinyal Yolağı ⁵	18
Şekil 6. Curcumin'nin keto ve enol formu moleküler iki ve üç boyutlu yapısı ⁶	21
Şekil 7. Curcumin'nin etkili olduğu biyomoleküller ⁷	23
Şekil 8. Bcl-2 ailesi proteinlerinin buldukları homoloji bölgeleri ⁸	24
Şekil 9. Atiprimod moleküler iki ve üç boyutlu yapısı ⁹	28
Şekil 10. Apoptoz; intrinsik ve ekstrinsik sinyal yolakları ¹⁰	32
Şekil 11. MCF-7 hücre hattında BH seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi	43
Şekil 12. MDA-MB-231 hücre hattında BH seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi	44
Şekil 13. MDA-MB-453 hücre hattında BH seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi	45
Şekil 14. T47D hücre hattında BH seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi	45
Şekil 15. MCF-7 hücre hattında IL-6 seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi	46
Şekil 16. MDA-MB-231 hücre hattında IL-6 seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi	47
Şekil 17. MDA-MB-453 hücre hattında IL-6 seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi	47
Şekil 18. T47D hücre hattında IL-6 seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi	48
Şekil 19. MCF-7 hücre hattında IL-10 seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi	49
Şekil 20. MDA-MB-231 hücre hattında IL-10 seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi	49

Şekil 21. MDA-MB-453 hücre hattında IL-10 seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi	50
Şekil 22. T47D hücre hattında IL-10 seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi.....	51
Şekil 23. MCF-7 hücre hattında IGF-I seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi.....	51
Şekil 24. MDA-MB-231 hücre hattında IGF-I seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi	52
Şekil 25. MDA-MB-453 hücre hattında IGF-I seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi	53
Şekil 26. T47D hücre hattında IGF-I seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi.....	53
Şekil 27. MCF-7 hücre hattında prolaktin seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi.....	54
Şekil 28. MDA-MB-231 hücre hattında prolaktin seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi	55
Şekil 29. MDA-MB-453 hücre hattında prolaktin seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi	55
Şekil 30. T47D hücre hattında Prolaktin seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi.....	56
Şekil 31. MCF-7 hücre hattında BH ve IL-6 anlatımının immunoblotlama tekniği kullanılarak gösterilmesi.....	57
Şekil 32. MDA-MB-231 hücre hattında BH ve IL-6 anlatımının immunoblotlama tekniği kullanılarak gösterilmesi.....	57
Şekil 33. MDA-MB-453 hücre hattında BH ve IL-6 anlatımının immunoblotlama tekniği kullanılarak gösterilmesi.....	58
Şekil 34. T47D hücre hattında BH ve IL-6 anlatımının immunoblotlama tekniği kullanılarak gösterilmesi.....	58
Şekil 35. MCF-7 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcuminin interlökinler üzerine etkisinin gösterilmesi	59
Şekil 36. MDA-MB-231 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcuminin interlökinler üzerine etkisinin gösterilmesi	60
Şekil 37. MDA-MB-453 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcuminin interlökinler üzerine etkisinin gösterilmesi	61

Şekil 38. T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcuminin interlökinler üzerine etkisinin gösterilmesi	62
Şekil 39. MCF-7 doğal tip meme kanseri hücre hattında curcumin ve atiprimodun hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi	63
Şekil 40. MCF-7 BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hattında curcumin ve atiprimodun hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi.....	63
Şekil 41. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücre hattında curcumin ve atiprimodun hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi	64
Şekil 42. MDA-MB-231 BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hattında curcumin ve atiprimodun hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi	65
Şekil 43. MDA-MB-453 doğal tip meme kanseri hücre hattında curcumin ve atiprimodun hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi	66
Şekil 44. MDA-MB-453 BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hattında curcumin ve atiprimodun hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi	66
Şekil 45. T47D doğal tip meme kanseri hücre hattında curcumin ve atiprimodun hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi	67
Şekil 46. T47D BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hattında curcumin ve atiprimodun hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi.....	67
Şekil 47. MCF-7 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini PI boyaması ile floresan mikroskopunda gösterilmesi	68
Şekil 48. MDA-MB-231 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini PI boyaması ile floresan mikroskopunda gösterilmesi	69
Şekil 49. MDA-MB-453 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini PI boyaması ile floresan mikroskopunda gösterilmesi	70
Şekil 50. T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini PI boyaması ile floresan mikroskopunda gösterilmesi	71
Şekil 51. MCF-7 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini DiOC6 boyaması ile floresan mikroskopunda gösterilmesi	72

Şekil 52. MDA-MB-231 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini DiOC6 boyaması ile floresan mikroskobunda gösterilmesi	73
Şekil 53. MDA-MB-453 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini DiOC6 boyaması ile floresan mikroskobunda gösterilmesi	74
Şekil 54. T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini DiOC6 boyaması ile floresan mikroskobunda gösterilmesi	75
Şekil 55. MCF-7 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini DAPI boyaması ile floresan mikroskobunda gösterilmesi	76
Şekil 56. MDA-MB-231 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini DAPI boyaması ile floresan mikroskobunda gösterilmesi	77
Şekil 57. MDA-MB-453 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini DAPI boyaması ile floresan mikroskobunda gösterilmesi	78
Şekil 58. T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini DAPI boyaması ile floresan mikroskobunda gösterilmesi	79
Şekil 59. MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik hücre döngüsü üzerine etkisinin PI boyama yöntemi ile gösterilmesi.....	80
Şekil 60. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik hücre döngüsü üzerine etkisinin PI boyama yöntemi ile gösterilmesi.....	81
Şekil 61. MDA-MB-453 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik hücre döngüsü üzerine etkisinin PI boyama yöntemi ile gösterilmesi.....	82
Şekil 62. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik hücre döngüsü üzerine etkisinin PI boyama yöntemi ile gösterilmesi.....	83

Şekil 63. MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin V-PI boyama yöntemi ile gösterilmesi.....	84
Şekil 64. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin V-PI boyama yöntemi ile gösterilmesi.....	85
Şekil 65. MDA-MB-453 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin V-PI boyama yöntemi ile gösterilmesi.....	86
Şekil 66. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin V-PI boyama yöntemi ile gösterilmesi.....	87
Şekil 67. MCF-7 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi.....	88
Şekil 68. MDA-MB-231 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi.....	90
Şekil 69. MDA-MB-453 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi.....	922
Şekil 70. T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi.....	93

ÖZET

Dünya genelinde kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseridir. Kanser kaynaklı ölümler arasında meme kanseri akciğer kanserinden sonra kadınlarda ikinci sırada gelmektedir. Meme kanseri gelişiminde HER2/neu (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2) gibi büyüme faktörleri, östrojen ve prolaktin (PRL) gibi hormonların etkisi bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalara göre postnatal dönemde hipofiz bezinden salınan BH'nin meme tümör biyopsi örneklerinde normal meme epitel hücresine kıyasla artmış olduğu belirlenmiştir. Akromegali hastalığı gibi malign durumların sıklıkla görüldüğü endokrin bozuklukların meme kanseri gelişimini tetiklediği ve BH meme bezi gelişiminde prolaktin gibi indükleyici etkisi olduğu tespit edilmiştir. Otokrin BH anlatımı kazandırılan meme kanseri hücre hatlarında hücre invazyon, metastaz ve kanserojenik artış belirlenmiştir. Curcumin, "Curcuma longa" bitkisinin kökünden üretilen doğal bir bileşik olup, prostat, kolon, servikal, melanoma, pankreas ve meme kanserleri üzerinde anti-oksidan, anti-inflammatuar, anti-proliferatif ve anti-kanserojenik etkisi olduğu görülmüştür. *In vitro* ve *in vivo* kanser modellerinde curcuminin kanser hacmini azalttığı, metastazı engellediği gösterilmiş olsada klinik çalışmalar curcuminin stabilite kaynaklı etkisini azaldığını ifade etmektedir. Ancak NF- κ B inhibitörü gibi görev yapan curcuminin klinik çalışmalarda bazı kemotörapatik ilaçların (5-FU, docetaksel, gemsitamib) karsinojenik etkisini arttırdığı pankreas, kolon ve meme kanseri vakalarında gösterilmiştir. BH sinyalinde anahtar moleküllerden sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT-3)'ün inhibitörü olarak görev yapan atiprimod, anti-inflammatuar, anti-anjiyogenenik ve anti-karsinojenik ajan olarak meme kanseri, melanoma ve hepatosellüler karsinomada etkisi gösterilmiştir. Bu tez ile amacımız, otokrin BH anlatımı kazandırılan MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 ve T47D meme kanseri hücre hatları üzerinde atiprimod'un curcumin uygulamasına bağlı apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin irdelenmesidir. Atiprimod, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 ve T47D hem doğal tip hem de BH anlatımı kazandırılan meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulaması kaynaklı hücre canlılığına ket vurma potansiyelini arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca atiprimodun, curcumin kaynaklı hücre ölümü, mitokondri membran potansiyeline ket vurma potansiyelini ve apoptotik ölümü tüm meme kanseri modellerinde BH anlatımına bağlı kalmadan arttırdığı PI,

DAPI, DiOC6 floresan boyamaları, PI ve Annexin V/PI hücre akış sitometresi ile gösterilmiştir. Böylece atiprimod uygulamasının otokrin BH bağılı curcumine karşı ilaç direncini MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 ve T47 meme kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölüm mekanizmasını aktive ederek gerçekleştirildiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, Büyüme Hormonu, Curcumin, Sitokin, Atiprimod, Apoptoz



SUMMARY

The most common cancer type in women worldwide is breast cancer. Among cancer-related deaths, breast cancer is the second most common cancer after lung cancer in women. Growth factors such as HER2/neu in the development of breast cancer, the effects of hormones such as estrogen and prolactin (PRL) are known. According to recent studies, growth hormone (GH) released from the pituitary gland in the postnatal period was found to be increased in breast tumor biopsy specimens compared to normal breast epithelial cells. Malignant conditions, such as acromegaly, are frequently observed in endocrine disorders, leading to breast cancer development. Like prolactin, GH is found to be an inducer in mammary gland development. Forced GH expression in breast cancer cell lines induced cell invasion, metastasis and carcinogenesis. Curcumin is a natural compound produced from the root of "*Curcuma longa*" and has anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-carcinogenic effects on prostate, colon, cervical, melanoma, pancreas and breast cancers. Although curcumin has been shown to reduce cancer volume, inhibit metastasis *in vitro* and *in vivo* cancer models, clinical studies suggest that the anti-carcinogenic effect of curcumin is declined because of its stability problem in serum samples. However, in clinical trials curcumin, which acts as an NF- κ B inhibitor, has been shown in the pancreatic, colon, and breast cancer cases to increase the carcinogenic effect of some chemotherapeutic drugs (5-FU, docetaxel, gemcitabine). Atiprimod, which acts as an inhibitor of STAT-3 from key molecules in the GH signal, has been shown to be effective in breast cancer, melanoma and hepatocellular carcinoma as anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-carcinogenic agents. The purpose of this thesis is to investigate the effect of atiprimod on curcumin-induced apoptotic cell death on autocrine GH expressing MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 and T47D breast cancer cell lines. Atiprimod significantly increased cell viability induced by curcumin MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 and T47D wild type and GH+ breast cancer cells. It has also been shown that atiprimod has the potential to inhibit curcumin-induced cell death, mitochondrial membrane potential loss, and apoptotic death regardless of GH expression in all breast cancer models according to PI, DAPI, DiOC6 staining, PI cell cycle and Annexin V/PI apoptotic cell death analysis. Thus, it has been determined that atiprimod exposure increased the curcumin

induced apoptotic cell death in MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 and T47D GH+ breast cancer cells.

Key Words: Breast Cancer, Growth Hormone, Curcumin, Cytokine, Atiprimod, Apoptosis



BÖLÜM I

1.1. GİRİŞ

Kadınlarda meme kanseri tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser türü meme kanseridir. Dünya çapında her yıl teşhis edilen tüm yeni kanserlerden onda biri meme kanseri olarak belirlenmektedir. Ayrıca küresel olarak, kadınlarda kanserden ölümün başlıca nedeni meme kanseridir. Dünyada her yıl 1 milyon yeni vaka ile meme kanseri kadınlarda en yaygın görülen kanserdir. Kadınlarda görülen tüm kanserlerin %18'ini oluşturmaktadır [1].

Dünyadaki tüm kadınlarda görülen kanserlerinin %23'ünü meme kanseri oluşturmaktadır. Dünya'da olduğu gibi Türkiye'de de kadınlarda en sık görülen kanser türü 40,6/100.000 insidans ile meme kanseridir. Ayrıca yapılan araştırmalara göre Türkiye'de son on yılda insidans hızı ve prevalansı üç kat artan kanser meme kanseri olarak belirlenmiştir. 2000'li yıllarda meme kanseri insidansının dağılımı, coğrafik, ekonomik, sosyal, kültürel faktörlere bağlı olarak Türkiye'nin farklı bölgelerinde farklılık göstermektedir. Yapılan araştırmalarda Türk kadınlarında 41-50 yaş % 31, 51-70 yaş % 40,7 ve 70 yaş ve üzeri % 8,2 meme kanseri riski olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca hastaların % 14,5'inde ailelerinde meme kanseri öyküsü bildirilmiştir [2].

Meme kanseri gelişiminde çevresel ve genetik faktörler etkilidir. Yaş, fertilité, yaşam tarzı, ultraviyole (UV) gibi çevresel faktörler ve kişinin ailesinden aktarılan aile öyküsü, moleküler değişiklikler meme kanseri gelişiminde önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Meme kanseri hücrelerinde Her-2/neu gibi onkogenlerin ve p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin aşırı ekspresyonu gibi moleküler değişiklikler ve BRCA1/2 (meme kanseri duyarlılığı 1/2) mutasyonları tespit edilmektedir. Meme kanseri patogeneğinde büyüme faktörleri ve son dönemde meme gelişiminde rol alan hormonların önemli rolü oldukları bilinmektedir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), prolaktin ve büyüme hormonu (BH) gibi büyüme faktörleri ile hormonların meme kanseri gelişiminde rolü olduğu bildirilmiştir. Ön hipofiz bezinden salgılanan

BH; insanda büyüme ve gelişmede rol oynayan fizyolojik sistemlere etki eden anabolik bir hormondur. BH, meme hücrelerinde çoğalma ve farklılaşma mekanizmalarında rol almaktadır. BH çok salgılanması durumunda akromegali hastalığına, az salgılanması durumunda nanismus (cücelik) hastalığına neden olmaktadır. Ayrıca fazla BH salgılanması, genetik ve çevresel faktörlerle birlikte meme kanseri gelişimini tetiklediği gösterilmiştir [3]. HER2/neu, BH, östrojen ve prolaktin hormonları gibi bazı büyüme faktörleri meme kanserinin moleküler mekanizmasını kontrol etmektedirler. BH kendi salgılanarak direkt etki gösterebildiği gibi, insülin benzeri büyüme faktörünün (IGF-I) salınımını tetikleyerekte gösterebilir. BH ve IGF-I eksikliğinde meme kanserinin önlenebileceği bildirilmiştir [4].

Meme kanseri tedavi yöntemleri; cerrahi tedavi, kemoterapi, radyoterapi ve hormonal tedavidir. Hastanın; meme kanserinin bulunduğu evre, genetik ve çevresel faktörler gibi etkenler göz önünde bulundurularak uygun tedavi yöntemi uygulanmaktadır. Erken teşhis yapıldığı durumlarda cerrahi yöntem ile tümör dokusu tamamen yok edilebilir, ileri evrelerde ise bazı hastalarda sadece kemoterapi veya radyoterapi, bazı hastalarda da cerrahi yöntemle birlikte kemoterapi ve/veya radyoterapi uygulanmaktadır. Hastanın ihtiyacına göre tüm yöntemler tek veya birlikte kullanılabilirler [5].

Tedavi yöntemlerine ek olarak; Güneydoğu Asya kökenli “*Curcuma longa*” bitkisinin kökünden üretilen bitkisel ajan olan Curcumin bilinen adıyla zerdeçal yüzyıllardır kullanılan doğal anti-inflamatuar, anti-anjiyogenik, anti-oksidan, anti-kanserojen özellikleri ile tedavi edici olduğu bilinmektedir [6]. Curcuminin anti-proliferatif etkisi ile meme kanseri hücrelerinde apoptotik etki oluşturduğu yapılan araştırmalarla kanıtlanmıştır. Ayrıca; sitokinlere, transkripsiyon faktörlerine, enzimlere, büyüme faktörleri ve reseptörlerini düzenleyen genlere etki ederek bir çok sağ kalım sinyal yolağını baskılamakta, invazyon, metastaz ve anjiyogenezi inhibe etmekte ve apoptozu indüklemektedir [7]. Tümör büyümesi ve metastazında rol oynayan ve meme kanserinde eksprese edilen östrojen reseptörü (ER), curcumin ile ER-pozitif (ER+) ve ER-negatif (ER-) hücrelerde proliferasyonun inhibe edildiği bilinmektedir [8]. Ayrıca apoptoz inhibitörleri olarak bilinen kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9 curcumin ile inhibe edildiği gösterilmektedir [9].

Çok sayıda metabolik fonksiyonu olduğu bilinen curcuminin, anti-inflamatuar etkisi NF-κB sinyalini baskıladığı ve pek çok sitokin anlatımı üzerinde etkisi olduğu ve çok sayıda sitokin salınımını inhibe ettiği bilinmektedir. Sitokinler bağışıklık

sisteminde hücreler arası iletişimi yönlendiren salgı proteinleridir. İnflamasyon; tümör oluşumu, büyümesi, anjiyogenez ve metastaz gibi tüm olaylarda sitokinlerin önemli rolü olduğu ve curcumin de sitokinleri etkileyerek bu yolakları yönlendirmekte olduğu bilinmektedir [10].

Atiprimod; anti-inflamatuar etkinliğe sahip katyonik amfilik bir bileşik olarak sinyal transdüksiyon inhibitörü ve anti-anjiyogenez ajanıdır. Bazı sitokinleri, kaspazları, proteinleri ve protein kinazları etkileyerek apoptozu indükleyerek anti-kanserojen özelliği göstermektedir [11].

Biyokimyasal ve genetik yollarla programlanmış, tamir edilemeyen DNA hasarı bulunan mutasyonlu hücrelerin yok edildiği hücre ölümüne apoptoz denilmektedir [12]. Ekstrinsik (dışsal) ve intrinsik (içsel) sinyal yolağı olmak üzere iki yolak üzerinden gerçekleşmektedir. İki sinyal yolağında da bir uyarıcı apoptozun başlamasını sağlamaktadır. Ekstrinsik sinyal yolağında ölüm sinyalleri, intrinsik sinyal yolağında oksitativ stres veya genetik hasar örnek olarak verilebilmektedir. Çeşitli proteinlerin ve kaspazların görev aldığı apoptoz mekanizması; tümör oluşturacak tamir edilemeyen DNA hasarı meydana geldiğinde, kaspaz kaskadının aktivasyonu sonucunda DNA ve hücre iskeleti materyalleri kaspazlar tarafından kesilerek hücreyi ölüme götürmektedir. Bu mekanizma ile kanser oluşumu engellenmektedir. [13].

1.2. AMAÇ

Vücuttaki tüm dokularda postnatal büyümeyi indükleyen ön hipofizdeki somatotrofik hücreler tarafından salınan BH'nin, hücrelerde yüksek miktarda anlatımı meme kanserinin gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir. BH geni içeren PC3.1 plazmiti transfekte edilerek, otokrin BH sinyali kazandırılmış MCF-7, MDA-MB-453, T47D ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimodun hücre proliferasyonu, hücre ölüm yolakları üzerine etkisinde inflamasyonun rolünün gösterilmesi hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda anti-inflamatuar özelliği bilinen atiprimodun curcumin ile birlikte otokrin BH anlatımı kazandırılan MCF-7, MDA-MB-453, T47D ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında hücre büyümesi, hücre döngüsü ve apoptotik ölüm üzerine etkisinin irdelenmesi hedeflenmiştir.

BÖLÜM II

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

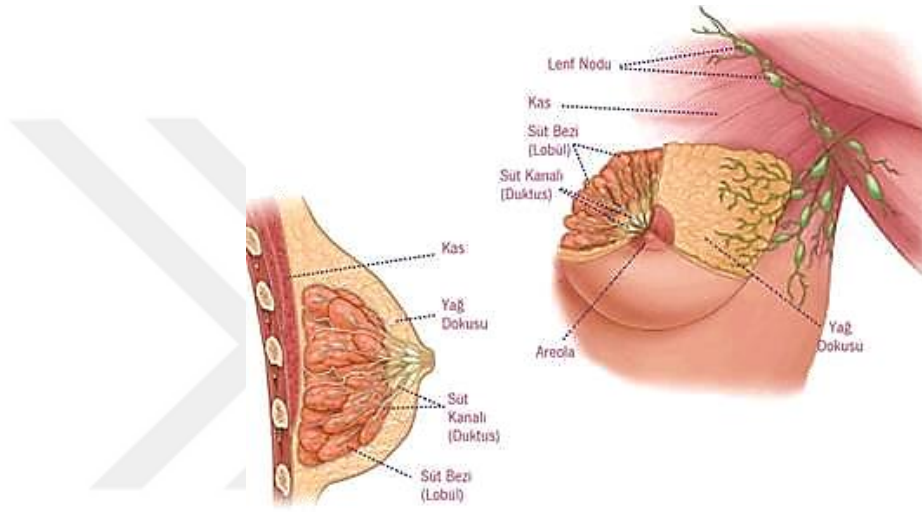
1842 yılında Verona bölgesinde İtalyan cerrah Domenico Rigoni-Stern (1810-1855) tarafından, evli ve evlenmemiş kadınlar arasındaki rahim ve meme kanseri ölümlerini karşılaştırıldığında, meme kanseri riskinin evlenmeyen ve emzirmeyen kadınlarda daha sıklıkla görüldüğü tespit edilmiştir [14, 15]. Meme kanseri dünyada kadınlar arasında bilinen ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Genetik mutasyonlar, epigenetik değişimlerle karakterize olan ve kısmen oksidatif stres de dahil olmak üzere çevresel faktörler tarafından tetiklenen bir hastalık olarak bilinmektedir [16].

Meme kanseri, kadınlarda görülen en yaygın kanser çeşitidir ve kanser vakalarının üçte birini oluşturmaktadır. Ayrıca, meme kanseri, akciğer kanserinden sonra, kadınlarda ölümlerle sonuçlanan vakaların ikinci sebebi olarak gösterilmektedir. Geçmişte görülen meme kanseri vakalarındaki artış geç ve az çocuk sahibi olma gibi üreme modellerindeki değişiklikleri göstermektedir. 1980'lerde görülen meme kanseri vakalarındaki artışın ana sebebi mamografi (MG) kullanımının yaygınlaşmasıdır. MG kullanımıyla beraber teşhis artmış ve böylelikle ileriki yıllarda meme kanserine bağlı ölüm oranı azalmıştır [17, 18]. Ancak meme kanserinin erken teşhisinde tarama ve gözlemin önemi, günümüzde hala erken teşhis bilinci düşük olduğundan meme kanseri bugüne kadar ölümcül bir hastalık olarak kalmıştır [6]. Meme kanser hastalığı morbidite ve mortalitesi günümüzde yüksek olmasından dolayı Dünya çapında bir halk sağlığı sorunu olarak ifade edilmektedir [19].

Uzun yıllardır araştırmacılar tarafından meme kanseri için çeşitli tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Bugüne kadar bulunan tedavi yöntemleri yetersiz kaldığından yeni ve eski yöntemlerin geliştirilebileceği tedavi arayışı devam etmektedir. Mevcut meme kanseri tedavisi bir veya birkaç ilacın/tedavinin kombine halinde uygulanması ile yapılmaktadır. Ayrıca tedavi için curcumin gibi doğal

ürünlerde uygulanmaktadır [20]. Yeni sitotoksik bileşiklerin tanımlanması immünofarmakoloji alanında yeni ilaçların üretilmesi için araştırmaların çoğalmasına neden olmaktadır [21].

Meme kanseri meme epitel dokusundaki malignant hücrelerin kontrolsüz büyümesiyle karakterize edilmiştir. Dünya çapında meme kanseri kadınlarda yaşla artış gösteren, en çok görülen kanser çeşididir [1]. Günümüzde MG meme kanserinin teşhisi için kullanılan en yaygın ve en etkili tarama yöntemi olarak kabul edilmektedir. Erken teşhis için MG'nin büyük önem taşıdığı bilinmektedir [22] (Şekil 1).



Şekil 1 Kadınlarda meme anatomisi. Meme dışındaki meme başı ve areola göstermiştir. Meme lenf düğümleri, lobları (süt bezleri kümesi), lobülleri (süt bezi), süt kanalları gösterilmiştir ¹

2.2. Meme Kanseri ve Metastaz

Meme kanseri metastazı 5 ayrı adımda gerçekleşmektedir. İlk adım, meme kanseri hücrelerini içeren tümörlü hücreler ana tümör dokusundan ayrılarak; ikinci adımla, tümörlü hücreler komşu dokulara göç ederler; üçüncü adım olarak, endotelial tabakayı aşarak kana karışırlar ve lenf damarlarında tümörlü hücre olarak dolaşırlar; dördüncü adımda, bu tümörlü hücreler dolaşımdan sonra kan yoluyla ya da lenf damarlarınca atılmaktan kurtulmak için ikincil dokulara tutunurlar; son adım ise; uzak dokulara göç eden tümörlü hücreler metastazı gerçekleştirir [23-25]. Metastaz oluşumu boyunca tümörlü hücrelerin değişimi ve adaptasyonu, fenotiplerinde ve işlevselliğinde çeşitli değişikliklere yol açtığı tespit edilmiştir. Bu varyasyonlar yeni dokulardaki hücrelerde fizyon ya da entoz yoluyla yeni tümörlü hücreler oluşturmaktadır. Tümörlü hücrelerdeki bu heterojenlik spesifik müdahaleyi gerekli

kılmaktadır. Bu nedenle, erken teşhisle uygulanan erken müdahale çok daha az çeşitlilikte tümörlü hücre ile savaşmak anlamına gelir; ve bu da metastaz oluşumunu engellemeyi amaçlayan tedavi yöntemlerini daha ümit verici terapötik yaklaşımlar sağlamaktadır [26].

Meme kanseri evreleri tümörün yayılımı ve ciddiyeti hakkında bilgi veren ve buna bağlı olarak uygun tedavi yöntemlerinin seçilmesi için yol gösteren belli standartlara dayalı sisteme TNM Evreleme Sistemi denir. T: tümör boyutu, N: aksiller lenf nodlarına yayılım, M: uzak bölgelere yayılım olarak ifade edilmektedir [27].

Amerikan Kanser Ortak Komitesi (American Joint Committee on Cancer/AJCC) tarafından 2017’de yayınlanan kriterleri:

Tis: Karsinom *in situ*.

T0: Primer tümör bulgusu yoktur.

T1: En büyük boyutu ≤ 20 mm olan tümör mevcuttur.

T2: En büyük boyutu >20 mm ve ≤ 50 mm olan tümör mevcuttur.

T3: En büyük boyutu >50 mm olan tümör mevcuttur.

T4: Meme duvarına ve deriye doğrudan genişlemiş olan herhangi bir boyuttaki tümörler (ülserasyon veya makroskopik nodüller) mevcuttur, sadece alt deriye istilası T4 olarak nitelendirilemez.

N0: Görüntüleme ve klinik muayenede bölgesel lenf nodu metastazı ve tümör hücreleri tespit edilmemektedir.

N1: Hareketli ipsilateral seviyedeki 1 ve 2 aksiller lenf nodlarına metastaz oluşturmaktadır. Mikrometastazlar; 1-3 aksiller lenf nodlarında metastazlar ve/veya sentetik lenf nodu biyopsisi ile, mikrometastazlar veya makrometastazlar ile klinik olarak negatif internal meme lenf nodlarında mevcuttur.

N2: Klinik olarak belirlenmiş ipsilateral seviyedeki 1 ve 2 aksiller lenf düğümlerinde metastazlar bulunmaktadır. 4-9 aksiller lenf nodlarında veya iç meme lenf düğümlerinde metastazlar mevcuttur.

N3: 10 veya daha fazla aksiller lenf nodlarında metastazlar mevcuttur. İnfranklavikular (seviye 3 aksiller) lenf düğümlerinde; pozitif ipsilateral internal meme lenf düğümlerinde, bir veya daha fazla pozitif 1 ve 2 aksiller lenf nodu varlığında görüntülenmiş; klinik olarak negatif ipsilateral internal meme lenf düğümlerinde sentinel lenf nodu biyopsisi ile 3’den fazla aksiller lenf nodu ve mikro veya makrometastazlar, ipsilateral supraklaviküler lenf düğümlerinde mevcuttur.

M0: Uzak metastazların klinik veya radyolojik kanıtı yoktur.

M1: Klinik, radyolojik, histolojik olarak kanıtlanmış 0.2 mm'den büyük metastazlarla saptanan uzak metastazlar mevcuttur [27] (Tablo 1).

Tablo 1. Meme kanseri evreleri.

Evre 0	T*is N ₀ * M ₀ *
Evre 1	T ₁ N ₀ M ₀
Evre 2A	T ₁ N _{1mic} M ₀
Evre 2B	T ₀ N ₁ M ₀ T ₁ * N ₁ M ₀ T ₂ N ₀ M ₀ T ₂ N ₁ M ₀
Evre 3A	T ₃ N ₀ M ₀ T ₀ N ₂ M ₀ T ₁ * N ₂ M ₀ T ₂ N ₂ M ₀ T ₂ N ₂ M ₀ T ₃ N ₁ M ₀ T ₃ N ₂ M ₀
Evre 3B	T ₄ N ₀ M ₀ T ₄ N ₁ M ₀ T ₄ N ₂ M ₀
Evre 3C	Herhangi T N ₃ M ₀
Evre 4	Herhangi T N M ₁

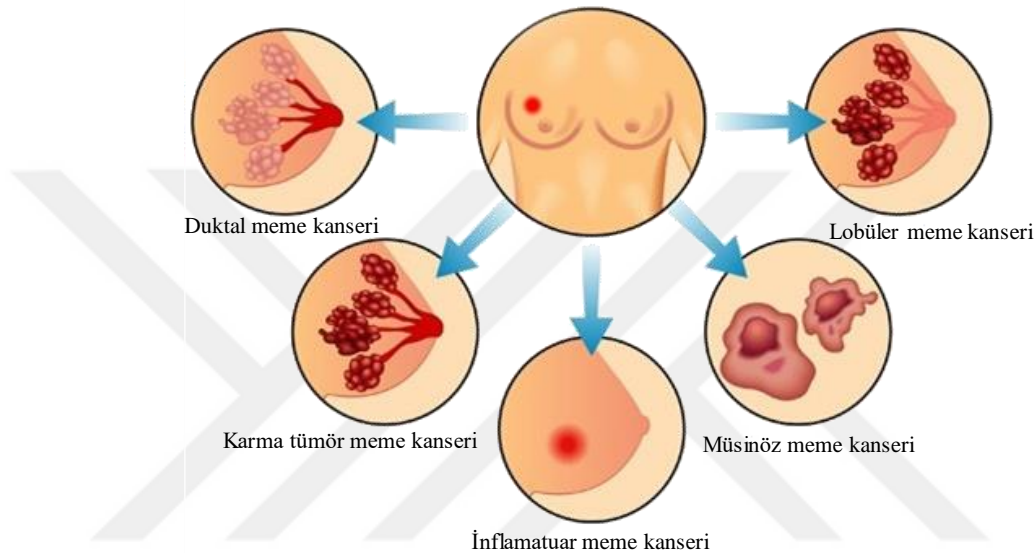
Meme kanseri 5 biyolojik alt üniteye ayrılmaktadır. Luminal A, Luminal B Her2⁻ (Normal), Luminal B Her2⁺ (Luminal B), Her2⁺, Bazal (Tablo 2). Meme kanserinin gen anlatımı açısından sınıflandırılması;

Tablo 2. Meme kanserinin biyolojik alt üniteleri

Luminal A:	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁻	örnek hücre hattı: MCF-7, T47D
Normal (Luminal B Her2 ⁻):	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	örnek hücre hattı: MDA-MB-231
Luminal B (Luminal B Her2 ⁺):	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁺	örnek hücre hattı: BT474, ZR-75
Her2 ⁺ :	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺	örnek hücre hattı: MDA-MB-453, SKBR3
Bazal:	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	örnek hücre hattı: MDA-MB-468

Östrojen bir nükleer transkripsiyon faktörü olup, progesteron östrojene bağımlı gen tarafından kodlanmaktadır. Östrojen ve progesteron için nükleer reseptörler normal meme bezi epitelinin büyümesi ve farklılaşması için önemli rol oynamaktadır. Bunların meme kanserinde ekspresyonu terapötik yanıtın en önemli belirleyici faktör olarak belirlenmiştir [28].

HER2 normal meme bezi epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunan, meme kanserlerinin yaklaşık %20'sinde eksprese edilen hücresel proliferasyonda görevli bir moleküldür. HER2 ekspresyonu meme kanserinde en önemli prognozistik faktör olarak görülmektedir [29]. DNA farklılaşmasına hücresel yanıtla ilişkili baskılayıcı genler; BRCA1 ve BRCA2'dir. Bu genlerin kalıtsal mutasyonları, meme kanseri riskini arttıran faktörler arasında bulunmaktadır [30]. Meme kanseri çeşitleri şekilde gösterilmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. Meme kanseri çeşitleri; Duktal meme kanseri (süt kanallarında), Lobüler meme kanseri (süt bezlerinde), Karma tümör meme kanseri, İnflamatuvar meme kanseri (iltihaplı) ve Müsinöz meme kanseri gösterilmiştir ²

2.3. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri vakalarının insidans ve mortalite oranları ülkeden ülkeye farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. İngiltere, Hollanda, Uruguay ve Yeni Zelanda'da kadınlar arasında meme kanserinden ölüm oranı en yüksekken (25/100.000), Doğu Asya ve Latin Amerika ülkelerinde en düşüktür (10/100.000) [31]. Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute) tarafından 1973'den beri yapılan Gözetim Epidemiyoloji ve Vaka Sonuçları (Surveillance, Epidemiology, and End Results) programı kapsamında Amerika'da tüm kanser vakalarının ve sonuçlarının istatistiği tutulmuştur. Amerika'da 2017 yılında kadınlar arasında, tahmin edilen meme kanseri vakalarının sayısı 252.710 iken, tahmin edilen ölüm sayısı 40.610'dur. Erkeklerde ise aynı yıl için tahmin edilen vaka sayısı 2.470 iken, tahmin edilen ölüm sayısı 460 olarak

belirlenmiştir [32]. Dünya’da olduğu gibi Türkiye’de de kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür (40,6/100.000). Ulusal kanser istatistiklerine göre son on yılda insidansı giderek artmaktadır [2]. 2012 yılında Dünya çapında kadınlar arasında meme kanseri % 29’u yeni kanser olan vakalar ve % 14’ü kanser ilişkili ölümler olarak rapor edilmiştir [33]. Halk sağlığında daha iyi terapötik yöntemler ve majör gelişimler yaşam ömrünü arttırmaktadır. Birleşik devletlerde meme kanseri erkeklerde nadir görülmekte, tüm meme kanseri hastalıkları ile kıyaslandıklarında % 1 ve erkeklerde kanser ilişkili ölümlerin % 0,1’inden daha az olduğu görülmektedir [34].

Meme kanserinden ölüm oranındaki küresel en büyük düşüş erken bir aşamada mevcut tedavilerin uygulanmasından kaynaklanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kanser kontrol programının hedefi; dünya çapında kanser terapilerine erişilmesini teşvik eden sosyal yardım yaklaşımı olduğu için meme kanseri ulusal sağlık programlarında, hastaların teşhis ve tedavisinde hastalığın daha erken bir aşamasında teşhis edilmesi birinci önceliktir [35].

Türkiye’de son on yılda insidans hızı ve prevalansı üç kat artmıştır. Son yıllarda meme kanseri insidansının dağılımı, coğrafik, ekonomik, sosyal, kültürel faktörlere bağlı olarak Türkiye’nin farklı bölgelerinde farklılık göstermektedir. Tanı evresi ve Türkiye’nin doğu-batı bölgesi arasındaki etkili tedaviler açısından büyük farklılıklar vardır. Türkiye’nin doğusunda daha kısa sağlıklı yaşam süresi, teşhis ve tedavi için sınırlı kaynaklarla birleştiğinde; ayrıca meme sağlığı bilinci eksikliği, sosyal, kültürel ve eğitimsel faktörler hastalığın geç teşhisini sağlayarak kötü sonuçları beraberinde getirmektedir. Erken meme kanseri tespiti ve kapsamlı kanser tedavisi, meme kanseri sonuçlarının iyileştirilmesinde etkin rol oynamaktadır. Yapılan araştırmalarda Türk kadınlarında 41-50 yaş % 31, 51-70 yaş % 40,7 ve 70 yaş ve üzeri % 8,2 meme kanseridir. Hastaların % 14,5’inde ailelerinde meme kanseri öyküsü bulunmaktadır [36].

2.4. Meme Kanseri Etiyolojisi

Meme kanseri etiyolojisi kavramları hızla değişmektedir. Özellikle kalıtsal ve kalıtsal olmayan faktörler meme kanseri etiyolojisi için önemlidir [37]. Meme kanseri etiyolojisi tam olarak anlaşılacakla birlikte yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre; kalıtım, erken menapoz, geç menarş, geç doğum, obezite, nulliparite (hiç çocuk sahibi olmama), fazla yağlı beslenme, yaş, çevresel toksinler, alkol, sigara,

radıyografılere maruz kalma, oral kontraseptıfler, hormon terapisı ve dığer ekzojen östrojenler gıbi üreme ve endokrin faktörleri içeren çok yönlü etkenlerin meme kanseri etiyolojisini oluşturduğu bildirilmiştir [38]. Meme kanseri etiyolojisinin iyi bilinmesi meme kanserinden koruyucu programları geliştirmek için önemli bir yol haritasıdır [39].

2.5. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri etiyolojik olarak heterojen bir hastalıktır ve epidemiyolojik çalışmalar göstermektedir ki belirli alt gruplar hastalığa yakalanma risklerini oluşturmaktadır [40].

2.5.1. Yaş ve Üreme ile İlgili Faktörler

Artan yaş çoğu kanser için en önemli risk faktörüdür. Meme kanseri riski yüksek yaşla ilişkili olduğu bir çok çalışmada tespit edilmiştir [41]. Üreme faktörleride meme kanserini doğrudan etkileyen risk faktörlerindedir [42]. Üreme ömrü uzadıkça meme kanseri riskide arttığı görülmüştür. Erken yaşta menarşi, geç yaşta menopoz ve geç yaşta ilk doğum kadınlarda meme kanseri riskini arttırdığı araştırmalar sonucunda kanıtlanmıştır [43]. Epidemiyolojik araştırmalarda menarşi ve menopoz arasında salgılanan siklin hormonların hastalığın etiyoloji üzerinde etkileri olduğu düşünölmektedir [44].

2.5.2. Ailesel Geçmiş

Ailesel meme kanseri geçmişine sahip vakalarda meme kanseri riskinin arttığı bir çok çalışmada gösterilmiştir [45]. Bir çok epidemiyolojik çalışmada da görüldüğu gibi ailesinde meme kanseri hikayesi olan kadınlarda meme kanseri riski belirli alt gruplarla ifade edilmektedir. Bunlar; erken yaşta meme kanseri teşhisi konulmuş birinci dereceden akrabaya sahip kadınlar, birden fazla akrabasında meme kanseri bulunan kadınlar, aile öyküsünde yumurtalık kanseri bulunan kadınlar ve iki taraflı meme kanseri olan akrabası bulunan kadınlardır [46]. En az bir tane meme kanseri hastası birinci dereceden akrabası olan kadınlarda meme kanseri riski 2,3; en az bir tane ikinci dereceden akrabası meme kanseri olan kadınlarda meme kanseri riski 1,5; hem annesi hem kız kardeşi meme kanseri olan kadınların meme kanseri olma riski 14,48'dir [47]. Ayrıca meme kanseri riski ile iki taraflı meme kanseri varlığı arasındaki

ilişki araştırıldığında; başlangıç yaşının etkili olduğu ve erken yaşta iki taraflı meme kanseri olan kişilerin yakınlarının meme kanseri riski yüksek olduğu görülmüştür [48]. Genetik analizler kişide meme kanserinin varlığını ve artan duyarlılığı ile bağlantılı otozomal dominant kalıtsal genler kesin kanıtlar ortaya koymaktadır [49]. Taşıyıcılara karşı non taşıyıcılar azalan yaşla birlikte riskin arttığı, genç meme kanseri vakalarının yaşlı meme kanseri vakalarına oranla gen taşıyıcılarının daha fazla bulunduğu görülmektedir [50].

2.5.3. Yaşam Tarzı

Meme kanseri riskini arttıran diğer faktörler ise yaşam tarzımızla doğrudan bağlantılıdır [51]. Obezite, diyet, laktasyon, kürtaj, fiziksel aktivite, sigara ve alkol kullanımı örnek verilebilir [52]. Araştırmalarda meme kanseri oluşumunda kalıtsal veya çevresel faktörlerin kaynaklandığını tam anlamıyla bilinmemektedir [53]. Bazı araştırmacılar; meme kanseri kalıtsal bileşenin yalnızca sigara, diyet ve güneşe maruz kalma gibi çevresel faktörlerle bağlantılı olduğunu düşünmektedirler [54]. Genetik aracılıyla aracılık edilen kadınlarda çevresel risk faktörlerine tepki olarak hücrelerin anormal farklılaşmasına neden olan faktörler olabilmektedir [55]. Genetik faktörler, hormonal veya diğer uyaranların kontrolü yoluyla neoplastik olarak transforme edilmiş hücrelerin neoplastik transformasyonu veya ekspresyonunu ve bu uyaranlara hücrel tepkiyi etkilediği tespit edilmiştir [56, 57]. Diyet ve egzersiz içeren daha sağlıklı bir yaşam tarzı benimsemek meme kanseri riskini azaltmanın bir yoludur. İnsülin düzeyinde ve inflamatuvar reaksiyonda azalma ile hücrel bağışıklıkta iyileşme göstererek meme kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir. Hastalık varlığında fiziksel aktivite; hastalığın evrelendirme modifikasyonunu, vücut kitle indeksi ve ER'lerin durumu ile ilişkilendirilmektedir [58].

Kemoterapi sırasında egzersiz ilaçların veya dozajlarının değiştirilmesine gerek kalmadan tedaviyi tamamlayıcı olduğu görülmüştür. Fiziksel aktivite, kemoterapide kullanılan ilaçların etki dağılımı ve metabolizması üzerindeki etkisini güçlendirdiği bildirilmiştir [59]. Beslenme alışkanlıkları kanser etiyolojisinin yaklaşık %35'ini oluşturur. Meme kanserini önleyici diyet tavsiyeleri alkol kullanımını, kırmızı et ve yağ tüketim miktarını azaltmayı, çeşitli besin kaynaklarından fiber, D vitamini ve fitoöstrojen alımını arttırmayı içerir [60]. Alkolün meme kanseri mekanizmasına etkisi üç faktörle açıklanabilir: ilk olarak; alkol, hücre içi östrojen seviyesini arttırarak meme kanserini riskini artırır; bir diğer etkisi ise, alkol asetaldehid ve reaktif oksijen türleri

(ROS) üretmesi sonucunda DNA modifikasyonuna sebep olmasıdır [61]. Bu DNA modifikasyonlarının oluşumu; protein eklenmesi, kromozomal sapma ve DNA nokta mutasyonu şeklindedir [62]. Ayrıca alkol, folik asit emilimini engellediğinden DNA onarım mekanizmasına müdahale etmektedir [63-65].

Beslenme alışkanlıklarını değiştirerek; fitoöstrojenlerin ve D vitamininin meme kanseri riskini azalttığı kanıtlanmıştır. Fitoöstrojenler bitki kaynaklıdır ve üçe ayrılırlar ancak çalışmaların çoğu izoflavonlar üzerinedir, çünkü; yapıları memeli östrojenlerine benzemektedir. İzoflavonlar, östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojenin reseptörlere bağlanmasını tamamen engeller [66]. D vitamininin ise, kanserli hücrelerin invazyonu ve metastazını engelleyen potansiyel antiyojenik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir [67, 68].

2.5.4. Çevresel Faktörler

Kimyasal ajanlar, radyasyon ve UV ışınları DNA tamirinde hata oluşturarak meme kanseri gelişimini etkileyen önemli risk faktörleri arasındadır. Radyasyona uzun süre maruz kalan kişilerde kanser riski artmaktadır. Ayrıca; yumurtalık aktivitesi genel olarak meme kanseri üzerine etkili olduğu bilinmektedir. Bu gibi aktiviteler özellikle de menarş yaşı, beslenme durumu ve minimum vücut gelişim endeksine ulaşılması ile ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Buna bağlı olarak yüksek sosyo-ekonomik durum; artan gıda alımı ve boy üzerine etkisi nedeniyle, erken yaşta gelişen vücut, erken menarş aktivitesi ile meme kanseri riskini arttırmaktadır. Ek olarak; kentsel yerleşimde eğitim ve iş nedeniyle daha geç yaşta evlenen insanların daha geç yaşta çocuk sahibi olması da meme kanseri riskini arttırmaktadır. Emzirme ise meme kanseri riskini azaltan bir etkidir. Geç çocuk sahibi olan bireylerde emzirme ileri yaşlarda olacağı için meme kanseri riskide artmaktadır [69].

2.5.5. Moleküler Değişimler

Onkogenlerin (örneğin; Her-2/neu) ve tümör baskılayıcı genlerin (örneğin; p53) aşırı ekspresyonu gibi moleküler değişiklikler meme kanseri hücrelerinde tespit edilen değişikliklerdir. Ancak vakaların %100'ünde bu şekilde değişiklikler görülmez. Moleküler değişimlerin vakalarda farklılık göstermesi meme kanserinin etiyolojisinin alt gruplarının göstergesidir. Bilinen moleküler değişimler ile meme kanseri ve meme kanseri tedavisiyle ilgili bilinen ve şüphelenilen risk faktörleri arasındaki ilişkinin irdelenmesi meme kanseri riski yüksek olan kadınlarda risk faktörlerinin alt gruplarını

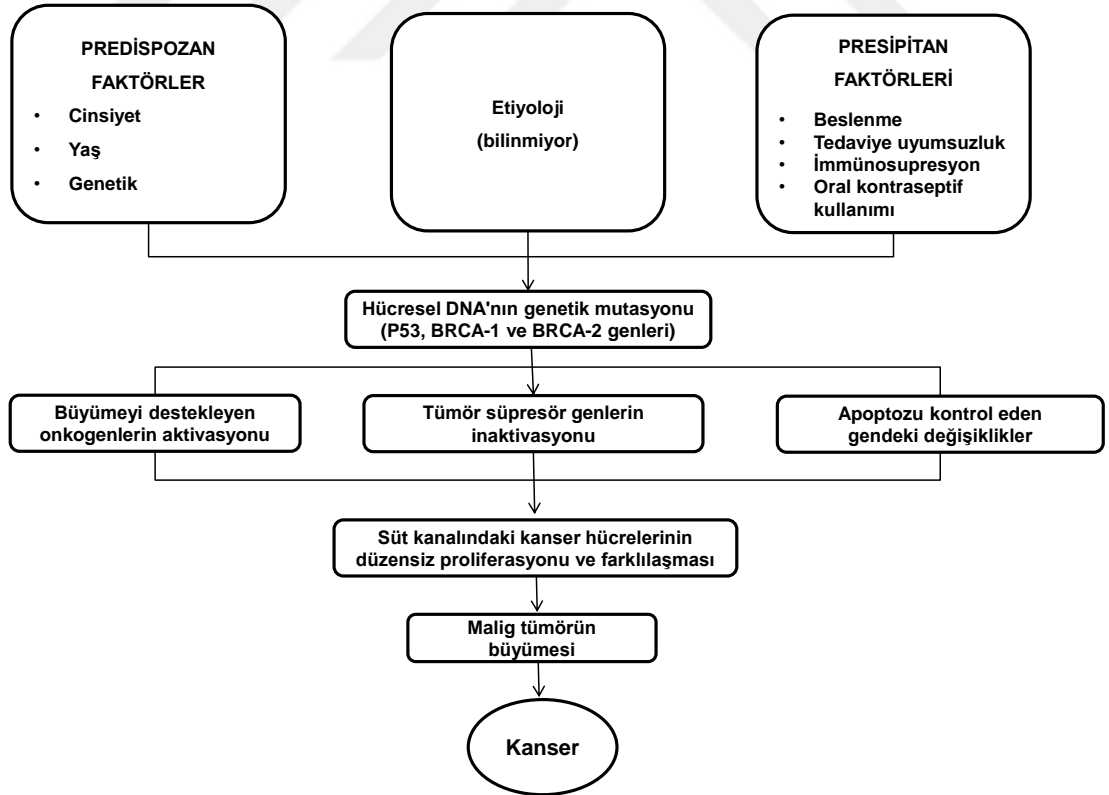
oluşturmakta yardımcı olmaktadır. Meme kanseri risk faktörlerini tanımlayan bir çok epidemiyolojik çalışma olmasına rağmen meme kanseri risk faktörlerinin moleküler değişimler ile ilişkisi kanıtlanmamıştır [70].

Meme kanseri olan hastaların % 10'u otozomal dominant duyarlılık allellere bağlı olduğu, BRCA1 ve BRCA2 (BRCA: mutant alel) genlerinde spesifik mutasyonlar kalıtsal meme kanseri duyarlılığının çoğunu oluşturmaktadır [71]. Meme kanseri öyküsü taşıyan kadınlar, yılda % 5 gibi yüksek bir oranda kontralateral hastalık riski taşırlar [72]. Erkeklerde BRCA2 mutasyonu taşıyanların meme kanseri riski artmaktadır [73]. BRCA1 veya BRCA2 genindeki mutasyonlar over (yumurtalık) kanseri ve diğer primer kanserlere neden olabilmektedir [74]. Genetik ve epigenetik değişimler BRCA1/2 mutasyonları gibi meme kanserinde riski etkilemektedir [75, 76]. Bu riskler BRCA1 mutasyonu taşıyanlar için % 65-81 ve BRCA2 mutasyonu taşıyanlar için %45-85 oranında risk artmaktadır [77, 78]. Meme kanserinin bu sınıflandırması hem histopatolojik hem de moleküler karakteristiğe bağlı yapılmıştır. Histolojik olarak meme kanseri *in situ* karsinoma, *in situ* duktal karsinoma ve *in situ* lobular karsinoma ya da invaziv karsinoma olarak 7 alt üniteye ayrılır [75]. Ayrıca meme kanserinin moleküler sınıflandırılması protein ekspresyonuna bağlı olarak ER, progesteron reseptörü (PR), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2), HER1 ve bazal sitokeratin gibi çeşitli markırlara göre yapılmaktadır [75]. Üçlü negatif meme kanserleri (TNBC) meme kanserinin moleküler sınıflandırılmasında kullanılan üç markırında negatif profil sergilemesidir, yani ER-, PR- HER2- olması durumudur [79]. TNBC'ler genellikle daha genç kadın popülasyonunda, 50 yaşın altında farklı istatistiklere göre %10 ve %17 veya %10 ve %24 arasında artış göstermektedir [80]. TNBC'ler agresif moleküler tip olarak hastalarda metastaz yapması daha yüksek oranda ve moleküler tiplerle karşılaştırıldığında risk oranı daha fazladır [81]. Kanserin bu moleküler tipi için standart terapi taksanez, antrasiklinler ve siklofosamid gibi ajanlar içerir [82]. Ayrıca HER2 meme kanserine benzerdir [83]. Diğer terapötik stratejiler poli ADP riboz polimeraz (PARP) inhibitörleri, epidermal büyüme faktör reseptörleri (EGFR) inhibitörleri, Src ailesi kinaz inhibitörleri ve antiandrojenlerin kullanımını içerir. Negatif meme kanserlerinin düşük bir yüzdesinde fosfatidilinositol-3'kinaz (PI3K) sinyal yolağının inhibisyonu ile PI3K/Akt (protein kinaz B)/mTOR (rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi) yolağı aktive edilir [83]. TNBC'ler agresif davranış göstermesi lenfosit popülasyonunun yüksek yoğunluğu ile ilişkilidir [84].

2.6. Meme Kanseri Patogenezi

Proliferatif meme anomalileri meme kanseri riskinde artışa neden olur. Duktal hiperplazi, intraduktal papillomalar, sklerozan adenoz ve fibroadenomlar gibi atipiksiz proliferatif meme lezyonları; meme kanseri oluşum riskini genel nüfusun yaklaşık 1,5-2 kata kadar yükseltir [85]. Duktal ve lobüler dahil olmak üzere atipik hiperplazi genellikle tarama MG'sinde bulunur ve meme kanseri riskinde önemli artış göstermektedir. Atipik hiperplaziye sahip kadınlar popülasyona kıyasla yaklaşık 4,3 kat daha fazla kanser riski taşırlar [86].

Yumurtalıklar ve böbrek üstü bezleri tarafından üretilen üreme hormonlarının, meme kanserinin patogeneziinde yer aldığı bilinmektedir. Hormonlara tepki vermeyen kanserler kadın üreme periyodunda kayda değer bir insidans değişikliği göstermemektedir. Yaşlanma ile meme kanseri insidansının yükselişi ve meme kanseri patogeneziinde steroid hormonların rolünü desteklemektedir. Meme kanserinin patogeneziinde etken faktörlerden hangisinin baskın rol oynadığı hala net değildir [87] (Şekil 3).



Şekil 3. Meme kanseri patofizyolojisi ³

2.7. Büyüme Faktörleri ve Meme Kanseri Gelişimi

Meme kanserinin moleküler mekanizmasını bazı büyüme faktörleri kontrol etmektedir. Bunlar; HER2/neu, östrojen ve prolaktin hormonlarıdır. Son yapılan araştırmalarda görüldüğü gibi prolaktin yanısıra BH'da meme bezi gelişimiyle ilişkili olduğu ve ergenlik çağındaki duktal epitel farklılaşmasında büyük rolü olduğu bildirilmiştir [88]. Memede bulunan karsinomalarda hem BH hem de büyüme hormonu reseptörünün (BHR) ekspresyonu varlığı saptanmıştır [89]. Postnatal büyüme sırasında kemik ve kas üzerindeki etkisini gösteren aktif IGF-I için aktif BH sinyali gerekmele birlikte, meme karsinomasında parakrin ve otokrin büyüme sinyalleri belirlenmiştir [90]. Bu kanıtı destekleyen meme kanseri hastalarında serum BH seviyelerinde artış görülmüştür [91]. Tüm bulgular; ergenlikten sonra serum BH seviyesini aşan akromegali hastalar arasında meme kanseri vakalarının yüksek oranda mevcut olması ile desteklenmektedir [92].

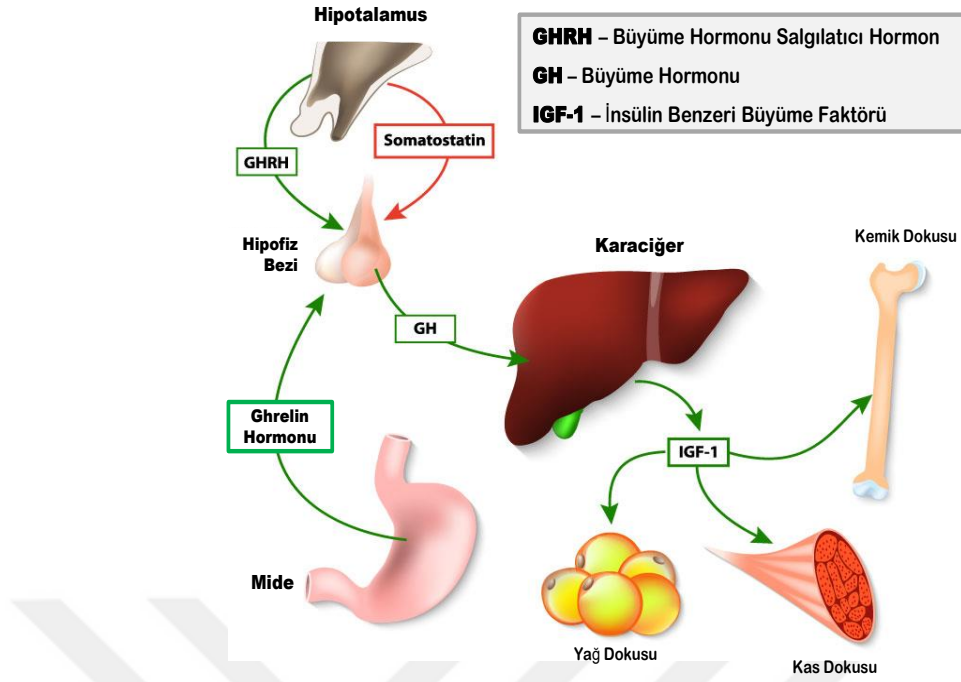
Mukhina ve arkadaşları tarafından otokrin BH sinyalinin epitelial mezenkimal geçişe (EMT) yol açarak, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde occludin ve fibronektin ekspresyon seviyelerini arttırması sayesinde metastatik profil oluşumuna neden olmuştur [93]. Ayrıca; ER negatif MDA-MB-453 ve SKBR-3 meme kanseri hücrelerinde arttırılmış BH ekspresyon aracılı tümörögenез ve metastaz olduğu görülmüştür [94]. Otokrin BH kazandırılan MCF-7 hücrelerinde p38 ve p44/42 sinyalinin indüklendiği tespit edilmiş, ancak hem p38 hem de p44/42 inhibitörleri olan SB203580 ve PD98059 sırası ile MCF-7 BH+ hücrelerinde BH sinyaline bağlı p38/p44/42 inaktive ederek proliferasyonunu engellediği gösterilmiştir [95]. Ayrıca otokrin BH sinyali, MCF-10 meme epitel hücrelerinde anormal hücre proliferasyonunu ve apoptotik hücre ölümünün önlenmesine yol açan siklin-D1, c-myc, B-hücreli lenfoma 2 (Bcl-2)'nin artması ile onkojenik dönüşümü tetikledi [96]. Meme kanseri hücrelerinde mitomisin C [97], tamoksifen [98], daunorubicin [99] ve doksorubisin [100] gibi ilaçlara karşı BH aracılı kemorezistansın daha yüksek ekspresyon olduğu görülmüştür [100, 101]. Ancak, otokrin BH sinyalinin arsenik trioksite karşı hassas fenotipe yol açtığı, MCF-7 hücrelerinde gösterilmiştir. Meme kanseri hastalarında çoğunlukla kullanılan klinik olarak onaylı olmasına rağmen kemoterapik ilaçlar, kemorezistans fenotipini arttırabilir. Bu sebepten ötürü metastatik meme kanseri hastalarının tedavisinde yeni ilaçlar gerekmektedir. Son dönemde meme kanseri

gelişiminde postnatal büyüme üzerinde etkisi olan BH'nun meme gelişimi, ilaç direnci gibi alanlarda etkili olduğu gösterilmiştir [102].

2.8. Büyüme hormonu

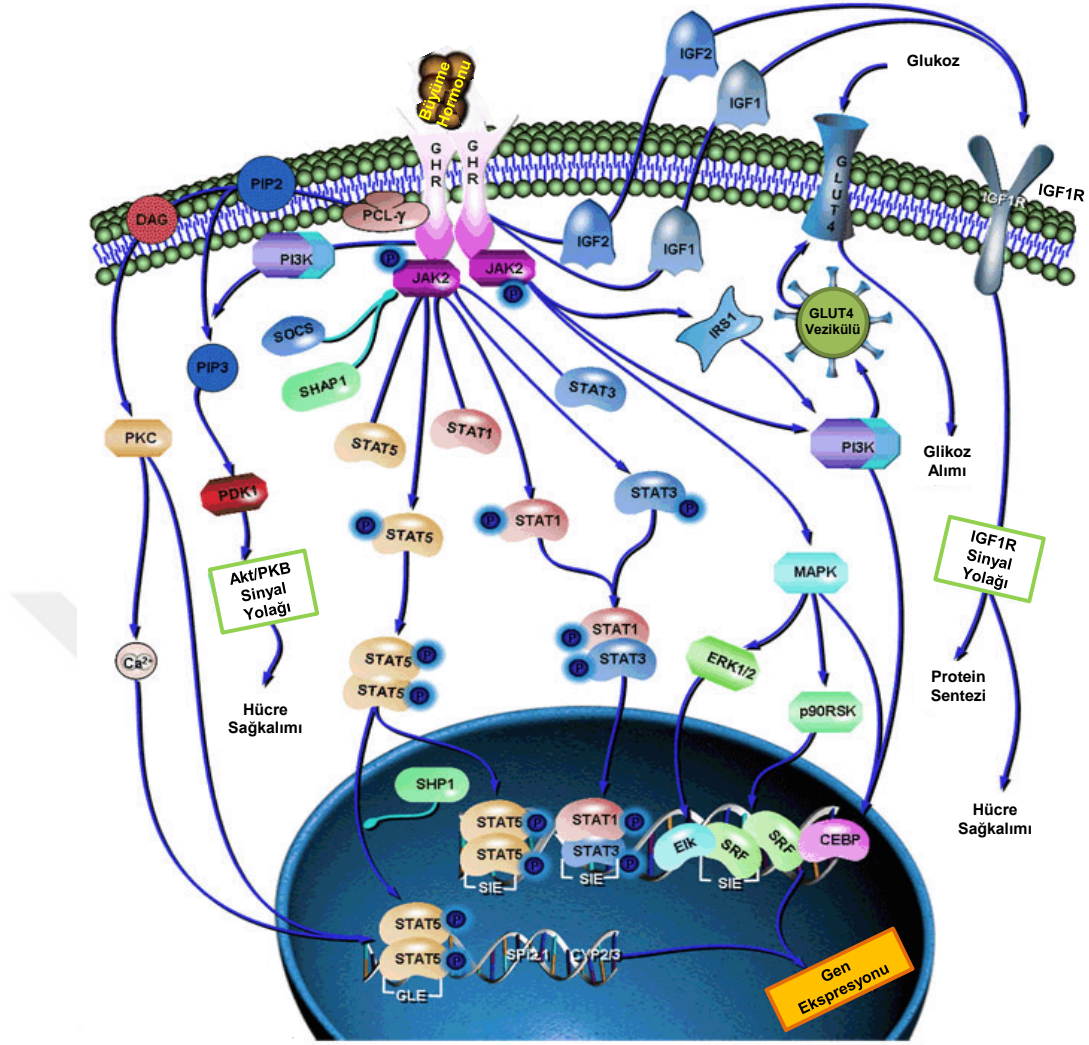
BH vücudun büyüme ve gelişmesinde önemli bir peptid hormondur [3]. BH, ön hipofizdeki somatotrofik hücreler tarafından salgınır ve 191 amino asitten oluşur. Bu hormon aynı zamanda metabolizma, zihinsel beceri, yaşlanma, kalp ve bağışıklık fonksiyonunu etkileyen bir primer hormondur. BH kas ve kemik üzerindeki anabolik hareketi ve yağ dokusu üzerindeki katabolik hareketi güçlendirir. Ayrıca BH, böbrek yoluyla sıvı tutmayı ve karaciğer üzerindeki metabolik etkileri teşvik eder. Karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasını, bağışıklık ve kardiyak fonksiyonunu düzenler. BH, çok salgılanması durumunda akromegali hastalığı, az salgılanması durumunda nanismus hastalığına neden olmaktadır [103].

Hücrel çoğalma, farklılaşma ve yaşlanmayı kontrol ederek yaşamda rol oynar. Hücrel düzeyde, BH doğrudan veya dolaylı olarak hücre türüne ve durumuna bağlı olarak çeşitli işlevleri vardır. Örneğin; epifiz prekondrositlerinin kondrositlere ve 3T3-F442A preadipositlerindeki olgun adipositlere hücrel farklılaşması, monositlerin kemotaksisi, meme ve endometriyal kanser modellerinin göçü ve proliferasyonu. Ayrıca BH, karaciğerde çoğu dokuda BH'a yanıt olarak üretilen IGF-I'nin hareketiyle de ortaya çıkar. Böylelikle, BH doğrudan ve dolaylı olarak fizyolojik etkilere neden olmaktadır [104] (Şekil 4).



Şekil 4. Büyüme hormonu salınımı ve biyolojik fonksiyonları ⁴

BH ön hipofizden salgılanır, hipofiz ve çeşitli hedef dokuların plazma zarı üzerindeki BHR'ye bağlanmasıyla BH sinyal yolağı başlamaktadır. BH, BH reseptörüne bağlanmasıyla hem BH hemde BHR'deki çoklu tirozinleri fosforile eden BHR ilişkili tirozin kinaz Janus kinaz 2 (JAK2)'yi aktive eder. Aktive edilmiş BHR-JAK2 kompleksi çeşitli sinyal yolaklarının aktivasyonuna neden olur [105]. Böylece apoptozun engellenmesi, diferansiyasyon ve göç, sito iskeletal, hücre sel proliferasyon, metabolik yollarının regülasyon ve reorganizasyonda dahil olmak üzere çeşitli biyolojik etkilerle sonuçlanan bir grup sinyal dizisini başlatmaktadır [106]. BH tarafından aktive edilen bir dizi sinyal proteinleri ve yolları tanımlanmıştır. Bunlar; JAK ailesi, mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağı/hücre dışı düzenlenmiş kinaz (ERK) sinyal yolağı PI3K/Akt yolağı, sinyal transdüserları ve STAT olmak üzere BH tarafından aktive edilen yolaklar olduğu bilinmektedir [107] (Şekil 5).



Şekil 5. Büyüme Hormonu Sinyal Yoluğu⁵

2.9. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

Meme kanseri tedavi yöntemleri hastaya göre değişiklik gösterir. Meme kanseri tedavi edilebilir bir hastalıktır ancak kanserin hangi evrede olduğu tedavinin tipini ve riskin boyutunu belirler. Cerrahi tedavi, radyoterapi ve kemoterapinin yanı sıra son yıllarda uygulanmaya başlanılan moleküler hedefli tedavi ve immunoterapide meme kanseri tedavi yöntemleri arasındadır. Ayrıca geleneksel Çin tıbbında kullanılan ilaçlar gibi tamamlayıcı terapötik yöntemlerde özellikle Asya’da yaygın olarak kullanılmaktadır [5]. Meme kanseri tedavisinde cerrahi yöntem, radyoterapi, kemoterapi ve hormon tedavisi tek başına veya beraber uygulanabilir. Meme kanseri tedavisinde cerrahi tedavi ve radyoterapi lokal, kemoterapi ve hormon tedavisi sistemik tedavi yöntemleridir [108].

2.9.1. Cerrahi Yöntem

Meme kanseri erken tanı ile teşhis edildiğinde cerrahi yöntem ile tamamen yok etmek mümkündür. Lokal olarak belirli bir nokta veya bir kaç bölge seçilerek cerrahi yöntem uygulanır. Gerekirse koltuk altı lenf nodlarınınada cerrahi müdahale yapılarak tümör dokusu uzaklaştırılır. BRCA1 veya BRCA2 mutasyonunu taşıyan kadınlar yüksek risk altında olduğundan, bilateral mastektomi ve/veya bilateral salpingo-oofrektomi gibi profilaktik cerrahi müdahalelerden yararlanabilirler [109].

2.9.2. Radyoterapi

Radyoterapi cerrahi müdahale öncesi ve sonrası kullanılabilir. Cerrahi müdahale öncesi var olan tümörü küçültmek amacı ile kullanılırken, cerrahi müdahale sonrası koltuk altında veya meme duvarında kalmış olabilecek tümör dokularını yeniden ürememeleri ve yayılmamaları için yok etmek üzere kullanılmaktadır [110]. Radyoterapi ile tümürlü hücreleri yok ederken kemoterapiye kıyasla tümör içermeyen sağlıklı hücrelere çok daha az zarar verilmektedir. Bu tedavide yüksek enerjili X-ışınları kullanılarak tümör dokularının DNA'larına zarar verilerek tümürlü hücreleri yok etmek amaçlanmaktadır [111].

2.9.3. Kemoterapi

Kemoterapi metastatik tümörlerin tedavisinde kullanılan temel yöntemdir [112]. Kemoterapötik ajanlar hap, şurup şeklinde, damar yoluyla veya tümör bölgesine doğrudan enjeksiyon şeklinde vücuda verilerek tümörlerin yok edilmesi veya büyümesinin engellenmesiyle tümörün kontrol altına alınması hedeflenmektedir. Kemoterapötik ajanlar en çok hücreler proliferatif dönemdeyken etkilidirler. Kemoterapi, kan dolaşımını kullanarak yayıldığı için vücudun tüm hücrelerine yayılır. Vücutta tüm doku ve organları etkiler bu yanıla cerrahi yöntem ve radyoterapiden farklıdır. Kemoterapi cerrahi tedavi ve radyoterapi gibi lokal bir tedavi değildir. Kemik iliği supresyonu, nörotoksisite, gastrointestinal reaksiyon ve karaciğer, böbrek hasarı gibi yan etkileri olduğu bilinmektedir [113]. Ayrıca kemoterapötik maddeler; çoklu ilaç direncini indükleyerek, tedavinin başarısızlığını ve hastalığın tekrar nüks etmesine neden olabilmektedirler. Kemoterapi genellikle 35 yaş üstü kadınlar için önerilmektedir [114].

2.9.4. Hormonal Terapi

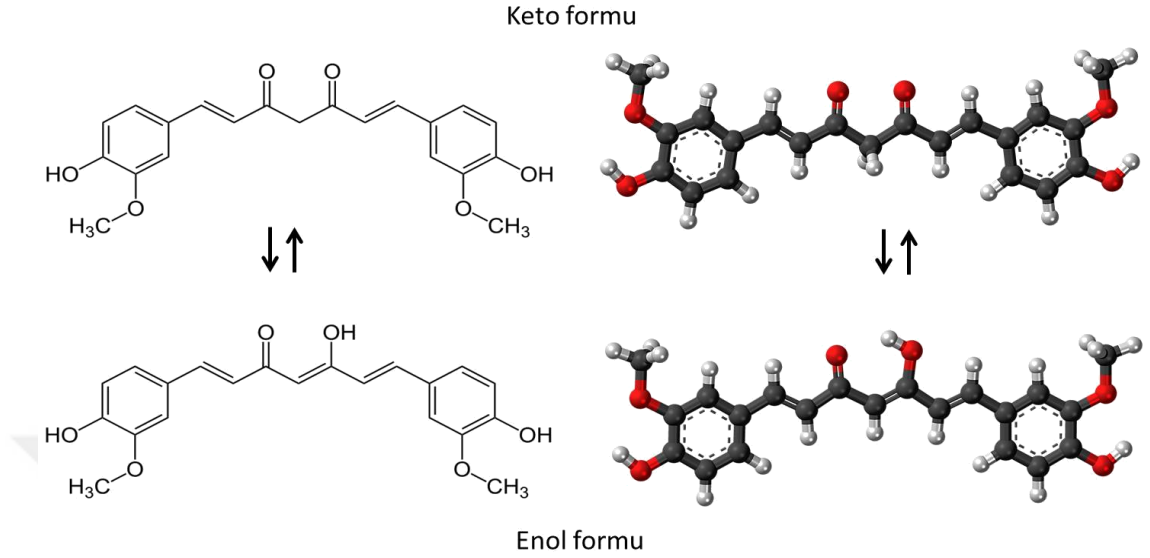
Hormon tedavisi 1896 yılında Sir Thomas Beatson tarafında bulunmuştur. İleri meme kanseri olan bir dizi hastada yaptığı çalışmalarla, hormon tedavisi uygulayarak hayatta kalmanın daha fazla olduğunu gözlemleyerek bu tedaviyi sunmuştur [115]. Cerrahi tedavi ve radyoterapi; lokal tedavi, kemoterapi ve hormonal terapi; sistemik tedavi yöntemleri olarak kabul edilmektedir. Hangi tedavi uygulanacağı, hastanın prognoz skoru ve nüks etme riskine bağlı olarak belirlenmektedir [116]. Meme kanserinde hormonal tedavi tümörlerin hormon reseptörlerini (HR+); östrojen (ER+), Progesteron (PR+) veya ikisini de ifade eden hastalara uygulanmaktadır. Neoadjuvan, adjuvan ve metastatik hastalarda hormonal tedavi uygulanabilmektedir [117].

Hormon tedavisi HR+ meme neoplazmi olan tüm hastalarda zorunludur. Hem adjuvan hem metastatik hastalıkta etkindir. Menopoz öncesi ve menopoz sonrasında tek aktif adjuvan hormonal tedavi Tamoksifen'dir. Adjuvan tedavi süresi boyunca hastaliksız sağ kalımı, kontrolateral meme kanseri görünümünü ve genel sağ kalımı etkilemektedir. Aromataz inhibitörler; Anastrozol, Ekzemestan, Letrozol sadece menopoz sonrası dönemde kullanılmaktadır. Fulvestrant, Tamoksifen tedavi sonrası veya tedavi sırasında tekrarlayan durumlarda kullanılır. LTHT (Lütein hormon salgılatan hormon) analogları menopoz öncesi hastalarda adjuvan ve bazı nüks etme durumlarında kullanılmaktadır. HR+ meme neoplazmaların yaklaşık %50'si hormon tedavisine dirençlidir. Hüresel büyüme yolaklarında bulunan Palbociclib ve Everolimus gibi bazı moleküller hormon tedavisine direnci tersine çevirmektedir [118].

2.10. Curcumin

Curcumin [1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil) 1,6-hepta-diene- 3,5-dion], "*Curcuma Ionga*" bilinen adıyla zerdeçal bitkisinin kökünden üretilen doğal bir bileşiktir [119]. Kimyasal olarak Curcuma türlerinin ribozomlarından çıkarılan düşük molekül ağırlıklı bir polifenol türevidir. *Curcuma longa*; kısa boylu, uzunluğu yaklaşık 100 cm'ye kadar çıkan çok yıllık bir bitkidir. Hint kıtasında ve tropikal ülkelerde, özellikle de Güneydoğu Asya'da doğal olarak yetişmektedir. Bu bitkinin kök şeklinde olan yapısı başlıca bileşeni turmeron içeren uçucu bir yağdır. Curcuminoidler curcuminin renklendirici ajanlarıdır. Curcuminoidler; curcumin, demetoksicurcumin,

5'-metoksicurcumin ve dihidrocurcumininden oluşur. Kök şeklinde olan kısmından elde edilen toz şekli zerdeçal; aynı zamanda parlak sarı bir baharattır [6] (Şekil 6).



Şekil 6. Curcumin'nin keto ve enol formu moleküler iki boyutlu ve üç boyutlu yapısı ⁶

Curcumin hücre içindeki etkileri başta antioksidan özelliği olmak üzere bağışıklık sisteminin çeşitli yollarını, hücre döngüsü kontrol noktalarını, apoptozu, tümör ilerlemesini kontrol eden yolları ve buna bağlı proteinleri, molekülleri etkileyen çok fonksiyonlu, farmakolojik olarak güvenli bir doğal ajandır. Ayrıca bir gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır [120]. 5.000 yıl öncesine dayanan eski Hint şifa sisteminde curcumin farklı hastalıklarda iltihaplanmayı hafifletmek gibi çok çeşitli ihtiyaç durumlarında "bitkisel aspirin" ve "bitkisel kortizon" olarak çağlar boyunca kullanılmıştır [121]. İnflamatuar mediyatörler, büyüme faktörleri enzimler, taşıyıcı proteinler, metal iyonları, tümör baskılayıcıları, transkripsiyon faktörleri, onkoproteinler ve hücresele nükleik asitler gibi moleküllerle etkileşime girmektedir. Bu etkileşimler; dolaylı veya direk olarak kovalent, kovalent olmayan hidrofobik ve hidrojen bağı ile kurulabilir [122]. Farklı bağlanma kapasitesine sahip kimyasal yapısı, çeşitli hedefler ile etkileşime girme yeteneği açısından hayati önem taşır [123].

Curcumin tedavi edici özellikleri anti-oksidan, anti-artritik, anti-amiloid, anti-istemik ve anti-inflamatuar etki içermektedir. Cilt, akciğer, pankreas, kolon, bağırsak ve meme kanserine karşı koruyucu ve terapötik etkinliğe sahip olduğu, tümör anjiyogenezisi ve metastazını baskıladığı bilinmektedir [124]. Curcumin önemli

ölçüde kanser gelişimini inhibe ettiği ve kimyasal yoldan kanser önleyici ve kemoterapötik ajan olarak kabul edilmektedir [125].

2.11. Curcumin ve Kanser

Bazı bitki özleri, sitotoksik ajanların yan etkileri olmaksızın anti-kanserojen özellikler göstermişlerdir. Baharatlar uzun yıllardır gıda aromaları ve ilaç yapımında kullanılmaktadır. Baharatlarla yapılan çalışmalar çeşitli kanser türlerinde apoptozu indükleme, proliferasyonu inhibe etme, tümörlerin migrasyonu ve invazyonu gibi etkilerin meydana geldiğini göstermektedir. Mide, karaciğer, akciğer, kolorektal, meme, serviks, pankreas ve prostat gibi kanser türlerinde anti-oksidan, anti-inflamatuar ve immünomodülatör etkileri kanıtlanmıştır [126]. Yapılan çalışmalarda curcuminin protein kinaz MAPK, Akt, Bcl-2; transkripsiyon faktörleri nükleer faktör kapp B (NF-κB), aktif protein-1 (AP-1); STAT-3; siklooksijenaz (COX-2) gibi enzimler; matriks metalloproteinazlar (MMP) ve lipooksijenaz (LOX) üzerinde etkili olduğu görülmüştür [127-129].

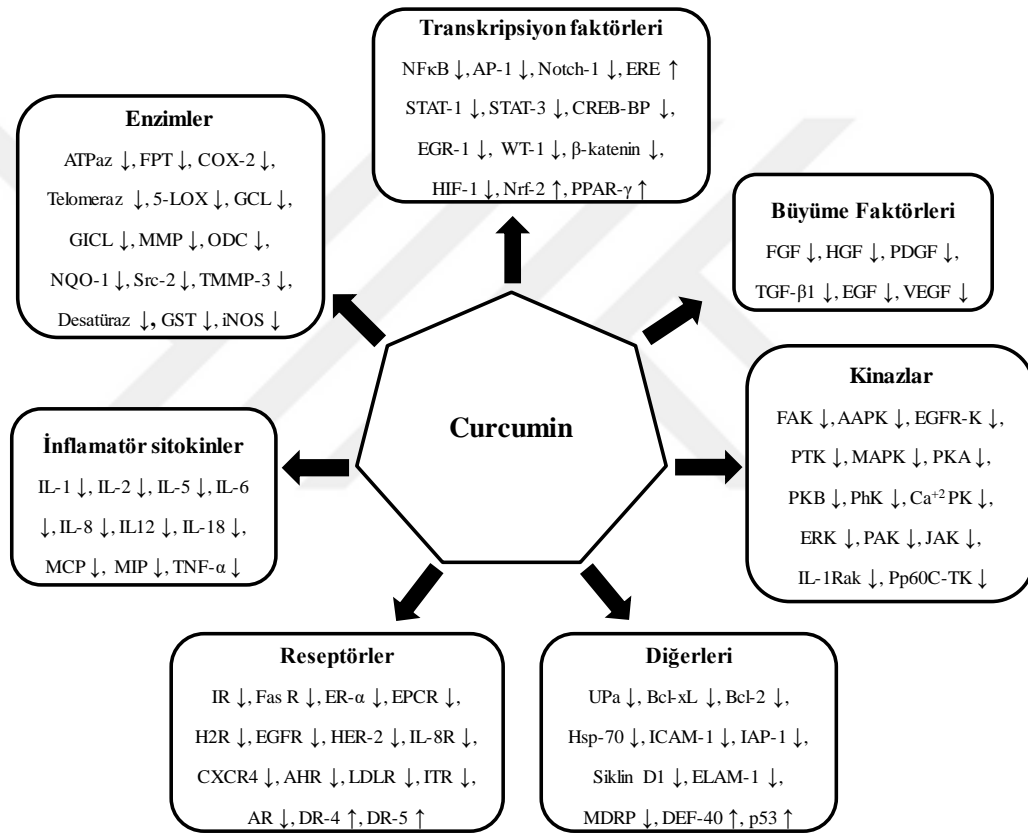
Tümör büyümesi ve metastazında rol oynayan ve meme kanserinde eksprese edilen ER, curcumin ile hem ER+ hem de ER- hücrelerde proliferasyon inhibe edildiği bilinmektedir. Ayrıca apoptoz inhibitörleri olarak bilinen kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9'un curcumin ile inhibe edildiği gösterilmektedir [9].

Curcumin süreci anti-inflamatuar, anti-kanserojen, anti-metastatik özelliklere sahiptir ve tümör oluşumunu inhibe etmektedir [130, 131]. Ayrıca curcumin; MMP-2, Bcl-2, Bcl-2 ilişkili X proteini (Bax), flep endonükleaz 1 (Fen1), NF-E2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf) ve PI3K/Akt sinyali *in vitro* meme kanseri regülasyonunda aktivite göstermektedirler. [7, 119, 132, 133].

Meme kanserinde curcumin kemoterapötik ve sitotoksik etkileri üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Curcumin MCF10A hücrelerinde Bcl-2'yu azaltarak ve Bax'ın regülasyonunu arttırarak hücre ölümünü indüklemektedir [119]. Aynı etkiler MDA-MB-231 ve MCF-7 gibi meme kanseri hücre hatlarında da gözlemlenmektedir [7, 134]. Curcumin PI3K/Akt sinyal yolağı ile apoptozu tetiklemiştir [132].

Curcumin hipoksideki hipoksiyle indüklenen faktör-1α (HIF-1α) ve HIF-2α protein seviyelerini düşürmektedir. Curcumin MCF-7 karsinoma hücrelerinde hem hipoksi hem normoksi olarak aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokatorü (ARNT) protein seviyesini ve HIF transkripsiyonel aktivitesini azalttığı görülmektedir [135].

Ayrıca 12-O-tetradekanoilflorbol-13-asetat (TPA) ile indüklenen MMP-9 ekspresyonu ve hücre invazyonu, protein kinaz C- α 'nın (PKC- α) bastırılmasıyla, MAPK ve NF- κ B/AP-1 yoluyla curcumin tarafından inhibe edilmektedir [136]. F-box protein S-faz kinaz-ilişkili protein 2 (SKP2) meme kanseri gelişiminde özellikle ER-HER2 negatif meme kanserleri, meme kanseri ilerlemesinde rol oynamaktadır. Curcumin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde P27 induksiyonu ve SKP2 inhibisyonu aracılığı ile hücre büyümesini inhibe ettiği bilinmektedir. Ayrıca Curcumin özellikle ER/HER2 negatif meme kanserlerinde kanser hücre büyümesini inhibe etmiştir [137] (Şekil 7).

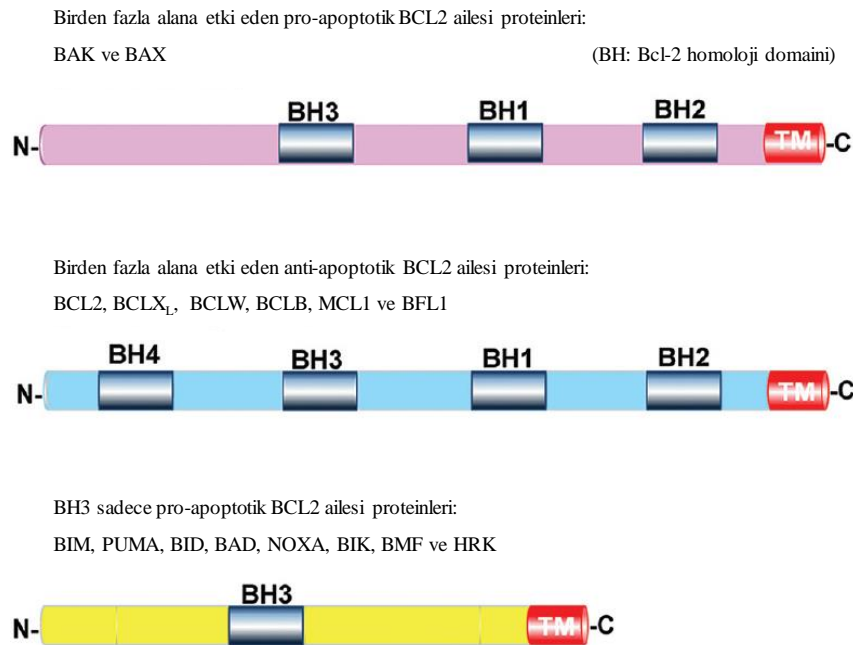


Şekil 7. Curcumin'nin etkili olduğu biyomoleküller ⁷

Toksik olmayan ve oldukça anti-oksidan, anti-inflamatuar bir madde olan curcuminin çok yönlü terapötik, farmakolojik etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır. Curcuminin bu etkileri sadece kansere karşı koruyucu ve terapötik bir madde olarak kullanılmasını sağlamanın yanı sıra insan vücudunda ROS ve iltihap ile mücadele için anti-inflamatuar bir ajan olarak kullanım yolunu da sağlamaktadır [121]. Curcumin hedefleri: enzimler, sitokinler, büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri,

apoptoz ve hücre çoğalmasını düzenleyicileri olarak hareket eden proteinler gibi bir çok moleküllerdir [138].

Meme kanserinde Bcl-2 ailesinin önemli bir yeri vardır. Bcl-2 ailesine mensup proteinlerin bazıları pro-apoptotik bazıları ise anti-apoptotik görev yapmaktadır. Curcumin bu proteinleri arttırarak veya azaltarak hücre ölümünü indüklemektedir. Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan proteinler apoptozu indüklemekte, anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan proteinler apoptozu baskılamaktadır. Farklı işleyişleri olan proteinlerin fonksiyonların yapılarındaki Bcl-2 homoloji bölgeleri tarafından düzenlenmektedir. Anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlerin yapısında 4 tane Bcl-2 homoloji domaini bulunmaktadır [139] (Şekil 8).



Şekil 8. Bcl-2 ailesi proteinlerinin buldukları homoloji bölgeleri ⁸

2. 12. Sitokinler

Bağışıklık sisteminde hücreler arası iletişimi yönlendirebilen yüksek düzeyde indüklenebilen salgı proteinleridir. Bunlar tümör nekroz faktörleri, interlökinler, interferonlar ve koloni uyarıcı faktörler olmak üzere gruplandırılan protein aileleridir. Bu proteinlerin bazılarının yanısıra reseptörlerinin organizmalarda fizyolojik ve patolojik koşullar altında üretildiği bildirilmiştir. İnflamasyon tümör başlatması, büyümesi, anjiyojenez ve metastaz gibi tüm olaylarda sitokinlerin görevli olduğu bildirilmiştir. Sitokinlerin meme kanserinde indüksiyonun ve proteksiyonun

düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu bilgi özellikle meme kanseri ve diğer kanserle ilişkili hastalıklara yeni terapötik yaklaşımların önerilmesi için temel olabilir [10].

Curcumin'nin çok sayıda sitokin salınımını inhibe ettiği bilinmektedir. Curcuminin monosit ve makrofajlardan IL-1 β , IL-8, tümör nekroz faktörü α (TNF- α), monosit kemoatraktan protein-1 (MCP1) ve makrofaj enflamatuvar protein-1 α (MIP1 α) salınımını baskıladığı bildirilmektedir. Ayrıca curcumin; interlökin-6 (IL-6), IL-10, interferon γ gibi sitokinlerinde ekspresyonunu azalttığı, inflamazyonda belirgin bir azalmaya ve fibrozis azalması ile bağlantılı olduğu görülmektedir [140] (Tablo 3).

Tablo 3. Curcumin'nin İnterlökinler üzerine etkisi

Curcumin Etkisi	Biyomolekül	Fonksiyonları
↓	IL1	Majör pro-inflamatuvar sitokin, hematopoez, CNS gelişimi
↓	IL2	T-hücresi lenfosit diferansiasyonu
↓ ↑	IL4	B-hücre proliferasyonu
↓	IL5	İmmünoglobulin salgısı, eozinofil fonksiyonu, allerji
↓	IL6	Majör pro-inflamatuvar sitokin, B-hücre diferansiasyonu, sinir hücresi diferansiasyonu
↓	IL8	Nötrofil kemotaksis, anjiyogenez
↑	IL10	Anti-inflamatuvar sitokin, T-hücre uyarıcı etki
↓	IL11	Akut faz proteinlerini indükler, antijen-antikor reaksiyonları, kemiğin yeniden yapılanması
↓	IL12	hücre içi patojenlere karşı savunma
↓	IL13	matris metalloproteinazları indükler, IgE 'i indükler
↓	IL17	Pro-inflamatuvar sitokin

2.13. Curcuminin klinik uygulamaları

Curcuminin anti-inflamatuvar, anti-oksidan, anti-karsinojenik etkileri prostat, kolon, akciğer, meme kanseri gibi pek çok kanser üzerinde etkisi *in vitro* ortamda gösterilmiştir. Ayrıca *in vivo* kanser fare modellerinde curcuminin tümör baskılayıcı, metastazı etkileyici rolü belirlenmiştir [141]. Pre-klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda curcuminin klinik uygulamaları prostat, kolon, pankreas ve meme kanserinde devam etmektedir [142, 143]. Curcuminin ve metabolitlerinin kolon

kanseri hastalarının serumlarında günlük 8.000 mg curcumin uygulanan üç aylık ilaç rejiminde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizlerine göre hasta serumlarındaki curcumin miktarının düşük olduğu tespit edilmiştir. Ancak pek çok malign klinik vakalarda curcuminin günlük 8.000 mg uygulamasının etkin tedavi edici rolü gösterilmiştir. Hatta günlük curcumin ilaç uygulama dozunun 12.000 mg/gün olarak daha etkin olacağı üzerinde çalışmalar bulunmaktadır [144].

Klinik öncesi veriler curcuminin pankreas kanserine karşı güçlü bir etkinliğe sahip olduğunu göstermekte ancak daha yüksek maruz kalma seviyelerine ulaşması gerekmektedir [145]. Pankreas kanserine sahip kişilerle yapılan klinik çalışmalarda curcuminin klinik biyolojik etkileri araştırılmıştır. On sekiz aydır hastalığı stabil devam eden kişilerde serum sitokin seviyelerinde (IL-6, IL-8, IL-10 ve IL-1 reseptör antagonistleri) anlamlı artışlar (4-35 kat) buna eşlik eden kısa fakat belirgin bir tümör gerilemesi (%73) tespit edilmiş ve herhangi bir toksisite görülmemiştir [146]. Curcuminin Faz I çalışmaları; günlük 8.000 mg'a kadar oral dozlarda güvenle uygulanabileceğini göstermektedir [144, 147]. Ayrıca curcuminin diğer bir faydası ise zayıf oral biyoyararlanımı nedeniyle azaltılabilir [148]. Curcuminin hastalarda ki periferik kan mononükleer hücrelerinde NF-κB, COX-2, fosforillenmiş sinyal transdüseri ve transkripsiyon 3 aktivatörünün down-regüle ettiği bildirilmiştir. Oral curcumin iyi derecede tolere edildiği ve sınırlı absorpsiyonuna rağmen pankreas kanseri olan bazı hastalarda biyolojik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Böylece, biyolojik stabilitesinin curcumin formülasyonları arttırmak üzere farmakolojik etkinliği yüksek analoglar veya nanopartikül, lipozom ile kaplı curcumin geliştirmeye yönelik planlar curcuminin anti-tümör aktivitesini desteklemek ve arttırmak için faydalı bir strateji olarak önerilmektedir [146, 149].

Başka bir çalışmada, gastrointestinal sistem dışındaki dokulardaki kanserin önlenmesi veya tedavisine yönelik bir ajan olarak oral curcuminin klinik gelişimi için “başarısızlık noktası”nın düşük sistemik biyoyararlanımı yapılan bu çalışma ışığında gözden geçirilmesine dair fikir uzun zamandır devam eden genel görüştür. Günlük bir dozu 3,6 gram curcuminin sistemik farmakolojik özelliklerinin gastrointestinal sistem dışındaki bölgelerde bulunan malignitelerin önlenmesinde değerlendirilmesi için uygun olduğuna karar verilmesini sağlamıştır [147].

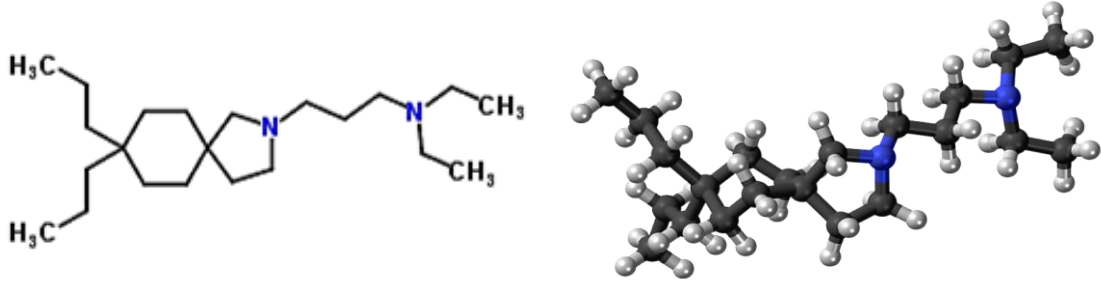
Hali hazırda 12 aktif klinik çalışma çoğunlukla kolorektal ve pankreas kanserlerinin tedavisinde curcuminin rolü araştırılmaya devam etmektedir [147, 150]. Ayrıca ilerlemiş ve metastatik meme kanseri hastalarında curcumin ile beraber dosetaksel kombine tedavisi değerlendirilen ilk klinik çalışmaya göre; faz I çalışmasında, curcumin maksimum tolere edilen dozu günde 8.000 mg, altı siklus için her üç haftada bir uygulanan dosetaksel ile kombine tedavide 100 mg/m² olarak belirlenmiştir [151]. Günlük olarak oral kullanımı güvenli dozu 8.000 mg olduğu bildirilmektedir. Ayrıca diğer çalışmalarda ise sadece 1.derece ishal ve baş ağrısıyla beraber güvenli doz olarak günde 12.000 mg curcumin kullanılabilceği rapor edilmiştir [144, 148].

Curcuminin insan çalışmalarında şimdiye kadar günde 12 gram'a kadar güvenli bir şekilde pankreatik kanserli hastalarda uygulanarak klinik yarar sağladığı bildirilmiştir [144, 147]. Ayrıca klinik öncesi çalışmalarda curcuminin kemoterapik ajan olan gemcitabine sinerjik etkileri ve curcuminin monoterapisinin klinik çalışmalardaki güvenliği bildirilmiştir [146]. Bu nedenle pankreatik kanserli hastalarda oral curcuminin gemcitabine tabanlı kemoterapi ile kombinasyonundaki güvenilirliği ve fizibilitesi insan çalışmasında belirlemek için faz I/II çalışmaları yapılmıştır [152].

2.14. Atiprimod

Moleküler formülü; C₂₂, H₄₄, N₂ olan atiprimodun kimyasal gösterimi; N-N-dietil-8-8-dipropil-2-azaspiro [4, 5] dekan-2-propanamin'dir [153]. Moleküler ağırlığı; 336.608 g/mol'dür. Atiprimod anti-inflamatuvar etkinliğe sahip bir azaspiran katyonik amfilik bir bileşiktir. Azaspiran ve SK&F106615 isimleriyle de adlandırılır. Azaspirenler kapsamlı olarak incelenmiş olsada etki mekanizmaları tamamen anlaşılamamıştır [154] (Şekil 9).

Atiprimod, bir çeşit sinyal transdüksiyon inhibitörü ve anti-anjiyogenez ajanıdır. Kemik iliği stromal hücreleri (BMSC) ve insan göbek başı endotel hücrelerinden (HUVEC) yanı sıra anjiyogenezden VEGF sekresyonunu inhibe eder. Buna ek olarak; atiprimod, ksenograft bağışıklık eksikliği olan (SCID) fare modellerinde *in vivo* antimiyeloma etkilerini sergilemektedir [153, 155].



Şekil 9. Atiprimod moleküler iki ve üç boyutlu yapısı ⁹

2.15. Atiprimod ve kanser

Atiprimod, c-Jun N-terminal protein kinazları (JNK) aktive etmekte, Bax, Bad seviyelerini regülasyonunu artırır ve Bcl-2'yi fosforillemektedir. Bunun sonucunda apoptozu indükleyen faktör (AIF) ve mitokondriden sitokrom c'nin salınmasına sebep olmakta, kaspaz-9, kaspaz-3 ve PARP'ın kırılmasını aktive etmektedir. Katyonik amfifilik bileşik olan atiprimod tümörlerde anti-kanserojen özellikleri nedeniyle araştırılmaktadır [156, 157]. Atiprimod IL-6'nın sinyal yolağını inhibe ederek, hücre çoğalmasına ve hayatta kalmaya katkısı olan sinyal transdüser ve STAT etkinleştirmeyi engellemektedir. Bcl-2, Bcl-X L ve Mcl-1 gibi anti apoptotik proteinleri indirgemektedir. Atiprimod kaspaz 3'ün aktivasyonunu sağlayarak ve DNA tamir enzimi poli (adenosin difosfat-riboz) polimerazın bölünmesi ile apoptozu indüklemektedir [158]. Atiprimodun aynı zamanda güçlü bir JAK2/JAK3 inhibitörü olduğu bilinmektedir [159]. Ayrıca ERK1/2'yi, TNF- α tarafından tetiklenen inhibitör KB (I κ B α) ve nükleer faktör κ B (NF κ B) p65 fosforilasyonunu inhibe eder [160]. IL-6 ve IGF-I önemli multipl miyelom (MM) hücre büyüme faktörleri olmasına ve deksametazon (Dex) ile indüklenen apoptoza karşı koruma sağlamasına rağmen, eksojen IL-6 veya IGF-I atiprimod kaynaklı sitotoksisite karşı koruma sağlar [161, 162].

Geleneksel olarak; deksametazon, doksorubisin, melfalan ve yeni olarak; arsenik trioksit ajanlar atiprimodun indüklediği apoptozu artırır. Son araştırmalar; atiprimodun anti-proliferatif ve anti-anjiyojenik aktiviteler sergilediğini, kaspaz-3 ve kaspaz-8'in aktivasyonu yoluyla apoptozu indüklediğini bununla birlikte MM'de Akt ve STAT3'ün fosforilasyonunu inhibe ettiğini ileri sürmektedir [153, 158]. Ayrıca *in vivo* ve *in vitro* hücre lenfoma modellerinde atiprimodun JNK üzerinde etki ederek Bax, Bad anlatımını arttırdığı ve Bcl-2 fosforilasyonunu indükleyerek sitokrom c salınımını arttırdığı ve kaspaz-9, -3 aktive ederek apoptotik ölümü indüklediği

belirlenmiştir [163]. Ayrıca atiprimodun apoptotik etkisi hepatosellüler karsinoma hücresi olan HepG2 AD38 hücrelerinde Akt, STAT3 üzerinde inhibe etki göstererek ölüme indüklediği tespit edilmiştir [164]. Lökemi hücrelerinde etkin apoptotik indüktör görevi yaptığı tespit edilen atiprimodun kaspaz-3 ve PARP kesilimini indüklediği ve STAT3 ile STAT5 fosforilasyonunu baskılayarak gerçekleştirdiği akut miyeloid lösemi hücrelerinde gösterilmektedir [165]. Atiprimod hem anti-proliferatif hem de anti-anjiyogenik aktivitesi çok düşük konsantrasyonlarda bile etkin olduğu T84 kolon karsinoma hücrelerinde hem kaspaz-9 ve -3 indükleyerek apoptotik ölümü tetiklediği gösterilmektedir [166]. Ayrıca atiprimodun kemik iliği çoklu miyelom gelişiminin hem *in vivo* hem de *in vitro*da büyüme ve farklılaşmasını engellediği tespit edilmiştir [167].

2.16. Apoptoz

“Apoptoz” terimi Yunanca "apo" (ayrı) ve "ptosis" (düşmek) kelimelerinde türetilmiş sonbaharda yaprakların ağaçlardan düşmesi anlamına gelen bir kelimedir. Apoptoz; normal dokularda gelişme ve homeostazda kritik bir rol oynayan biyokimyasal ve genetik yollarla programlanmış bir hücre ölümüdür [12]. Nekrozdan farklı olarak bir hücrenin belirli uyarıları aldıktan sonra ölüm yoluna girmesini ifade eder. 1972’de Kerr ve arkadaşları tarafından ilk tarif edildiğinden beri çok fazla araştırmalara konu olmuştur [13].

Apoptoz; hücre yaşaması ve hücre ölümü arasında ki sağlıklı dengeyi korumak için gereksiz veya istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılmasına katkıda bulunmaktadır [13]. Bağışıklık reaksiyonlarında olduğu gibi hücrelerde hastalık veya zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğünde de savunma mekanizması olarak anlam kazanmaktadır [168]. Hem fizyolojik hem patolojik olarak apoptozu tetikleyen çok sayıda uyarıcı vardır. Ancak aynı uyarılar her zaman aynı sonuca götürmemektedir. Örneğin; radyasyon veya kanser kemoterapik ilaçların uyarmasıyla bazı hücreler DNA hasarı ile apoptoza yönelirken, bazı hücreler ise apoptoza gitmeyerek hayatta kalmayı başarmaktadır [169].

Prekanseröz lezyonlar gibi stresli koşullar altında, DNA hasar kontrol noktası yolunun aktivasyonu, kanser oluşumunu engellemek için apoptoz indüksiyonu yoluyla potansiyel olarak zararlı DNA hasarlı hücrelerinin çıkarılmasında görev yapmaktadır [170]. Bu sebepten ötürü, apoptotik sinyaller genomik bütünlüğün korunmasına

yardımcı olur. Apoptotik yolların düzenlenmesinin sadece tümörigenezi teşvik etmekle kalmayarak aynı zamanda kanser hücrelerinin tedaviye dirençli olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle apoptozdan kaçınma kanserin belirgin bir özelliğidir. Kanser hücreleri; tümör gelişimini ve metastazı kolaylaştıran bozulmuş apoptotik sinyal veren hücreleri barındırmaktadır [171]. Apoptozun mekanizması kompleks olduğu için malign transformasyonuna, tümör metastazına ve antikanser ilaçlara dirence yol açabilmektedir [172].

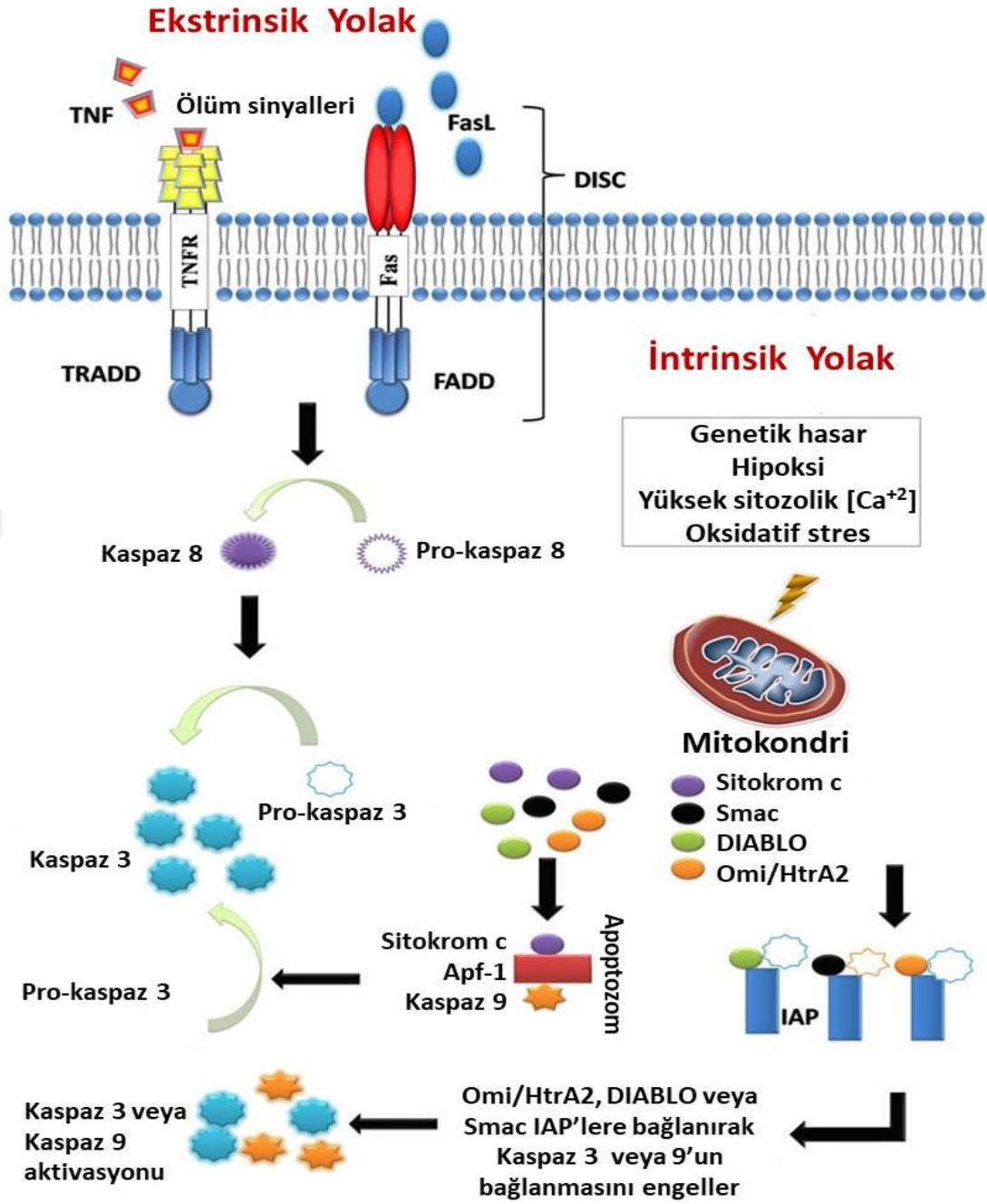
2.12.1. Ekstrinsik Sinyal Yolağı

Dış ölüm reseptörü yolu da denilen bu yolak; ölüm ligantlarının ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla başlamış olur. Hücre membranı üzerinde yer almaktadırlar. Bu reseptörler; tip 1 TNF reseptörü (TNFR1)/CD120a, Fas/APO1/CD95, TNF-R2, DR3/APO2/Weasle, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2 ve DR6'dır [173]. En çok bilinen ölüm reseptörleri; TNFR1 ve Fas (CD95) proteinleridir, bu reseptörlerin ligandları ise; TNF ve FASL (Fas Ligandı)'dir. Bu ölüm reseptörleri; TNF reseptörüne bağlı ölüm bölgesi (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm bölgesi (FADD) gibi adaptör proteinlerin yanı sıra kaspaz 8 gibi sistein proteazları da bir intraselüler ölüm alanına sahiptir [174]. TRADD ve FADD proteinleri ile hücre içine aktarılırlar. Ölüm ligandının ölüm reseptörüne bağlanması; bir adaptör protein için bağlayıcı bir alanın oluşumuyla sonuçlanır ve bu ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi, ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) olarak adlandırılır [175]. Sonrasında DISC; pro-kaspaz-8'in toplanması ve aktivasyonunu başlatır. Aktifleşen enzim kaspaz-8 başlatıcı bir kaspazdır. Kaspaz-8 indirgeyici veya uygulayıcı kaspazları; kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 aktivasyonunu sağlayarak apoptozu başlatır [176]. Aynı zamanda aktif kaspaz-8; endoplazmik retikulum ve golgi aygıtının membranlarındaki kaspaz-12'yi aktifleştirerek, kaspaz-12'nin de kaspaz-8 gibi Bid kesilimini yapmasını tetiklemektedir. Kesilen Bid mitokondriye geç ederek iç sinyal yolağını uyararak apoptozu tetiklemiş olur [177]. Bu sebepten kaspaz-8 hem içsel hem dışsal ölüm sinyal yolağı için önemli bir kaspazdır. İçsel ve dışsal apoptotik yolağın son basamağında kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 hücre iskeletini kesilimini sağlar. Böylelikle DNA fragmentasyonunu sağlayarak apoptotik cisimlerin oluşumunu tetikleyerek hücrenin programlı ve kontrollü ölümünü gerçekleştirmektedir [178] (Şekil 10).

2.16.2. İntrensik Sinyal Yolağı

İçsel mitokondriyal yolda denilen hücre içinde başlayan bir yoldur. Onarılamaz genetik hasar, hipoksi, sitosolik Ca^{+2} 'nin aşırı yüksek konsantrasyonu ve şiddetli oksidatif stres içsel mitokondriyal yolağın başlamasını tetiklemektedir. Bu yolağın başlaması mitokondriyal permeabilitenin artması ve sitokrom-c gibi pro-apoptotik moleküllerin sitoplazmaya bırakılması nedeniyle başlar [179]. İçsel yolağın başlaması; folliküler non-Hodgkin lenfomada kromozom 14-18 translokasyonunun kromozomal başlangıç noktasında görülen Bcl-2 geninden isimlendirilen ve Bcl-2 ailesine ait bir protein grubu tarafından düzenlenmektedir [180]. Bcl-2 ailesi, pro-apoptotik proteinler ve anti-apoptotik proteinler olmak üzere iki gruba ayrılır. Pro-apoptotik proteinler; Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs, Bak, Bik, Bim, Hrk ve anti-apoptotik proteinler; Bcl-2, Bcl-XL Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1'dir. Anti-apoptotik proteinler sitokrom-c'nin mitokondriyal salınımı bloke ederek apoptozu düzenler, pro-apoptotik proteinler ise bu salınımı teşvik ederek hareket ederler. Apoptozun başlatılıp başlatılmayacağını belirleyen pro-apoptotik proteinler ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengedir [181]. Mitokondriyal intermembran boşluğundan sitoplazmaya salınan diğer apoptotik faktörler; ikinci mitokondriyumdan üretilen kaspaz aktivatörü (Smac), AIF, apoptoz protein inhibitörü (IAP), bağlayıcı protein (DIABLO) ve yüksek sıcaklık gerektiren protein- A2 (Omi/HtrA2). Sitokrom-c'nin sitoplazmaya salınması ile sitokrom-c, Apaf-1, kaspaz 9'dan oluşan bir apoptozom kompleksinin oluşmasını ve bu kompleksin kaspaz 3'ün aktive olmasına neden olur [182]. Diğer bir yandan Smac/DIABLO veya Omi/HtrA2; kaspaz-3 veya kaspaz-9 ile IAP'leri etkileşiminde bozulmaya yol açan apoptoz proteinlerinin inhibitörüne bağlanarak kaspaz aktivasyonunu destekler [183].

Aktive olan kaspaz-3 diğer kaspazları aktive ettiği belirlenmiştir. Kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü inaktifleştirir. ICAD'ünün bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz serbestleşir. Kromatin kondensasyonu ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonu meydana gelir. Kaspaz kaskadı ile ölüm sinyali amplifiye edilerek iletilmiş olur [184] (Şekil 10).



Şekil 10. Apoptoz; intrinsik ve ekstrinsik sinyal yolları¹⁰

BÖLÜM III

3.1. MATERYAL VE METOT

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde Tablo 8’de sunulmuştur.

3.1.2. Hücre Kültürü Donanımları

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Ekler bölümünde Tablo 9’da sunulmuştur.

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Çalışma sürecinde kullanılan kimyasal maddeler Ekler bölümünde Tablo 10’da sunulmuştur.

3.1.4. Kullanılan Tamponlar

3.1.4.1. 10X TBS

86,6 gr NaCl, 12,11gr Tris-Baz konular pH: 8 e ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml’e tamamlanır. Hazırlanan 10X TBS, 1X TBS’e dönüştürülerek kullanılır.

3.1.4.2. 1X TBS-Tween

1X TBS içine 500 µl Tween-20 konularak hazırlanır.

3.1.4.3. Yürütme tamponunun

30,3 gr Tris-baz, 114 gr Glisin ve 10 gr SDS tartılarak 1000 ml distile su içinde çözünür. Hazırlanan 10X yürütme tamponu jel yürütmesi sırasında kullanılmak için 1X’e dönüştürülür.

3.1.4.4. Transfer Tamponunun

200 ml 10X yürütme tamponunun üzerine 100 ml metanol konularak distile su ile 1000 ml’e tamamlanır.

3.1.4.5. Yürütme Jelinin Hazırlanması

Proteinler ağırlıklarına göre ayrılmaları için %12’lik SDS poliakrilamid jelde yürütülürler. Jel içeriği Ekler bölümünde Tablo 11’de sunulmuştur.

3.1.4.6. Hücre Dondurma Medyasının Hazırlanması

9 ml filtre edilmiş Fetal sığır serumu ve 1 ml dimetilsülfoksit (DMSO) ile hazırlanan dondurma medyası yardımıyla hücreler uzun süreli olarak sıvı azot tankının içinde saklanabilir.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Hücre Kültürü

MCF-7 (ER+, PR+/-, HER2- Ki67 düşük), MDA-MB-231 (ER-, PR-, HER2- Ki67), MDA-MB-453 (HER2 ER-, PR-, HER2+ Ki67 yüksek) ve T47D (ER+, PR+/-, HER2- Ki67 düşük) meme kanseri hücre hatları American Type Tissue Culture Collection'dan temin edilmiştir. Tüm hücre hatları tez danışmanının yürütücülüğünde gerçekleştirilen TÜBİTAK 1001- 113Z791 numaralı projesi kapsamında iki yüksek lisans öğrencisi (Merve Çelik ve Merve Uğur) tarafından PC3.1 vektörü içine klonlanan insan BH geni (Doç. Dr. Ajda Çoker Gürkan tarafından üretilmiştir) lipozomal ajan ile transfekte edilmiş ve neomisin (G418) ile seçilerek stabil BH anlatımı yapan MDA-MB-453, T47D, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları gerçekleştirilmiştir. Stabil BH anlatımı yapan meme kanseri hücreleri ile transfeksiyonda kullanılan parental hücre hatları %10 sığır fetus serumu (FBS) ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotiği içeren besi yeri [(DMEM (MDA-MB-453, MCF-7 ve MDA-MB-231) ve RPMI (T47D)] içerisinde %5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübe edilmiştir. Hazırlanmış olan besiyeri 0,22 µM por çapındaki hücre kültürü ile uyumlu filtrelerden geçirilerek steril hale getirilip, 50 ml'lik falkon tüplerde +4°C'de saklanmıştır.

Hücreler 25 ve 75 cm²'lik hücre kültürü petrilerinde büyütülmüştür. Protein izolasyonu için 100 mm'lik, RNA izolasyonu için 100 mm'lik, floresan mikroskobu çalışmaları için 12 kuyucuklu hücre kültürü petrilerine ekimler gerçekleştirilmiştir. Hücreler bir gece boyunca hücre kültürü petrilerine yapıştıktan sonra tez kapsamında seçilen ilaç ve seçili dozlarda, belirlenen sürelerde uygulanmış ve %5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübe edilmiştir.

Gerçekleştirilecek deneyler doğrultusunda hücre ekimleri veya petri kabı içerisindeki hücrelerin yoğunluğunun artması sonucunda hücre pasajlama işlemi için öncelikle ortamdaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. 75 mm²'lik hücre kültürü petrisi içerisine 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırılır. Petri

kabı içerisine 2 ml tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) (%0,25) eklenerek CO₂ içeren etüvde 5 dakika boyunca bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin zarar görmemesi için petri kabına 2 ml DMEM besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuş ve hücreler santrifüj tübüne alınmıştır. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmış, hücrelerin üzerine 1 ml yeni besiyeri eklenmiştir. İyice pipetaj yapıp homojen bir hale gelen hücre süspansiyonu hücre sayımına hazırlanmış bulunmaktadır.

Hazırlanan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresinin kanalına aktarılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Hemositometrede 25 karede sayılan hücre sayısı, 1ml'deki hücre sayısının bulunabilmesi için 10⁴ ile çarpılmıştır. 1,5x10⁶ hücre, 75 cm²'lik petri kaplarına ekilerek hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. ELİZA Tekniği

MCF-7, MDA-MB-453, T47D ve MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında BH salınımını belirlenmek amacıyla ELİZA tekniği [(ab190811-Growth Hormone (BH) Human SimpleStep ELISA Kit, Abcam), (ab100572-Human Interleukin-6 (IL-6) ELISA Kit, Abcam), (ab100549-Human Interleukin-10 (IL-10) ELISA Kit, Abcam), (ab108655 Prolaktin Human ELISA Kit, Abcam), (ab100545-IGF-I Human ELISA Kit, Abcam)] kullanılmıştır. MCF-7, MDA-MB-453, T47D ve MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücresi 2x10⁶ hücre olacak şekilde 100 mm'lik hücre kültürü petrisine ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklenmiştir. MCF-7, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve BH+ hücrelerine 20 µM, MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerine 25 µM curcumin uygulaması yapılmıştır. 24 saat inkübasyondan sonra besiyerleri alınarak ultrasantrifüj tüpünden (Amicon 10 K Ultra-15 Centrifugal Filter Units) geçirildikten sonra elde edilen 200 µl hacminde örnek kullanılmıştır.

BH ELİZA için BH, IGF-I ELİZA için IGF-I ve Prolaktin ELİZA için Prolaktin antikorunu immobilize edilmiş 96 kuyucuklu petri kapı içerisine sırasıyla 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9 pg/mL olacak şekilde standartlar ve 50 µl örnek eklendikten sonra 50 µl antikor kokteyl eklenerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında 400 rpm'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda 3 kez yıkama tamponu solüsyonuyla her bir kuyu yıkanmıştır.

Yıkama sonrasında her bir kuyuya 100 µl TMB substrat solüsyonu eklenmiştir ve 10 dakika karanlık 400 rpm’de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda substrat solüsyonu üzerine durdurucu solüyon eklendikten sonra 1 dakika boyunca 400 rpm’de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda 450 nm OD değerleri ölçülmüştür.

Böylece konsantrasyonu bilinen standart değerlerinin absorbans değerleriyle birlikte konsantrasyon/absorbans grafiği oluşturulmuştur. Bu grafiğin eğim eşitliliği kullanılarak absorbans değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.2.3. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücre canlılığını belirlemek amacıyla MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromit) ajanı kullanılmıştır. MTT ajanı, canlı hücre içerisinde mor renkli formazan tuzu oluşturulması sonucu kolorimetrik yöntem ile hücre canlılığı belirlenmiştir. MCF-7, MDA-MB-453, T47D ve MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücresi 1×10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine ekim gerçekleştirilmiştir. Bir gece inkübasyonu takiben hücrelere (20 µM) curcumin 24 saat boyunca ve 2 mM atiprimod 1 saat önce uygulama (T47D) ve beraber uygulama (MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-231) olarak uygulanarak inkübe edilmiştir. İlaç uygulaması sonrasında hücrelere 4 saat boyunca MTT ajanı uygulanmış ve DMSO ile formazan tuzları çözündürülüp, absorbans değeri ikili dalga boyunda 570 nm ve 655 nm’ de mikropłaka okuyucusunda ölçüm yapılmıştır.

3.2.4. Hücre Sağkalım Analizi

MCF-7, MDA-MB-453, T47D ve MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin ve atiprimod sitostatik etkisini belirlemek amacıyla hücre sağkalım analizi gerçekleştirilmiştir. 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 7×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat boyunca hücrelerin yapışması beklenmiştir. Yapışan hücrelere 20 µM (MCF-7, MDA-MB-453, T47D) ve 25 µM (MDA-MB-231) curcumin 24 saat boyunca ve 2 mM atiprimod 1 saat önce uygulama (T47D) ve beraber uygulama (MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-231) olarak uygulanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyonlar sonunda her bir kuyucuktaki hücreler tripsin ile kaldırılarak 2000 rpm’ de 5 dakika boyunca santrifüj yardımıyla çöktürülmüştür. Hücre pelleti 50 µl PBS ile homojenize edildikten sonra 50 µl Tripan mavisi boyası eklenerek hemositometre lamında sayım yapılmıştır.

3.2.5. Floresans Boyama

3.2.5.1. Diheksiloksakarbosiyenin İyodür (DiOC6) Boyama

Curcumin ve atiprimod MCF-7, MDA-MB-453, T47D, MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemek amacıyla DiOC6 boyama gerçekleştirilmiştir. 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 7×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere 20 μM (MCF-7, MDA-MB-453, T47D) ve 25 μM (MDA-MB-231) curcumin 24 saat boyunca ve 2 mM Atiprimod 1 saat önce uygulama (T47D) ve 24 saat beraber uygulama (MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-231) olarak uygulanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 1 nM DiOC6 (ana stok: 4 mM) 30 dakika boyunca uygulanarak floresan mikroskobunda mavi filtre ile canlı hücreler belirlenmiştir.

3.2.5.2. Propidyum iyodür (PI) boyama

Curcumin MCF-7, MDA-MB-453, T47D MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla PI boyama gerçekleştirilmiştir. 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 7×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere 20 μM (MCF-7, MDA-MB-453, T47D) ve 25 μM (MDA-MB-231) curcumin 24 saat boyunca ve 2 mM atiprimod 1 saat önce uygulama (T47D) ve beraber uygulama (MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-231) olarak uygulanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 2 $\mu\text{g/ml}$ PI (ana stok: 50 mg/ml) uygulanarak 15 dakika etüvde inkübe edildikten sonra yeşil filtrede ölü hücreler belirlenmiştir.

3.2.5.3. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama

Curcuminin MCF-7, MDA-MB-453, T47D, MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla DAPI boyama gerçekleştirilmiştir. 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 7×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere 20 μM (MCF-7) ve 25 μM (MDA-MB-231) curcumin 24 saat boyunca ve 2 mM atiprimod 1 saat önce uygulama (T47D) ve beraber uygulama (MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-231) olarak uygulanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 1 $\mu\text{l/ml}$ DAPI boyası 30 dakika uygulanmıştır.

3.2.6. Hücre Akış Sitometresinde PI Analiz

Curcuminin Atiprimod aracılığı ile JAK/STAT sinyalinin inhibe edilmesi durumunda MCF-7, MDA-MB-453, T47D ve MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkisini belirlemek amacıyla PI boyaması sonrasında akış sitometresi gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrilere 3×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere 20 μ M (MCF-7, MDA-MB-453, T47D) ve 25 μ M (MDA-MB-231) curcumin 24 saat boyunca ve 2 mM atiprimod 1 saat önce uygulama (T47D) ve beraber uygulama (MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-231) olarak uygulanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler tripsin yardımıyla kaldırıldıktan sonra %70 soğuk etanol ile muamele edilip fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fikse edilen hücreler 1-2 hafta boyunca -20°C 'de inkübe edilmiştir. inkübasyon sonunda etanol uzaklaştırılarak 1 ml 1X PBS içerisinde 1 μ l PI (1 mg/ml) boyası olacak şekilde boyama yapılmıştır. Hücreler karanlıkta 30 dakika boyunca bekletildikten sonra akış sitometresi aletinde okutma yapılmıştır.

3.2.7. Annexin V/PI Boyama

MCF-7, MDA-MB-453, T47D ve MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin ve atiprimod apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla FITC annexin V apoptoz belirleyici kit kullanılmıştır. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 3×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere 20 μ M (MCF-7, MDA-MB-453, T47D) ve 25 μ M (MDA-MB-231) curcumin 24 saat boyunca ve 2 mM atiprimod 1 saat önce uygulama (T47D) ve beraber uygulama (MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-231) olarak uygulanarak inkübe edilmiştir. Hücreler tripsin yardımıyla kaldırılarak annexin V ve PI floresan boyalarıyla boyandıktan sonra 15 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücre akış sitometresinde FL-1 ve FL-2 kanallarında okutma yapılmıştır.

3.2.8. Gradyent PZR Analizler

Genomik DNA kullanılarak IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , IL-1 α ve 18S RNA PZR primerleri ile Master Mix (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak 65-50 °C arasında PZR gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra transluinatörde görüntülenmiştir. Her bir primerin dizisi, bağlanma sıcaklığı tabloda verilmiştir (Tablo 4). Ayrıca her bir primerler ile gerçekleştirilen Gradyent PZR için bağlanma sıcaklıkları tabloda verilmiştir (Tablo 5).

Tablo 4. RT-PZR'da kullanılan primerlerin optimum bağlanma sıcaklıkları.

Primer	Primer Dizileri (Forward: F, Reverse: R)	Bağlanma Sıcaklığı (°C)
IL-6	F:AATTCGGTACATCCTCGACGG R:GGTTGTTTTCTGCCAGTGCC	65
IL-8	F:GACCACACTGCGCCAACAC R:CTTCTCCACAACCCTCTGCAC	65
IL-10	F:GGTTGCCAAGCCTTGTCTGA R:AGGGAGTTCACATGCGCCT	50
IL-1 β	F:AAACAGATGAAGTGCTCCTTCCAGG R:TGGAGAACACCACTTGTGCTCCA	52.1
18S	F:CTACCACATCCAAGGAAGGCA R:TTTTTCGTCACCTACCTCCCCG	55

Tablo 5. Gradyent PZR bağlanma sıcaklıkları

A	B	C	D	E	F	G	H
65	64	62	59	55.9	53.2	51.1	50

3.2.9. Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Analizleri

MCF-7, MDA-MB-453, T47D ve MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin atiprimod ile JAK/STAT sinyalinin baskılanması durumunda IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , IL-1 α mRNA düzeyi üzerine etkisi RT-PCR ile belirlenmiştir. 2×10^6 hücre olacak şekilde 100 mm'lik hücre kültürü petrisine ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere 20 μ M (MCF-7, MDA-MB-453, T47D) ve 25 μ M (MDA-MB-231) curcumin 24 saat boyunca ve 2 mM atiprimod 1 saat önce uygulama (T47D) ve beraber uygulama (MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-231) olarak uygulanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler kazıyıcı yardımıyla kaldırılarak Trizol ajanı ile RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntüledikten sonra iScript cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir. cDNA'ların spektral analizleri yapıldıktan sonra IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , IL-1 α ve 18S RNA PZR primerleri ile master mix kullanılarak PZR gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primerlerin optimum bağlanma sıcaklıkları Tablo 1'de belirtilmiştir. PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra transilluminatörde görüntülenmiştir.

3.2.10. Total Protein İzolasyonu

100 mm'lik hücre kültürü petrilere 2×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca yapışmaları beklendikten sonra hücrelere 20 μ M (MCF-7, MDA-MB-453, T47D) ve 25 μ M (MDA-MB-231) curcumin 24 saat boyunca ve 2 mM atiprimod 1 saat önce uygulama (T47D) ve beraber uygulama (MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-231) olarak uygulanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler 1X PBS içerisinde kazıyıcı yardımıyla kazınarak toplandıktan sonra 2 dakika 13200 rpm'de çöktürülmüştür. Bu işlem petrideki bütün hücreler toplanana kadar tekrarlanmıştır. Santrifüjle çöktürülen hücrelere lizis tamponu eklenmiştir. Örnekler 20 dakika oda sıcaklığında çalkalıyıcıda inkübe edildikten sonra 20 dakika 13200 rpm de +4 °C de santrifüj yapılmıştır. Üst faz yeni ependorfa alınarak miktar tayini yapılmıştır.

3.2.11. Bradford Protein Miktar Tayini

İzole edilen proteinlerin miktar tayinini yapabilmek amacıyla Bradford tekniği kullanılmıştır. Konsantrasyonu 1,5 μ g/ μ l olan sığır serum albumini (BSA) kullanılarak önce standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğri şu şekilde oluşturulmuştur: 1,5 μ g/ μ l, 3 μ g/ μ l, 4,5 μ g/ μ l, 6 μ g/ μ l, 7,5 μ g/ μ l BSA'nın üzerine Bradford çözeltisi eklenerek 595 nm

dalga boyunda absorpsanları ölçülmüş, elde edilen proteinlerden 1 µg/µl alınarak aynı dalga boylarında absorpsanları belirlenmiştir. Standartların absorpsan/konsantrasyon grafiği elde edildikten sonra, bu grafiğin eğim eşitliliği kullanılarak absorpsan değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.2.12. İmmunoblotlama Yöntemi

3.2.12.1. Proteinlerin Hazırlanması ve SDS-PAGE'de Yürütülmesi

İmmunoblotlama yöntemi için 50 µg protein ile Laemli tamponu (5X) 1:4 oranda karıştırılarak 95°C'de 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. %4 yükleme ve %12'lik ayırma SDS-PAGE hazırlanarak, sistemde ilk kuyuda protein belirteci olacak şekilde proteinler bu jele yüklenmişlerdir. Jel yürütme tamponu içerisinde 80 V'de 4 saat boyunca yürütülmüştür.

3.2.12.2. Membrana Transfer ve Bloklama

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra yükleme jeli kesilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ayırma jeli büyüklüğünde poliviniliden florid (PVDF) membran jelin altına koyulmuştur. Membranın altına ve jelin üstüne transfer tamponu ile ıslatılmış filtre kağıtları olacak şekilde hazırlanan bu sistem transfer kasetine yerleştirilmiştir. 2,5 mili amper 25 voltta transferler gerçekleştirilmiştir. Büyük kilodalton proteinler 5-9 dakika arası, küçük kilodalton proteinler ise 2.5-4 dakika arasında olacak şekilde transferler yapılmıştır. Transfer işlemi sonunda membranlar %5'lik yağsız süt (%0.1 Tween20 içeren 1X TBS) içerisinde 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilerek bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.12.3. Primer ve Sekonder Antikor İşaretleme ve Bantların

Görüntülenmesi

Süt tozu içerisinden alınan membranlar, 1X TBS-Tween ile 5 dakika olmak üzere 3 kez yıkandıktan sonra, primer antikorlarla gece boyu +4 °C sıcaklıkta bekletilmişlerdir. Birincil antikorlar %5'lik yağsız süt tozu (% 0,1 Tween-20 içeren 1X TBS) içinde aşağıda belirlenen dilusyonlarda uygulanmışlardır:

β-aktin, IL-6, IL-10, BH, Bax, Bad, Bcl-2, Akt, PARP, Kaspaz-7, Gapdh her bir antikor TBS-Tween-20 ile hazırlanmış yağsız %5'lik süt tozu (Santa Cruz Biotechnology/SC-2325) kullanılarak 1:1000 olarak hazırlanıp uygulanmıştır. Anti-tavşan, anti-keçi ve

anti-fare ikincil antikorlar HRP-konjuge ikincil antikorlar 1:3000 olarak hazırlanıp uygulanmıştır (Cell Signaling Technology (CST)).

Primer antikorların uygulanmasını takiben membranlar 9'ar dakika boyunca oda sıcaklığında 3 kez TBS-Tween ile yıkanmıştır. Yıkama sonunda, membranlar anti-tavşan, anti-keçi ve anti-fare ikincil antikorlar (1:3000) ile gece boyu +4 °C sıcaklıkta bekletilmiştir. İkincil antikor uygulamasının ardından, 9'ar dakikalık 2 TBS-Tween ve 9 dakikalık TBS yıkaması sonrasında, örnekler kemiluminisans tampon (A ve B çözeltilerinin 1:1 karışımı) ile 5 dakika muamele edilmiştir. Membranlar kemiluminisans tamponu ile bekletildikten sonra, transluminatör aletinde görüntülenmiştir.

3.2.13. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizlerin yapılabilmesi amacı ile veriler GraphPad Prism 6. versiyon programı kullanılarak Two-way ANOVA ve Sidak çoklu veri analiz testi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca immunoblotlama sonuçları İmaje J programı ile yükleme kontrolü örneklerine göre değerlendirilmiştir. Tüm test sonuçları ilgili şekillerin altında istatiksel anlamlılık sınırları ile birlikte sunulmaktadır.

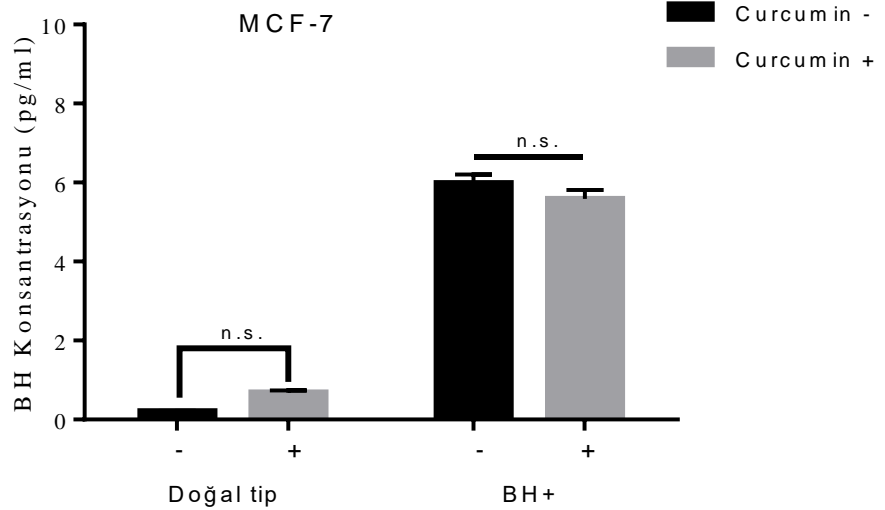
BÖLÜM IV.

4. SONUÇLAR

4.1. Curcuminin prolaktin, IGF-I, IL-6, IL-10 seviyeleri üzerine etkisinin MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücre hatlarında ELİZA ile gösterilmesi

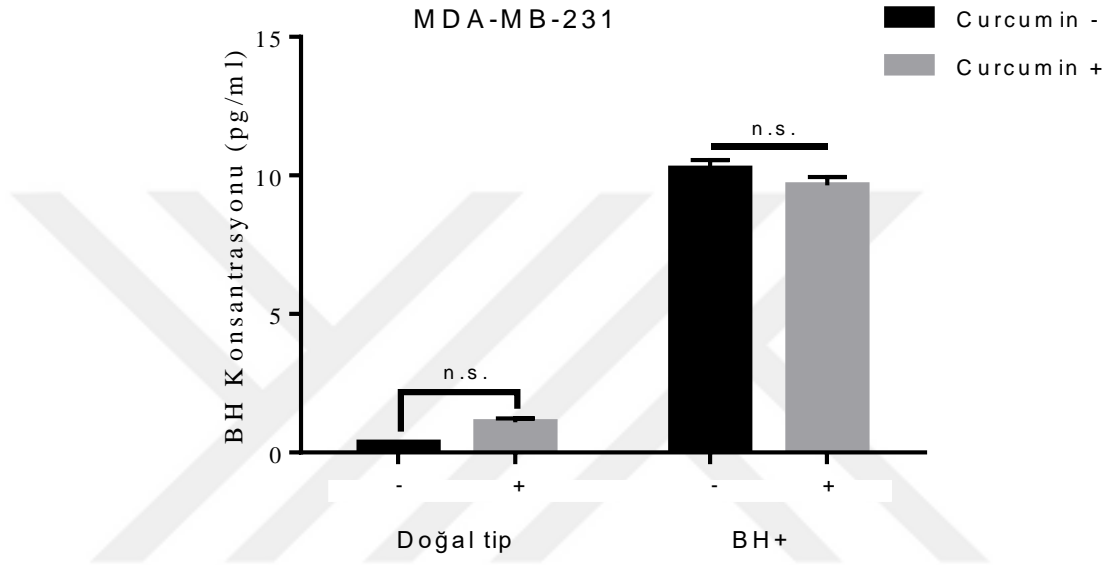
MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve otokrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarından salınan BH, prolaktin, IGF-I, IL-10 ve IL-6 bazal seviyeleri ile curcumin uygulaması durumunda hormon ve sitokinlerin üzerine etkisinin irdelenmesi için ELİZA tekniği kullanılmıştır.

BH ELİZA sonuçlarına göre, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin medyaya saldığı BH miktarı 0,215 pg/ml iken otokrin BH anlatımı kazandırılmış MCF-7 meme kanseri hücrelerinde BH seviyesi 5,986 pg/ml artmış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca curcumin uygulaması ile BH seviyesi doğal tip MCF-7 hücrelerinde 0,684 pg/ml artarken, otokrin BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücrelerinde 5,595 pg/ml azalmış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 11).



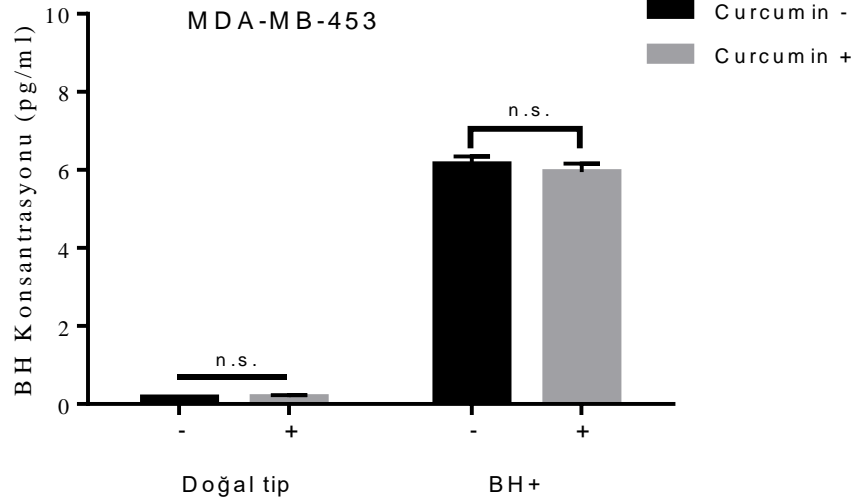
Şekil 11. MCF-7 hücre hattında BH seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant (anlamli değil))

MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde ise medyaya salınan BH miktarı 0,352 pg/ml iken otokrin BH anlatımı kazandırılmış MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde BH seviyesi 10,247 pg/ml artmış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca curcumin uygulaması ile BH seviyesi doğal tip MDA-MB-231 hücrelerinde 1,089 pg/ml artarken, otokrin BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücrelerinde 9,648 pg/ml azalmış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 12).



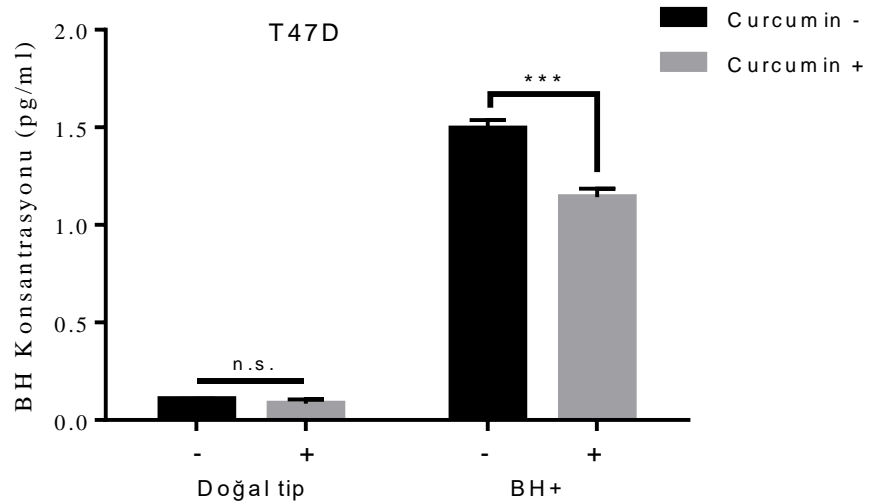
Şekil 12. MDA-MB-231 hücre hattında BH seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant)

MDA-MB-453 hücre hatlarında medyaya salınan BH miktarı 0,171 pg/ml iken otokrin BH anlatımı kazandırılmış MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde BH seviyesi 6,147 pg/ml artmış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca curcumin uygulaması ile BH seviyesi doğal tip MDA-MB-453 hücreleri 0,181 pg/ml olarak çok fazla etkilenmezken, otokrin BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücrelerinde BH anlatımı 5,948 pg/ml azalmış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 13).



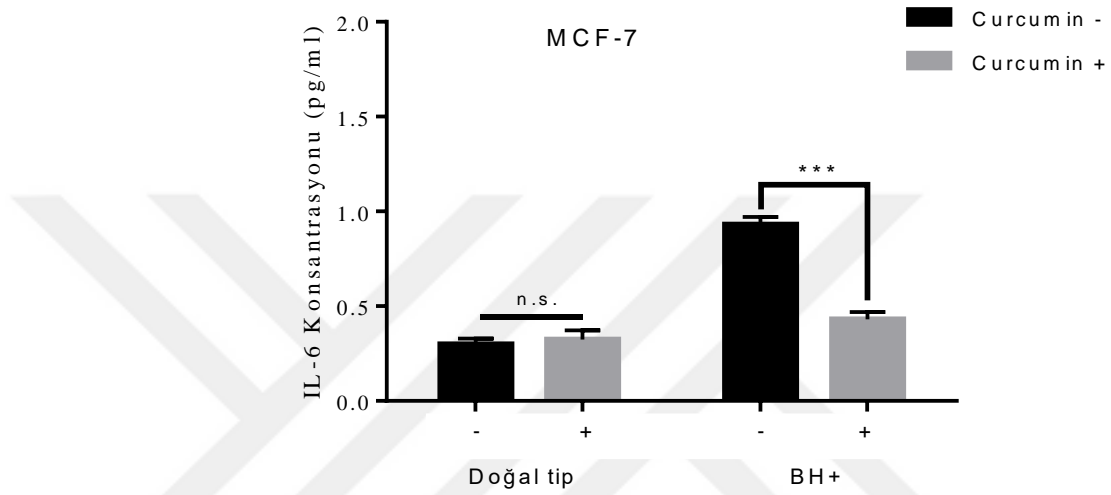
Şekil 13. MDA-MB-453 hücre hattında BH seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant)

T47D meme kanseri hücrelerinin medyaya saldığı BH miktarı 0,107 pg/ml iken otokrin BH anlatımı kazandırılmış T47D meme kanseri hücrelerinde BH seviyesi 1,493 pg/ml artmış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca curcumin uygulaması ile BH seviyesi doğal tip T47D hücrelerinde 0,084 pg/ml ve otokrin BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücrelerinde 1,142 pg/ml azalmış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 14).



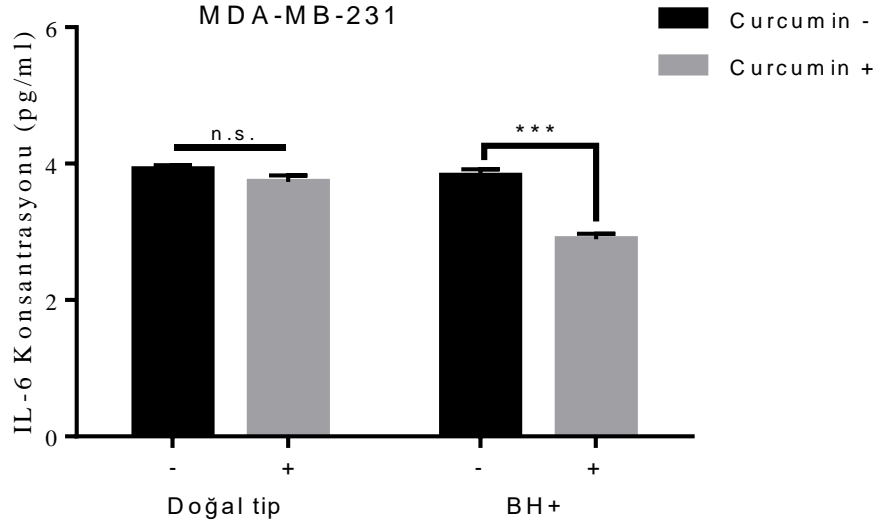
Şekil 14. T47D hücre hattında BH seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant, ***: p < 0,001)

IL-6 ELİZA sonuçlarına göre; MCF-7 doğal tip hücre hattında medyaya 0,298 pg/ml olarak salınan IL-6 sitokini, otokrin BH anlatımı MCF-7 hücrelerine kazandırıldığında 0,931 pg/ml olarak arttığı tespit edilmiştir. Curcumin uygulaması ile doğal tip MCF-7 meme kanseri hücrelerinde IL-6 seviyesi 0,325 pg/ml artarken, otokrin BH anlatımı kazandırılan MCF-7 hücrelerinde ise 0,431 pg/ml azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 15).



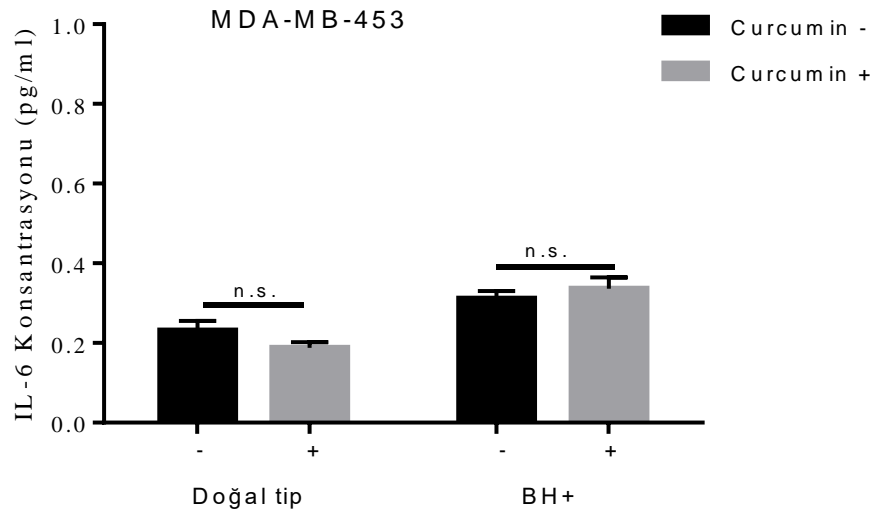
Şekil 15. MCF-7 hücre hattında IL-6 seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant, ***: $p < 0,001$)

MDA-MB-231 doğal tip hücre hattında medyaya 3,917 pg/ml olarak salınan IL-6 sitokini, otokrin BH anlatımı MDA-MB-231 hücrelerine kazandırıldığında 3,820 pg/ml olarak azaldığı tespit edilmiştir. Curcumin uygulaması ile doğal tip MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde IL-6 seviyesi 3,731 pg/ml ve otokrin BH anlatımı kazandırılan MDA-MB-231 hücrelerinde ise 2,895 pg/ml azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 16).



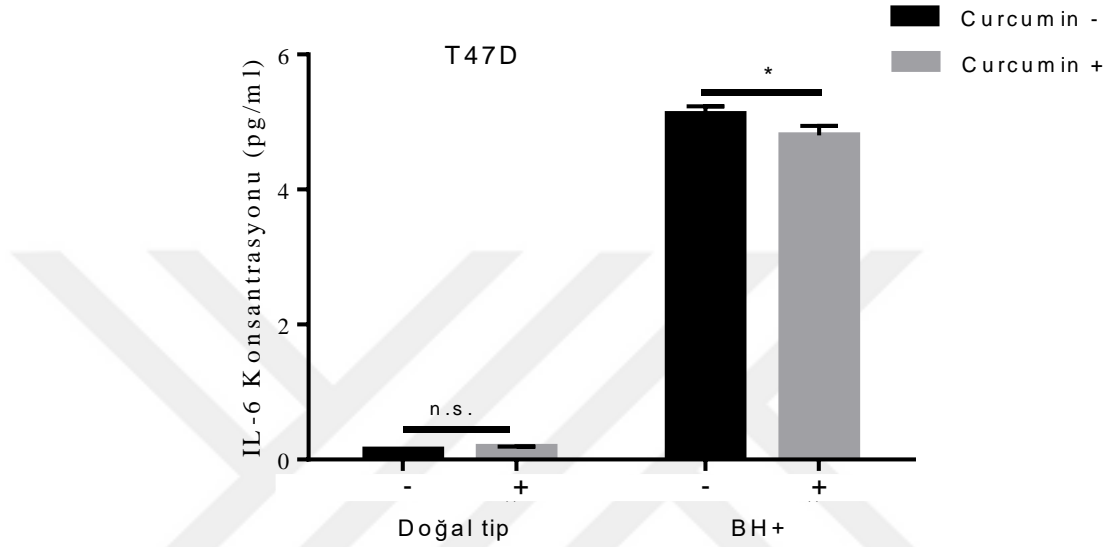
Şekil 16. MDA-MB-231 hücre hattında IL-6 seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant, ***: $p < 0,001$)

IL-6 ELİZA sonuçlarına göre; MDA-MB-453 doğal tip hücre hattında medyaya salınan IL-6 sitokini 0,231 pg/ml olarak, otokrin BH anlatımı MDA-MB-453 hücrelerine kazandırıldığında 0,311 pg/ml olarak arttığı tespit edilmiştir. Curcumin uygulaması ile doğal tip MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde IL-6 seviyesi 0,188 pg/ml azalırken, otokrin BH anlatımı kazandırılan MDA-MB-453 hücrelerinde ise 0,336 pg/ml arttığı tespit edilmiştir (Şekil 17).



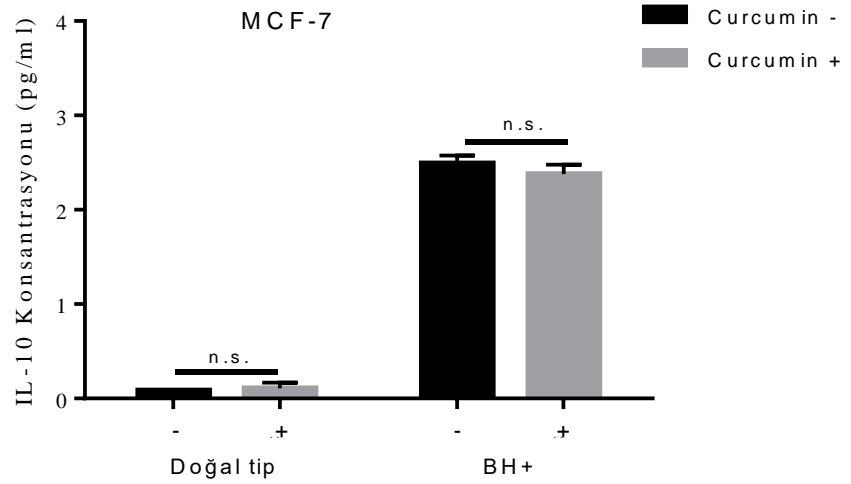
Şekil 17. MDA-MB-453 hücre hattında IL-6 seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant)

T47D doğal tip hücre hattında medyaya 0,145 pg/ml olarak salınan IL-6 sitokini, otokrin BH anlatımı T47D hücrelerine kazandırıldığında 5,120 pg/ml olarak arttığı tespit edilmiştir. doğal tip T47D meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulaması ile IL-6 seviyesi 0,185 pg/ml artarken, otokrin BH anlatımı kazandırılan T47D hücrelerinde ise 4,800 pg/ml azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 18).



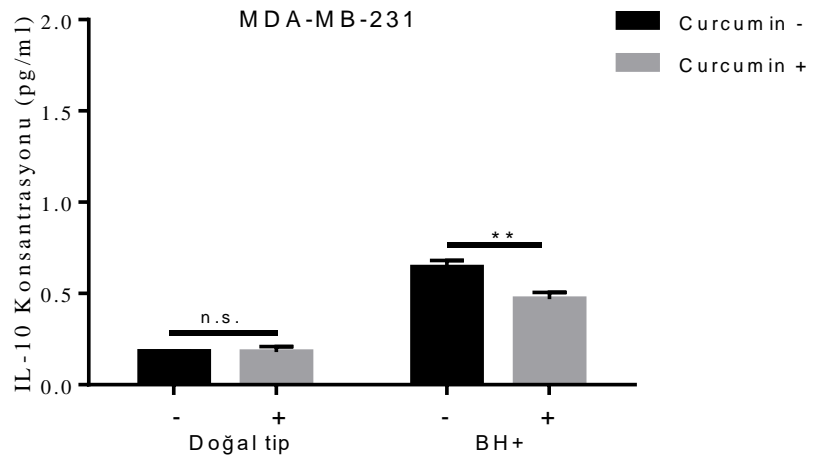
Şekil 18. T47D hücre hattında IL-6 seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant, *: $p < 0,05$)

IL-10 ELİZA sonuçlarına göre; MCF-7 doğal tip hücre hattında medyaya 0,086 pg/ml olarak salınan IL-10 sitokini, otokrin BH anlatımı MCF-7 hücrelerine kazandırıldığında 2,491 pg/ml olarak arttığı tespit edilmiştir. doğal tip MCF-7 meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulaması ile IL-10 seviyesi 0,108pg/ml artarken, otokrin BH anlatımı kazandırılan MCF-7 hücrelerinde ise 2,378 pg/ml azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 19).



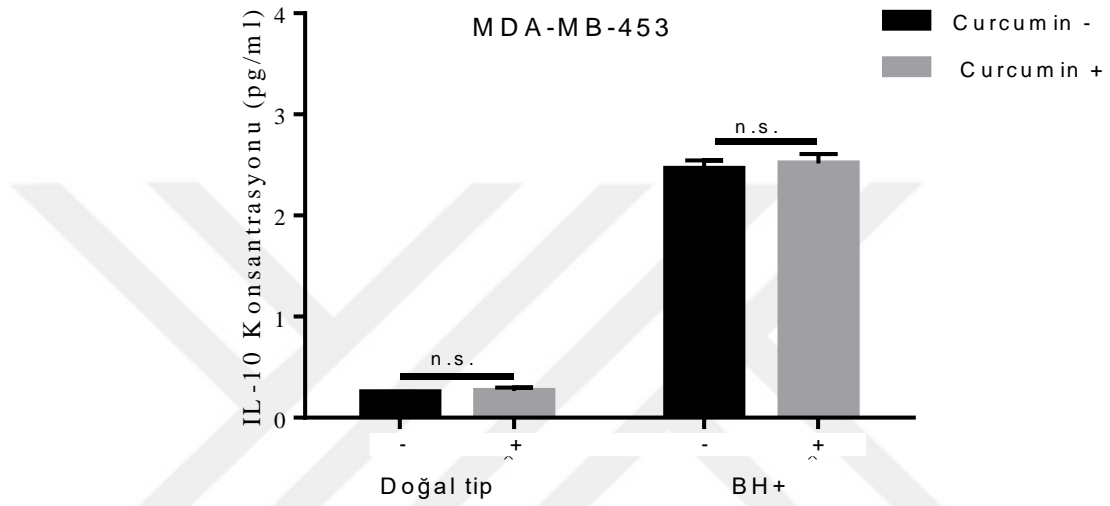
Şekil 19. MCF-7 hücre hattında IL-10 seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant)

MDA-MB-231 doğal tip hücre hattında ise medyaya salınan IL-10 sitokini 0,180 pg/ml olarak, otokrin BH anlatımı MDA-MB-231 hücrelerine kazandırıldığında 0,642 pg/ml olarak arttığı tespit edilmiştir. Curcumin uygulaması ile doğal tip MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde IL-10 seviyesi 0,177 pg/ml ve otokrin BH anlatımı kazandırılan MDA-MB-231 hücrelerinde ise 0,469 pg/ml azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 20).



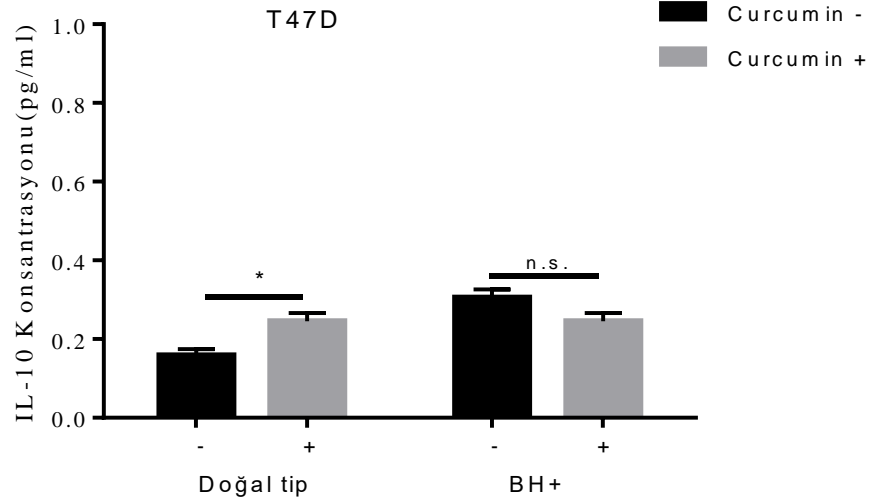
Şekil 20. MDA-MB-231 hücre hattında IL-10 seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant, **: p < 0,01)

Doğal tip MDA-MB-453 hücre hattında medyaya 0,253 pg/ml olarak salınan IL-10 sitokini, otkrin BH anlatımı MDA-MB-453 hücrelerine kazandırıldığında 2,460 pg/ml olarak arttığı tespit edilmiştir. Doğal tip MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulaması ile IL-10 seviyesi 0,264 pg/ml ve otkrin BH anlatımı kazandırılan MDA-MB-453 hücrelerinde ise 2,513 pg/ml arttığı tespit edilmiştir (Şekil 21).



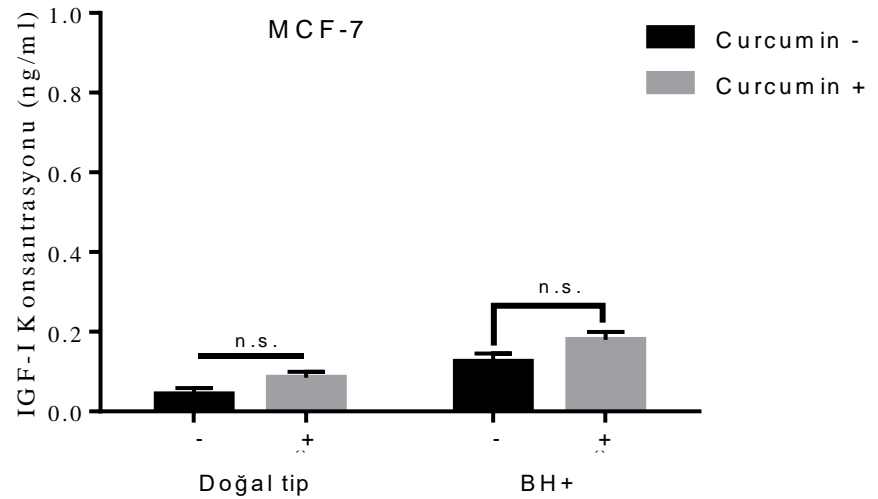
Şekil 21. MDA-MB-453 hücre hattında IL-10 seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant)

T47D doğal tip hücre hattında medyaya 0,159 pg/ml olarak salınan IL-10 sitokini, otkrin BH anlatımı T47D hücrelerine kazandırıldığında 0,305 pg/ml olarak arttığı tespit edilmiştir. Curcumin uygulaması ile doğal tip T47D meme kanseri hücrelerinde IL-10 seviyesi 0,245 pg/ml artarken, otkrin BH anlatımı kazandırılan T47D hücrelerinde ise 0,245 pg/ml azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 22).



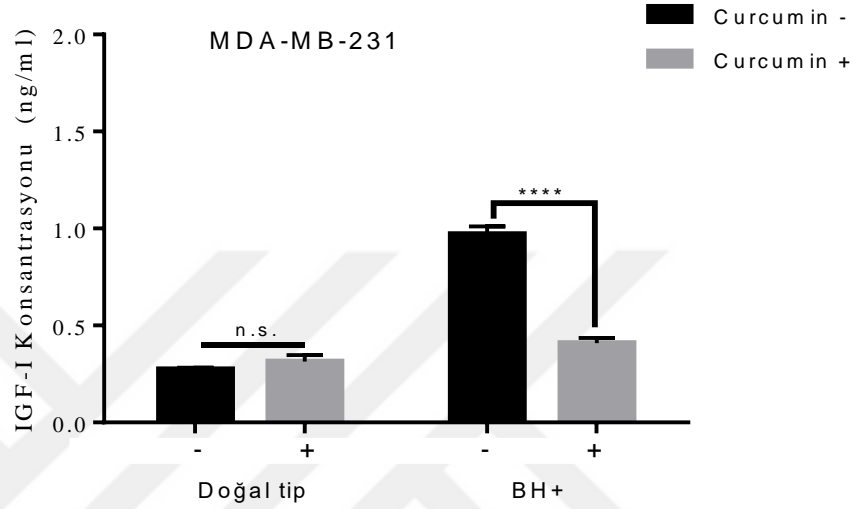
Şekil 22. T47D hücre hattında IL-10 seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant, *: $p < 0,05$)

IGF-I ELİZA sonuçlarına göre; MCF-7 doğal tip hücre hattında medyaya 0,043 ng/ml olarak salınan IGF-I, otokrin BH anlatımı MCF-7 hücrelerine kazandırıldığında 0,124 ng/ml olarak arttığı tespit edilmiştir. Curcumin uygulaması ile doğal tip MCF-7 meme kanseri hücrelerinde IGF-I seviyesi 0,084 ng/ml ve otokrin BH anlatımı kazandırılan MCF-7 hücrelerinde ise 0,179 ng/ml arttığı tespit edilmiştir (Şekil 23).



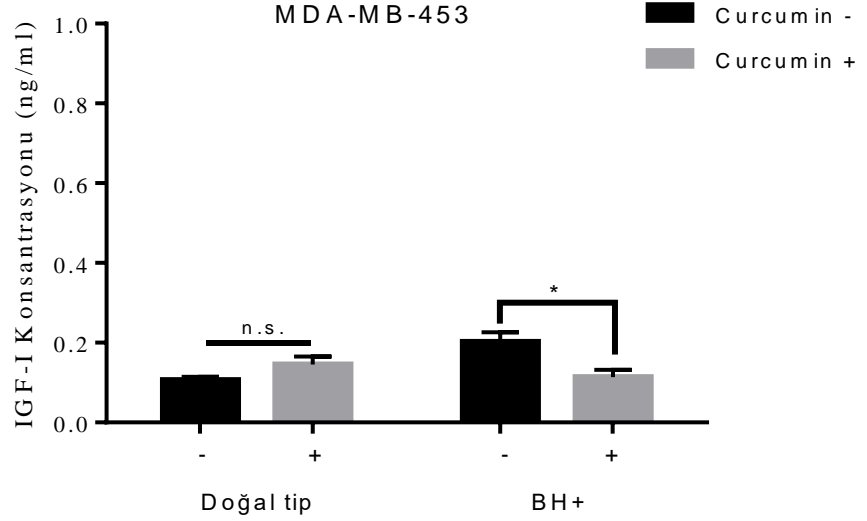
Şekil 23. MCF-7 hücre hattında IGF-I seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant)

MDA-MB-231 doğal tip hücre hattında ise medyaya 0,273 ng/ml olarak salınan IGF-I, otokrin BH anlatımı MDA-MB-231 hücrelerine kazandırıldığında 0,971 ng/ml olarak arttığı tespit edilmiştir. Doğal tip MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulaması ile IGF-I seviyesi 0,315 ng/ml artarken, otokrin BH anlatımı kazandırılan MDA-MB-231 hücrelerinde ise 0,409 ng/ml azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 24).



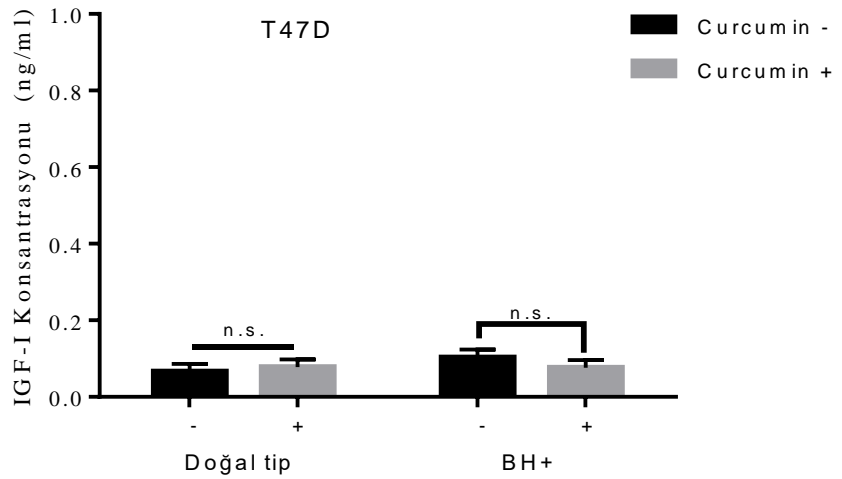
Şekil 24. MDA-MB-231 hücre hattında IGF-I seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant, ****: $p < 0,0001$)

IGF-I ELİZA sonuçlarına göre; MDA-MB-453 doğal tip hücre hattında medyaya 0,106 ng/ml olarak salınan IGF-I, otokrin BH anlatımı MDA-MB-453 hücrelerine kazandırıldığında 0,202 ng/ml olarak arttığı tespit edilmiştir. Curcumin uygulaması ile doğal tip MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde IGF-I seviyesi 0,145 ng/ml artarken, otokrin BH anlatımı kazandırılan MDA-MB-453 hücrelerinde ise 0,113 ng/ml azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 25).



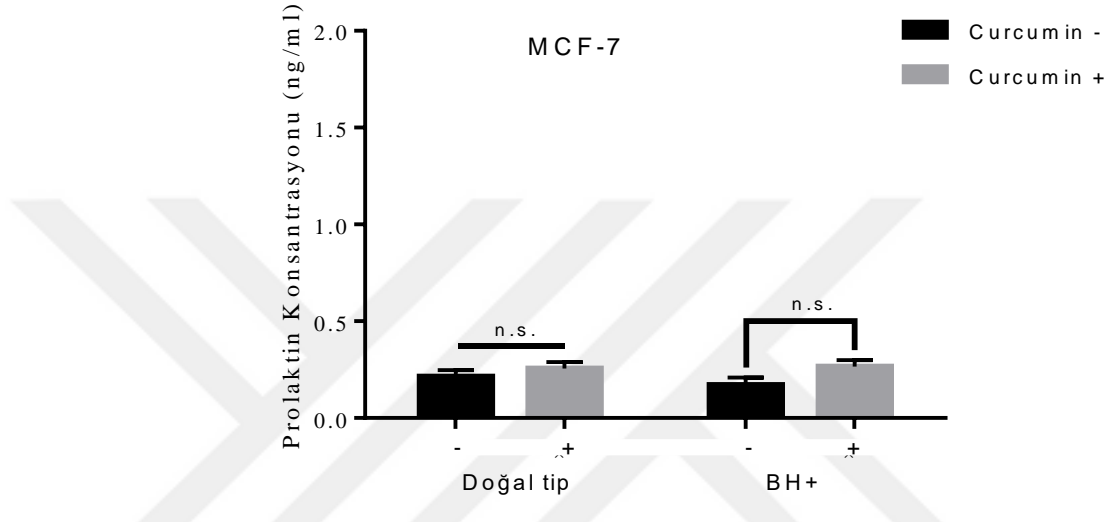
Şekil 25. MDA-MB-453 hücre hattında IGF-I seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant, *: $p < 0,05$)

Doğal tip T47D hücre hattında medyaya 0,066 ng/ml olarak salınan IGF-I, otokrin BH anlatımı T47D hücrelerine kazandırıldığında 0,103 ng/ml olarak arttığı tespit edilmiştir. Doğal tip T47D meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulaması ile IGF-I seviyesi 0,078 ng/ml artarken, otokrin BH anlatımı kazandırılan T47D hücrelerinde ise 0,075 ng/ml azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 26).



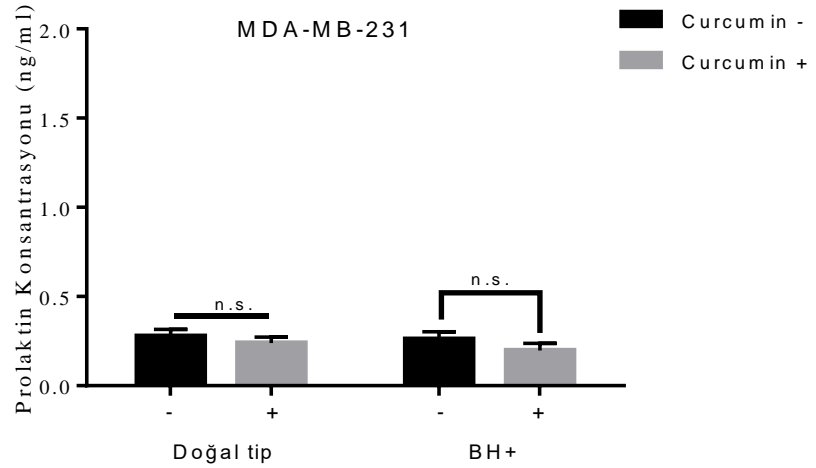
Şekil 26. T47D hücre hattında IGF-I seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant)

Prolaktin ELİZA sonuçlarına göre; MCF-7 doğal tip hücre hattında medyaya 0,213 ng/ml olarak salınan prolaktin, otokrin BH anlatımı MCF-7 hücrelerine kazandırıldığında 0,171 ng/ml olarak azaldığı tespit edilmiştir. Curcumin uygulaması ile doğal tip MCF-7 meme kanseri hücrelerinde prolaktin seviyesi 0,256 ng/ml ve otokrin BH anlatımı kazandırılan MCF-7 hücrelerinde ise 0,266 ng/ml arttığı tespit edilmiştir (Şekil 27).



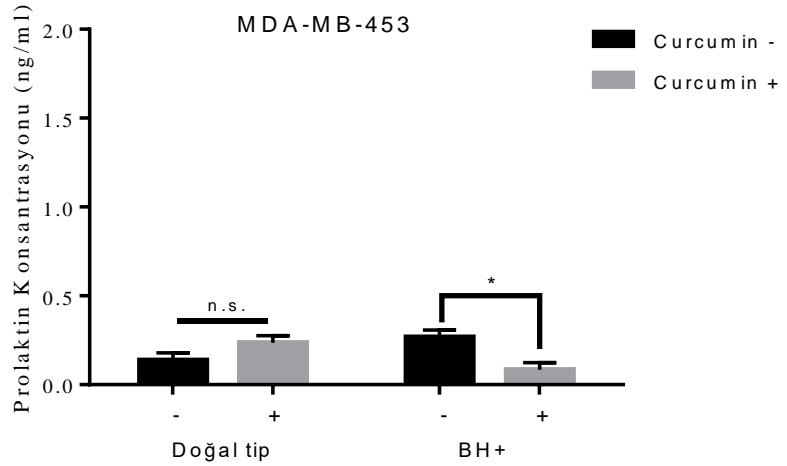
Şekil 27. MCF-7 hücre hattında prolaktin seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant)

Doğal tip MDA-MB-231 hücre hattında medyaya salınan prolaktin 0,276 ng/ml olarak, otokrin BH anlatımı MDA-MB-231 hücrelerine kazandırıldığında 0,261 ng/ml olarak azaldığı tespit edilmiştir. Doğal tip MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulaması ile prolaktin seviyesi 0,239 ng/ml, otokrin BH anlatımı kazandırılan MDA-MB-231 hücrelerinde ise 0,197 ng/ml azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 28).



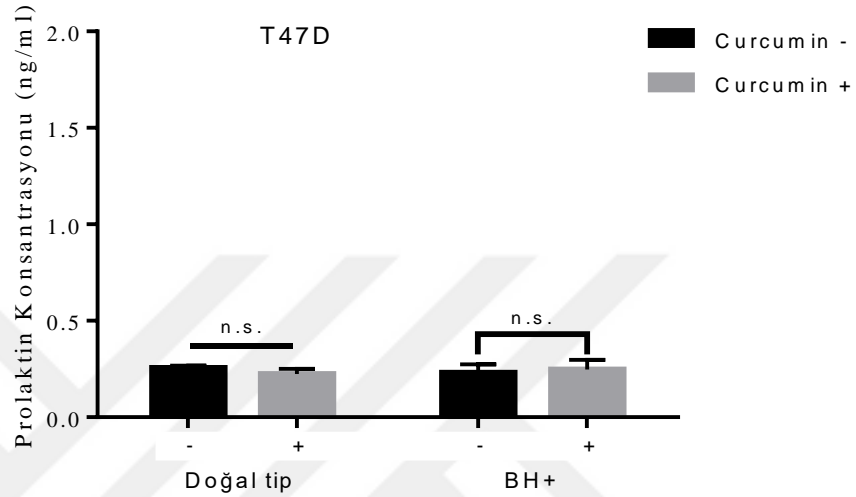
Şekil 28. MDA-MB-231 hücre hattında prolaktin seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant)

MDA-MB-453 doğal tip hücre hattında medyaya 0,138 ng/ml olarak salınan prolaktin, otokrin BH anlatımı MDA-MB-453 hücrelerine kazandırıldığında 0,267 ng/ml olarak arttığı tespit edilmiştir. Curcumin uygulaması ile doğal tip MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde prolaktin seviyesi 0,235 pg/ml artarken, otokrin BH anlatımı kazandırılan MDA-MB-453 hücrelerinde ise 0,084 pg/ml azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 29).



Şekil 29. MDA-MB-453 hücre hattında prolaktin seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant, *: $p < 0,05$)

Medyaya salınan prolaktin T47D doğal tip hücre hattında 0,255 ng/ml olarak, otokrin BH anlatımı T47D hücrelerine kazandırıldığında 0,231 ng/ml olarak azaldığı tespit edilmiştir. T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulaması ile prolaktin seviyesi 0,224 ng/ml azalırken, otokrin BH anlatımı kazandırılan T47D hücrelerinde ise 0,247 ng/ml arttığı tespit edilmiştir (Şekil 30).

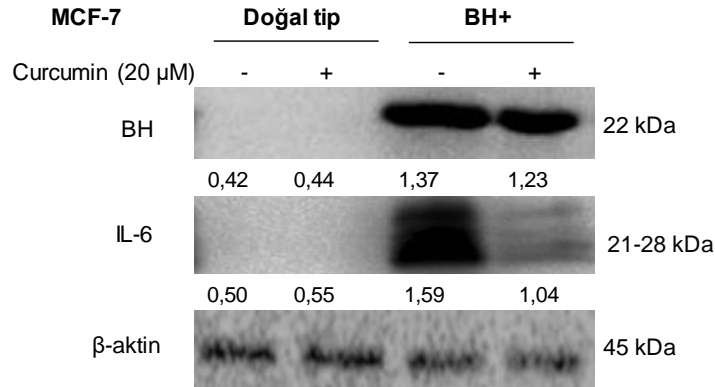


Şekil 30. T47D hücre hattında Prolaktin seviyeleri üzerine curcumin etkisinin ELİZA tekniği ile gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant)

4.2. Curcumin'nin BH ve IL-6 anlatımı üzerine etkisinin MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında immunoblotlama ile gösterilmesi

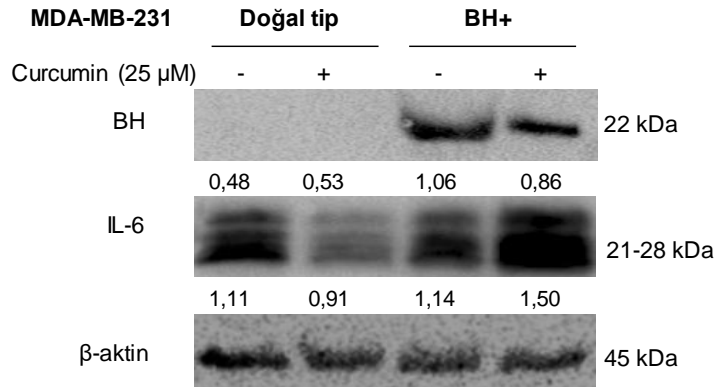
MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında BH, IL-6 anlatım durumları curcumin uygulaması olmadan ve olduğu durumlarda immunoblotlama tekniği ile gösterilmiştir. MCF-7 doğal tip meme kanseri hücre hatlarında BH bazal anlatımı bulunmadığı, ancak otokrin BH anlatımı BH geni içeren plazmit aktarımı aracılığı ile kazandırıldığı immunoblotlama ile gösterilmiştir. Curcumin uygulaması ile otokrin BH anlatımı yapan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde BH anlatımının azaldığı immunoblotlama ile gösterilmiştir. IL-6 bazal anlatımının MCF-7 doğal tip hücrelerinde anlatımının olmadığı, otokrin BH anlatımı kazandırılan MCF-7 hücrelerinde ise IL-6 bazal anlatımının arttığı tespit edilmiştir. Curcumin

uygulamasının otokrin BH anlatımı yapan MCF-7 hücrelerinde IL-6 anlatımını baskıladığı gösterilmiştir (Şekil 31).



Şekil 31. MCF-7 hücre hattında BH ve IL-6 anlatımının immunoblotlama tekniği kullanılarak gösterilmesi

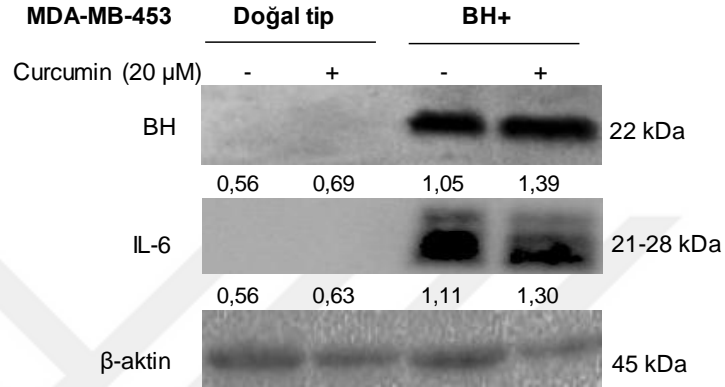
Doğal tip MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında BH bazal anlatımı bulunmadığı, BH geni kazandırılmış MDA-MB-231 hücrelerinde otokrin BH anlatımının varlığı immunoblotlama ile gösterilmiştir. Curcumin uygulaması ile otokrin BH anlatımı yapan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde BH anlatımının azaldığı immunoblotlama ile gösterilmiştir. IL-6 bazal anlatımının MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde anlatımının olduğu, otokrin BH anlatımı kazandırılan MDA-MB-231 hücrelerinde ise IL-6 bazal anlatımının arttığı tespit edilmiştir. Curcumin uygulamasının otokrin BH anlatımı yapan MDA-MB-231 hücrelerinde IL-6 anlatımını arttırdığı gösterilmiştir (Şekil 32).



Şekil 32. MDA-MB-231 hücre hattında BH ve IL-6 anlatımının immunoblotlama tekniği kullanılarak gösterilmesi

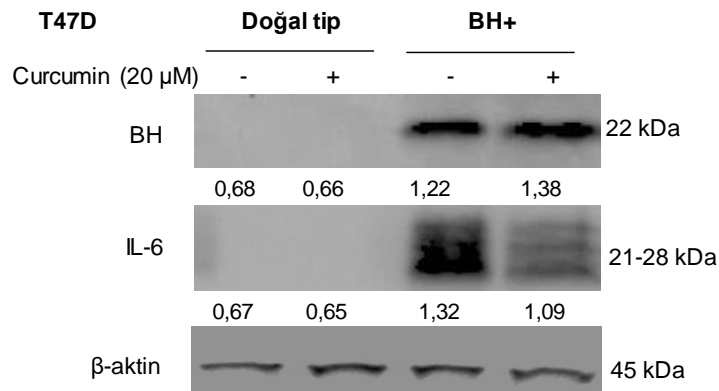
MDA-MB-453 doğal tip meme kanseri hücre hatlarında BH bazal anlatımı bulunmadığı, ancak otokrin BH anlatımı BH geni içeren plazmit aktarımı aracılığı ile

kazandırıldığı immunoblotlama ile belirlenmiştir. Curcumin uygulaması ile otokrin BH anlatımı yapan MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde BH anlatımının arttığı immunoblotlama ile gösterilmiştir. MDA-MB-453 doğal tip hücrelerinde IL-6 bazal anlatımının olmadığı, otokrin BH anlatımı kazandırılan MDA-MB-453 hücrelerinde ise IL-6 bazal anlatımının arttığı tespit edilmiştir. Otokrin BH anlatımı yapan MDA-MB-453 hücrelerinde curcumin uygulamasının IL-6 anlatımını arttırdığı gösterilmiştir (Şekil 33).



Şekil 33. MDA-MB-453 hücre hattında BH ve IL-6 anlatımının immunoblotlama tekniği kullanılarak gösterilmesi

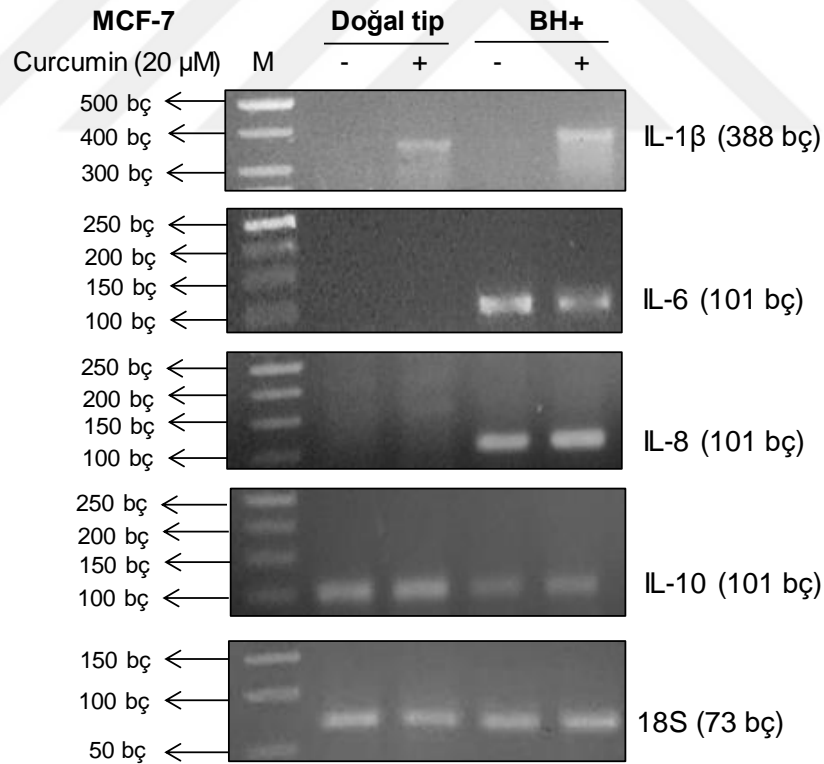
Doğal tip T47D meme kanseri hücre hatlarında BH bazal anlatımı bulunmadığı, ancak BH geni kazandırılmış T47D hücrelerinde otokrin BH anlatımının varlığı immunoblotlama ile belirlenmiştir. Curcumin uygulaması ile otokrin BH anlatımı yapan T47D meme kanseri hücrelerinde BH anlatımının arttığı immunoblotlama ile gösterilmiştir. IL-6 bazal anlatımının doğal tip T47D hücrelerinde anlatımının olmadığı, otokrin BH anlatımı kazandırılan T47D hücrelerinde ise IL-6 bazal anlatımının arttığı tespit edilmiştir. Curcumin uygulamasının otokrin BH anlatımı yapan T47D hücrelerinde IL-6 anlatımını baskılandığı gösterilmiştir (Şekil 34).



Şekil 34. T47D hücre hattında BH ve IL-6 anlatımının immunoblotlama tekniği kullanılarak gösterilmesi

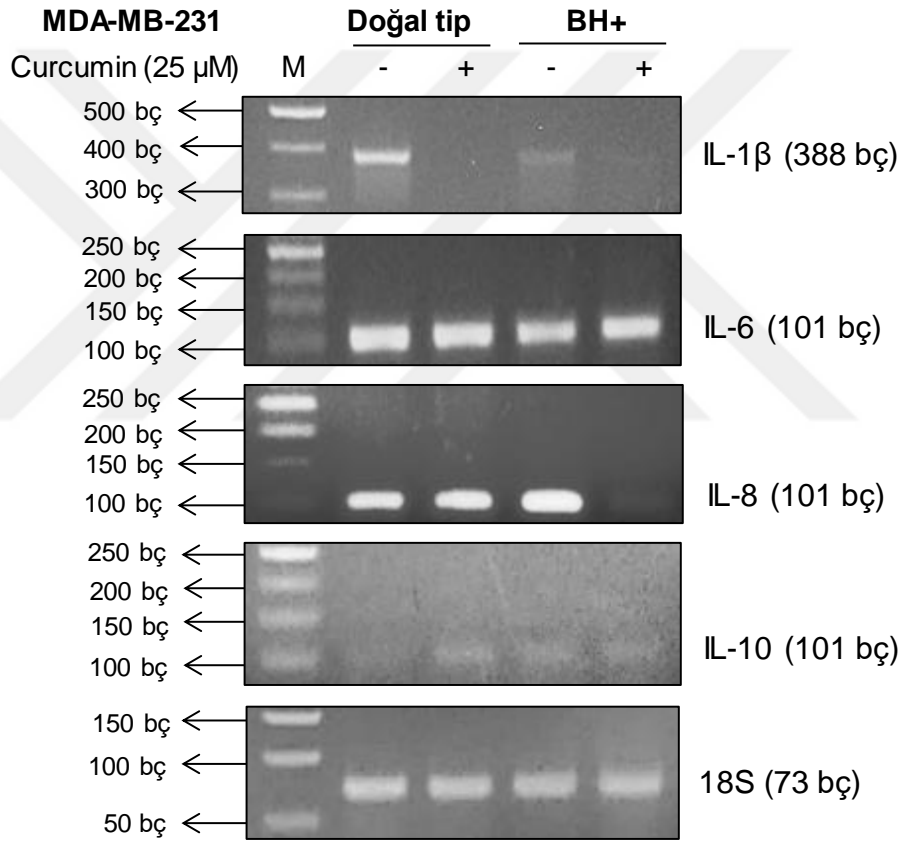
4.3. Curcumin'in MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve otokrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında sitokinler üzerine etkisinin gösterilmesi

Curcumin'in MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve otokrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında IL-1 β , IL-6 gibi pro-inflammatuar ve IL-8 ve IL-10 gibi anti-inflammatuar sitokinlerin anlatımı üzerine etkisini belirlemek amacıyla RT-PCR tekniği kullanılmıştır. MCF-7 meme kanseri hücrelerin BH anlatımı kazandırılması IL-6 ve IL-8 anlatımınlarını arttırdığı tespit edilmiştir. Curcumin uygulamasının MCF-7 BH+ meme kanseri hücrelerinde IL-6 anlatımını azaltırken, IL-8 anlatımını arttırdığı belirlenmiştir. Curcumin uygulaması hem doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde IL-1 β anlatımını arttırdığı gözlemlenmiştir. Ancak BH anlatımının arttırılması MCF-7 hücrelerinde IL-10 anlatımını curcumin uygulamasından bağımsız olarak azalttığı belirlenmiştir. IL-10 anlatımını curcumin uygulaması ile artış belirlenmektedir (Şekil 35).



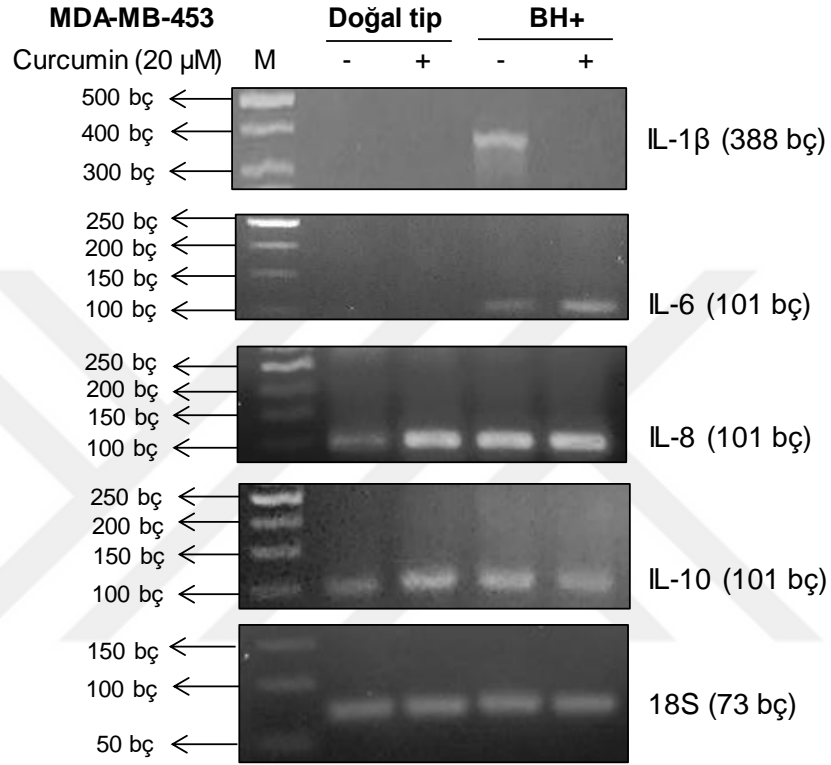
Şekil 35. MCF-7 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcuminin interlökinler üzerine etkisinin gösterilmesi. M: Markır (50 bç).

MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerin BH anlatımı kazandırılması IL-8 anlatımını artırırken, IL-1 β bazal anlatımını azattığı gözlenmiştir. Curcumin uygulaması ile hem doğal tip hem BH+ MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde IL-1 β ve IL-8 anlatımının baskılandığı tespit edilmiştir. IL-6 anlatımı üzerine curcumin doğal tip MDA-MB231 meme kanseri hücrelerinde baskılama etkisini az da olsa gösterirken BH+ hücrelerinde baskılanma tespit edilmemiştir. Doğal tip MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulaması ile IL-10 anlatımı artarken, BH+ meme kanseri hücrelerinde IL-10 anlatımı üzerine herhangi bir etkisi tespit edilememiştir (Şekil 36).



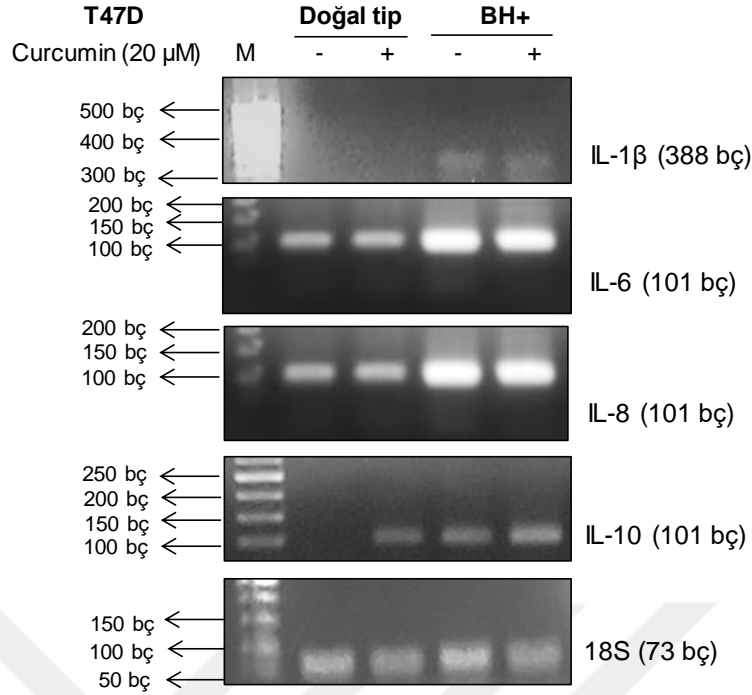
Şekil 36. MDA-MB-231 doğal tip ve BH anlatımı artırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcuminin interlökinler üzerine etkisinin gösterilmesi. M: Markır (50 bç).

MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerine BH anlatımı kazandırılması IL-1 β , IL-6, IL-10 ve IL-8 anlatımını arttırmıştır. Curcumin uygulaması ile, IL-1 β ve IL-10 anlatımının baskılandığı ancak IL-6 anlatımında az bir artış tespit edilebilmiştir. Ancak IL-8 anlatımı üzerine curcumin uygulamasının etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 37).



Şekil 37. MDA-MB-453 doğal tip ve BH anlatımı artırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcuminin interlökinler üzerine etkisinin gösterilmesi. M: Markır (50 bç).

T47D meme kanseri hücrelerin BH anlatımı kazandırılması IL-1 β , IL-6, IL-8 ve IL-10 anlatımını arttırdığı doğal tip parentel hücrelere kıyasla tespit edilmiştir. Ancak curcumin uygulaması ile IL-1 β , IL-6, belirgin olarak anlatımları baskılanırken, IL-10 anlatımında artış ve IL-8 gen anlatımı üzerinde azda olsa bir azalma tespit edilmiştir (Şekil 38).



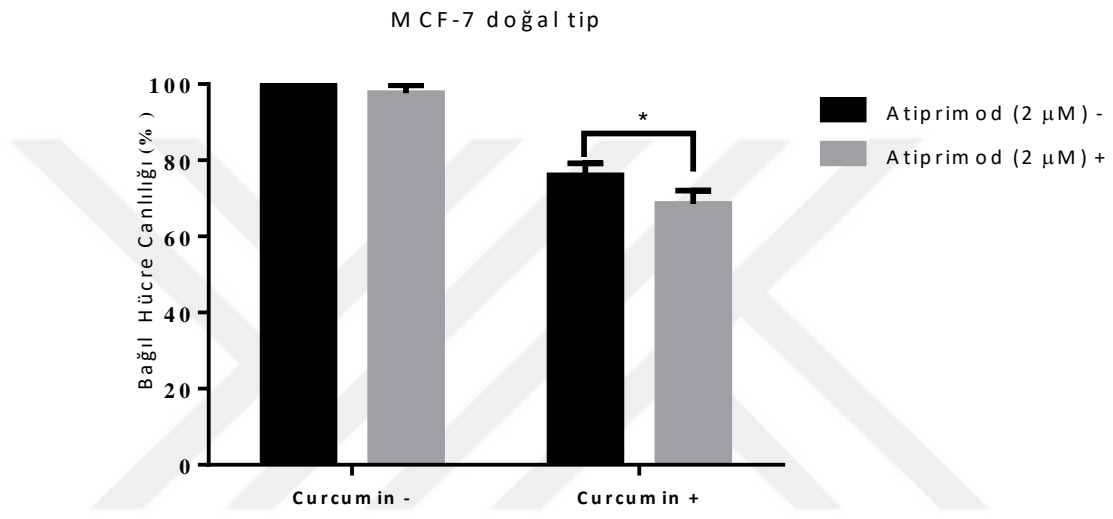
Şekil 38. T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcuminin interlökinler üzerine etkisinin gösterilmesi. M: Markır (50 bç).

4.4. Atiprimodun curcumin hücre canlılığı üzerine etkisindeki rolünün MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında incelenmesi

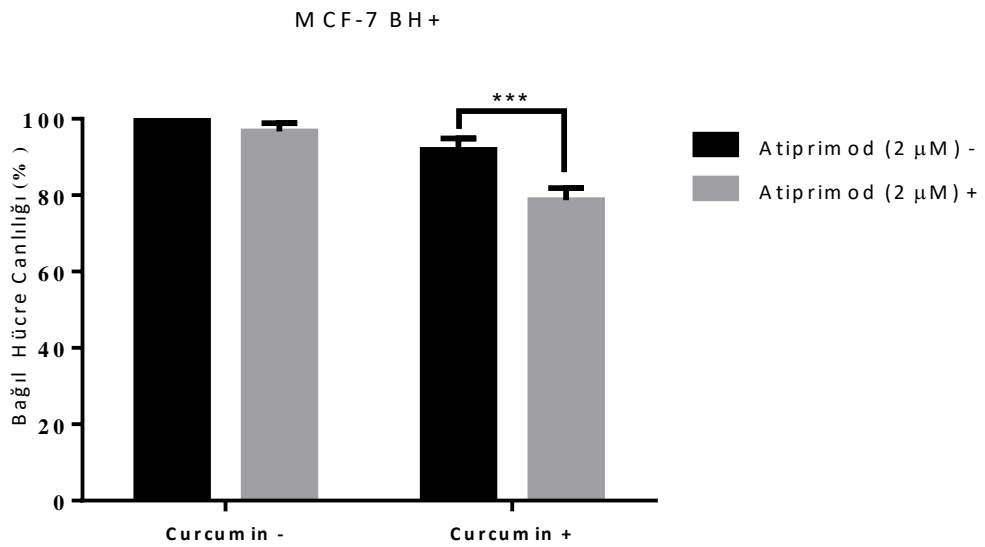
MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında yalnız curcumin ve curcumin ile beraber atiprimod uygulandığında hücre canlılığı üzerine etkisi MTT tekniği kullanılarak belirlenmiştir.

MCF-7 doğal tip meme kanseri hücre hattında, 24 saat 20 µM curcumin uygulamasının hücre canlılığına % 76 oranında ket vururken (p: <0,0001), BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında %91 hücre canlılığı görülmüştür (p: 0,2485). MCF-7 doğal tip hücrelerde sadece curcumin uygulaması hücre canlılığına % 76 ket vururken, atiprimodla beraber curcumin uygulamasının hücre canlılığını % 68 düşürdüğü tespit edilmiştir (p: 0,0251). Otokrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında sadece curcumin uygulaması % 91 iken, atiprimodla beraber curcumin uygulamasının hücre canlılığına % 78'dir ket vurduğu tespit edilmiştir (p: 0,0545). Atiprimod'un MCF-7 doğal tip meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığını kontrol hücrelere kıyasla % 97'ye düşürdüğü (p: 0, 5456), otokrin BH anlatımı yapan

MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ise atiprimod uygulamasının % 96'ya düşürdüğü tespit edilmiştir (p: 0,7665). Curcumin uygulanmasının doğal tip hücre hattında, BH anlatımı arttırılmış hücre hattına oranla daha fazla hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir. Buradan otokrin BH anlatımının curcumin'e karşı bir direnç geliştirdiği tespit edilmiştir. Ancak atiprimod uygulaması ile curcuminin hücre canlılığı ket vurma potansiyelini arttırdığı gösterilerek curcumin ile atiprimod beraber uygulamasının otokrin BH bağlı ilaç direncinin kırıldığı MCF-7 meme kanseri hücrelerinde gösterilmiştir (Şekil 39, 40).

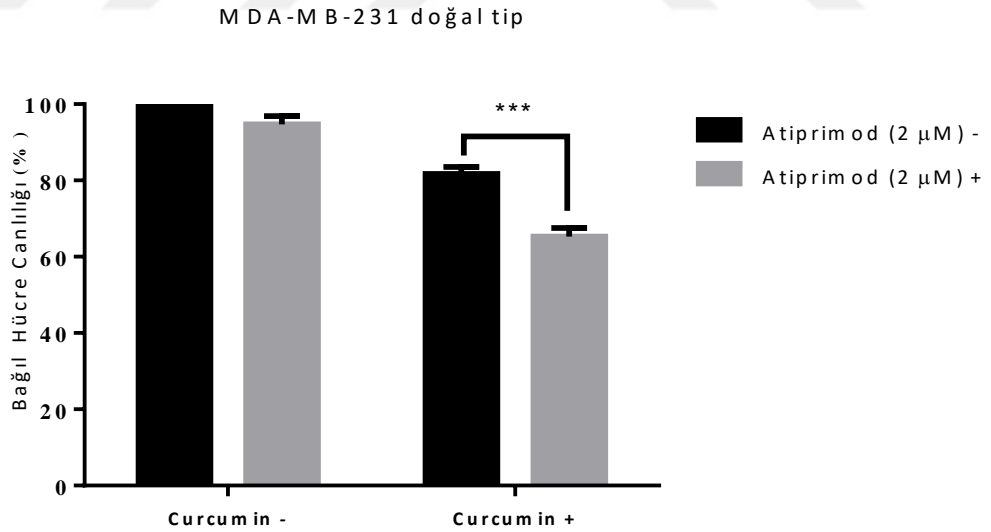


Şekil 39. MCF-7 doğal tip meme kanseri hücre hattında curcumin ve atiprimodun hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, *: p < 0,05)

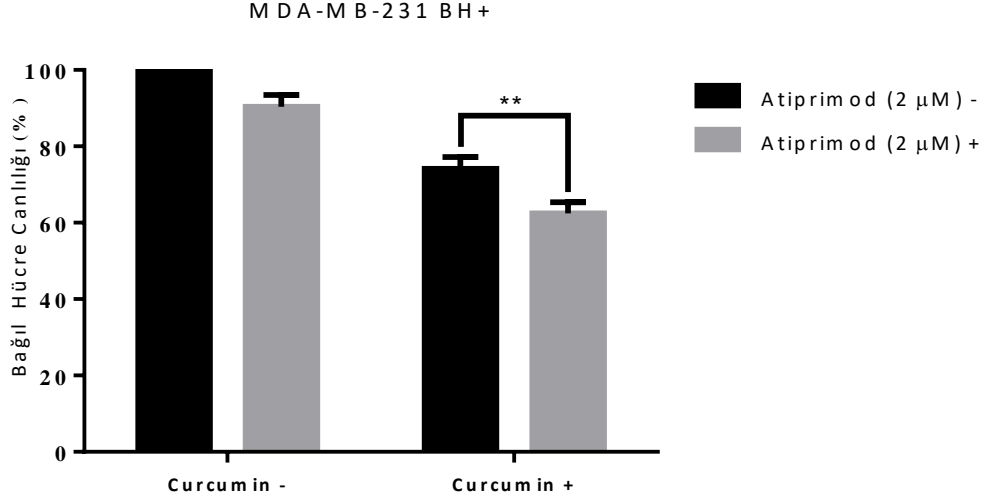


Şekil 40. MCF-7 BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hattında curcumin ve atiprimodun hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, ***: p < 0,001)

MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücre hattında, 24 saat 25 μ M curcumin uygulamasının hücre canlılığına % 81 oranında ket vururken (p: 0,0002), BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcumin uygulamasının hücre canlılığını % 74'e düşürdüğü tespit edilmiştir (p: < 0.0001). MDA-MB-231 doğal tip hücrelerde sadece curcumin uygulaması hücre canlılığına % 81 ket vurarken, atiprimodla beraber curcumin uygulamasının hücre canlılığını % 65'e düşürdüğü tespit edilmiştir (p: 0,0005). Otokrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında sadece curcumin uygulaması % 74 iken, atiprimodla beraber curcumin uygulamasının hücre canlılığına % 62 ket vurduğu tespit edilmiştir (p: 0,0013). Atiprimod doğal tip meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığını ilaç uygulanmayan kontrol hücrelere kıyasla % 94 düşürdüğü tespit edilmişken (p: 0,1501), otokrin BH anlatımı yapan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde atiprimod uygulamasının ise % 90 hücre canlılığı tespit edilmiştir (p: 0,0042). MTT testlerine atiprimod uygulamasının hem doğal tip hem de otokrin BH anlatımı kazandırılmış olan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasının hücre canlılığı üzerine ket vurucu etkisini arttırdığı gösterilmiştir (Şekil 41, 42).

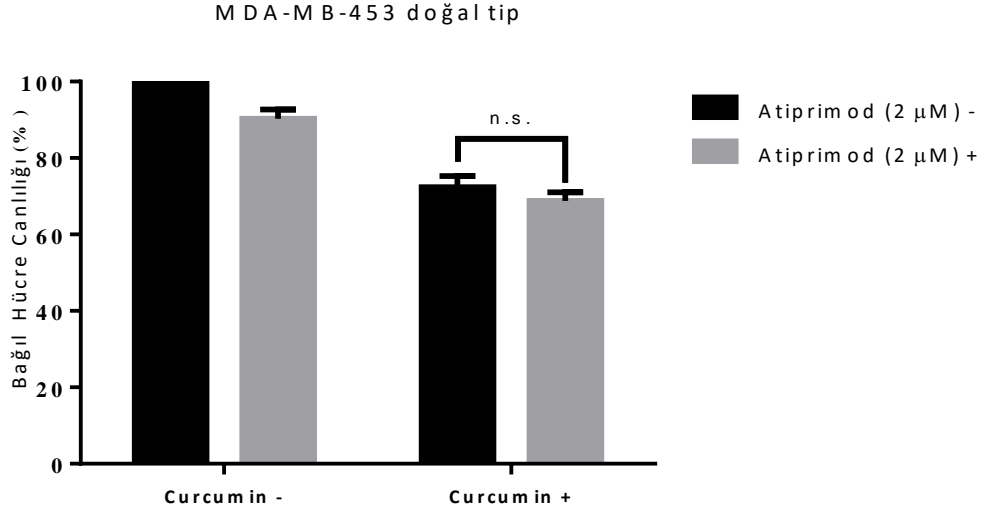


Şekil 41. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücre hattında curcumin ve atiprimodun hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, ***: p < 0,001)

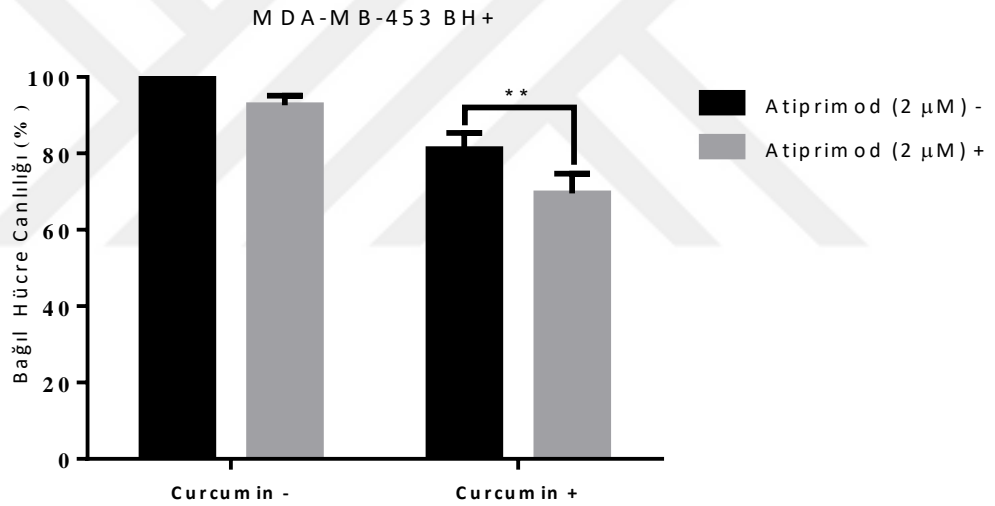


Şekil 42. MDA-MB-231 BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hattında curcumin ve atiprimodun hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, **: $p < 0,01$)

MDA-MB-453 doğal tip meme kanseri hücre hattında, 24 saat $20\mu\text{M}$ curcumin uygulamasının hücre canlılığına % 72 oranında ket vururken ($p: 0,0093$), BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında hücre canlılığı % 81'dir ($p: 0,0261$). MDA-MB-453 doğal tip hücrelerde sadece curcumin uygulaması hücre canlılığına % 72 ket vurarken, atiprimodla beraber curcumin uygulamasının hücre canlılığını % 68 düşürdüğü tespit edilmiştir ($p: 0,8601$). Ayrıca otokrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında sadece curcumin uygulaması % 81 iken, atiprimodla beraber curcumin uygulamasının hücre canlılığına % 69 ket vurduğu tespit edilmiştir ($p: 0,1674$). Otokrin BH sinyalinin kullandığı sinyal yolunu sekteye uğratan inhibitör olarak görev yapan atiprimod'un MDA-MB-453 doğal tip meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığını ilaç uygulanmayan kontrol hücrelere kıyasla % 90 düşürdüğü tespit edilmişken ($p: 0,3733$), otokrin BH anlatımı yapan MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde atiprimod uygulamasının ise % 92 hücre canlılığına ket vurduğu tespit edilmiştir ($p: 0,4410$) (Şekil 43, 44).



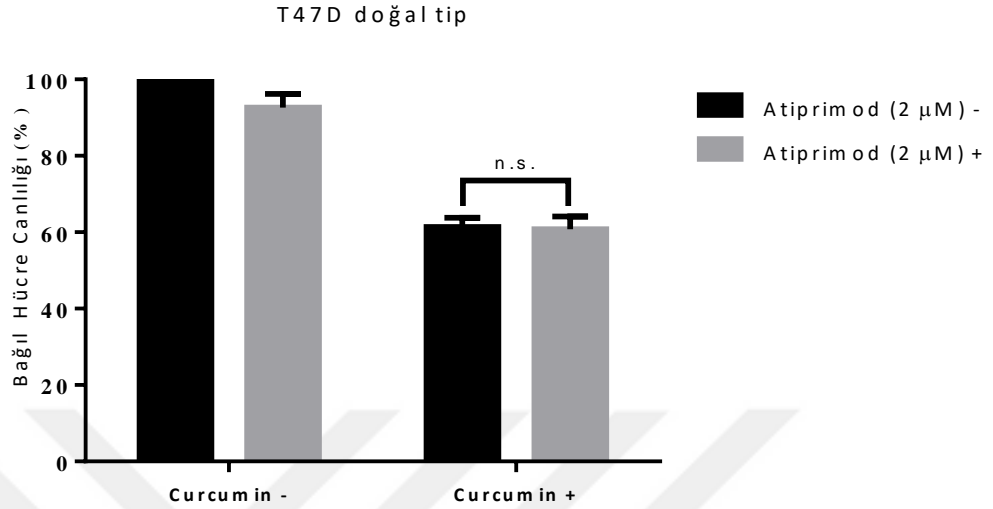
Şekil 43. MDA-MB-453 do ğ al tip meme kanseri hücre hattında curcumin ve atiprimodun hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant)



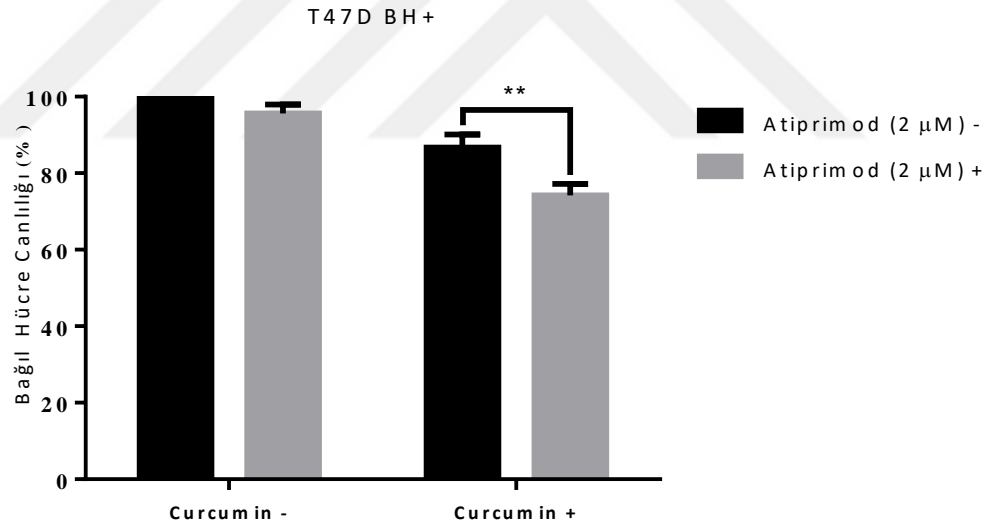
Şekil 44. MDA-MB-453 BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hattında curcumin ve atiprimodun hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, **: p < 0,01)

T47D do ğ al tip meme kanseri hücre hattında, 24 saat 20 µM curcumin uygulamasının hücre canlılığına % 61 oranında ket vurarken (p: < 0.0001), BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında hücre canlılığı % 86'dir (p: 0.0010). T47D do ğ al tip hücrelerde sadece 24 saat curcumin uygulaması % 61 iken, 1 saat atiprimod uygulamasıyla beraber curcumin uygulaması % 60 (p: 0,9882), otokrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında sadece curcumin uygulaması %86 iken, atiprimodla beraber curcumin uygulaması %74'dir (p: 0,0014). Atiprimod'un T47D do ğ al tip meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığını ilaç uygulanmayan

kontrol hücelere kıyasla % 92 düşürdüğü tespit edilmişken (p: 0,2317), otokrin BH anlatımı yapan T47D meme kanseri hücelerinde atiprimod uygulamasının ise % 95 hücre canlılığı tespit edilmiştir (p: 0,1915) (Şekil 45, 46).



Şekil 45. T47D doğal tip meme kanseri hücre hattında curcumin ve atiprimodun hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, n.s. non-significant)



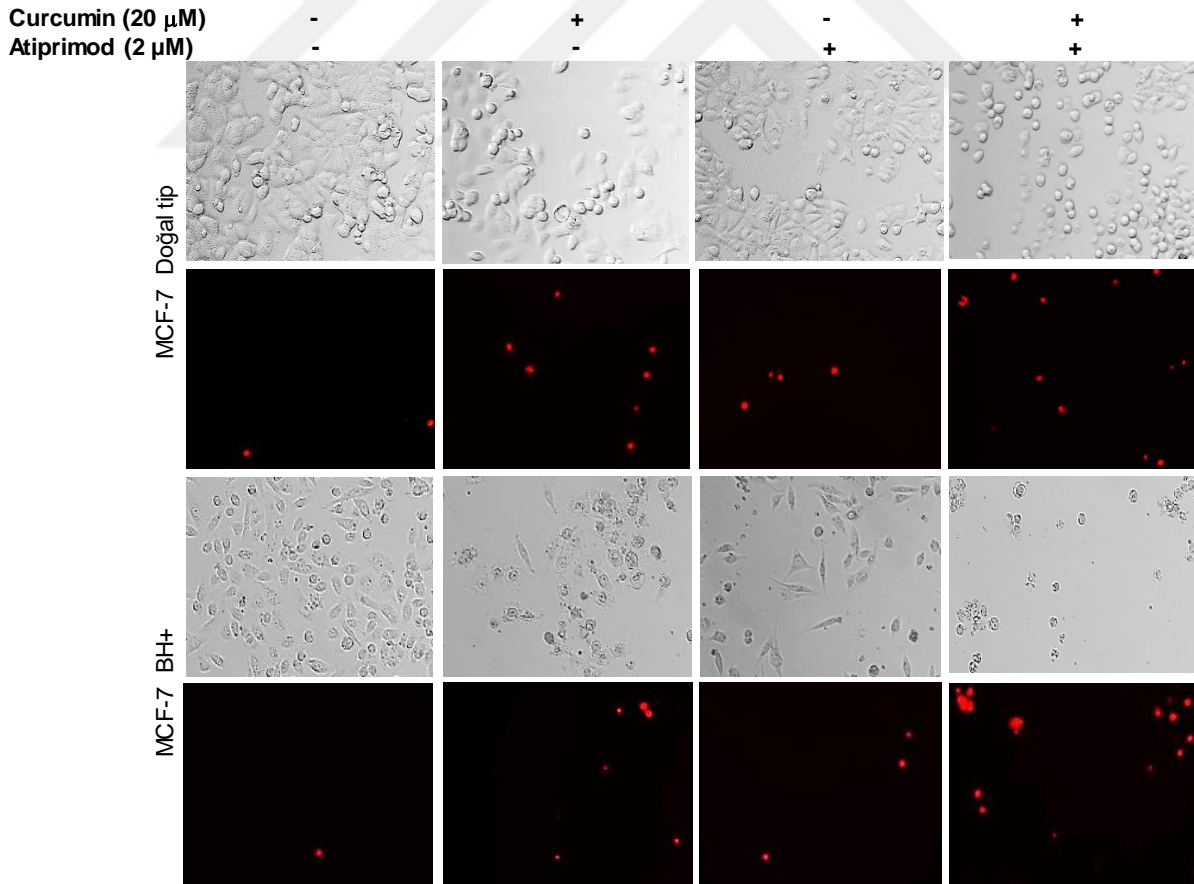
Şekil 46. T47D BH anlatımı artırılmış meme kanseri hücre hattında curcumin ve atiprimodun hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi (2 kez tekrar edilmiştir, **: p < 0,01)

4.5. Curcumin ve atiprimod'un MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve otokrin BH anlatımı artırılmış meme kanseri hücre hatlarında hücre ölümü üzerine etkisi

Curcumin ve atiprimod uygulamasının MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve otokrin BH anlatımı artırılmış meme kanseri hücre hatlarında hücre

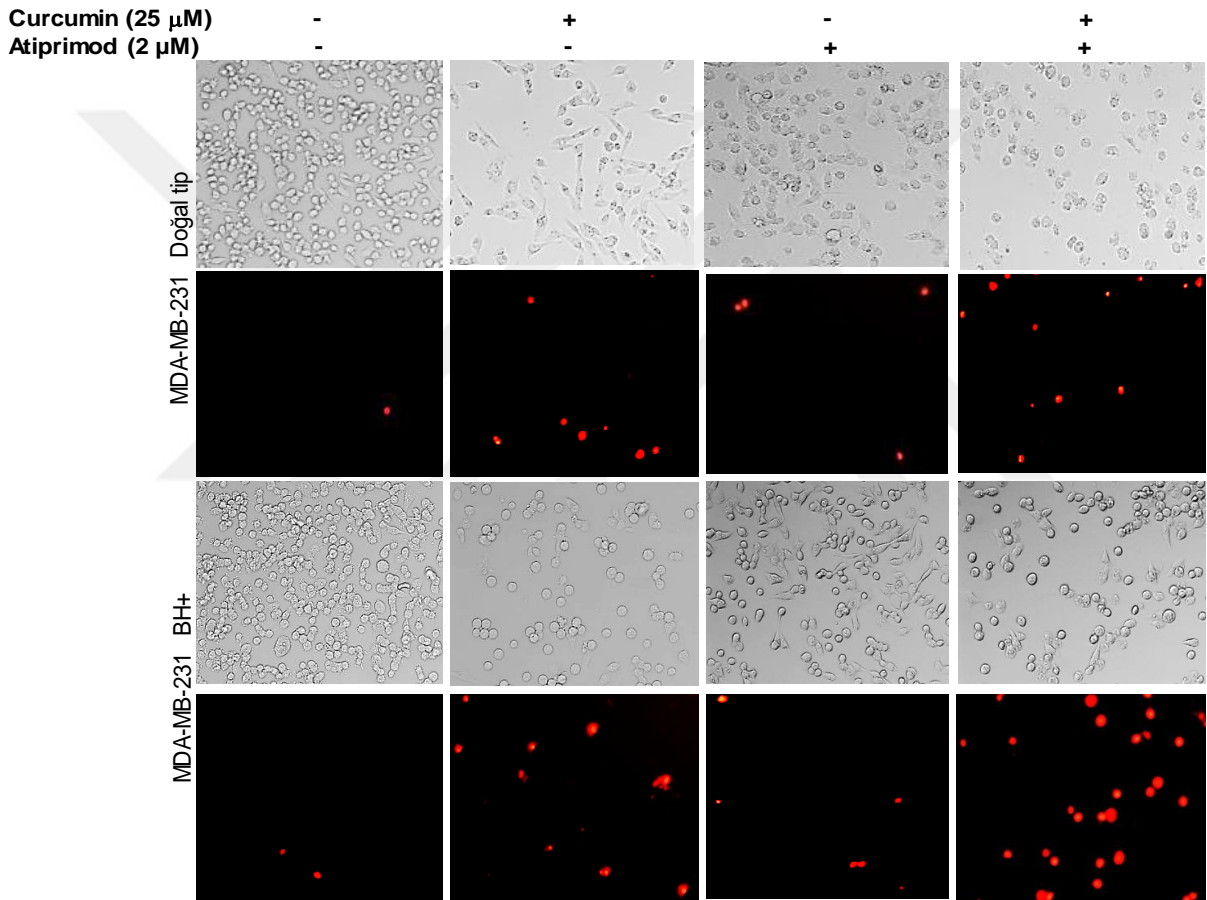
ölümü, mitokondriyal membran potansiyel değişikliği ve nükleer kondenzasyon üzerine etkisini gösterebilmek için PI, DiOC6, DAPI floresan boyamaları sırası ile gerçekleştirilmiştir.

PI floresan boyaması uygulanarak ölü hücreler boyanarak görünür kılınmıştır. PI boyaması ile; MCF-7 hücre hattında curcumin uygulamasıyla hücre ölümünün arttığı görülmektedir. MCF-7 doğal tip hücre hattında ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında yakın miktarda hücre ölümü olduğu tespit edilmektedir. Atiprimod uygulaması ile doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış hücre hatlarında yakın miktarda hücre ölümü olduğu görülmektedir. Doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış hücre hattında curcumin ve atiprimod beraber uygulandığında, sadece curcumin uygulandmasına kıyasla daha fazla hücre ölümünün olduğu görülmüştür. Curcumin ve atiprimod beraber uygulandığında; doğal tip hücre hattına oranla BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında daha fazla hücre ölümü olduğu PI boyaması ile MCF-7 hücrelerinde tespit edilmiştir (Şekil 47).



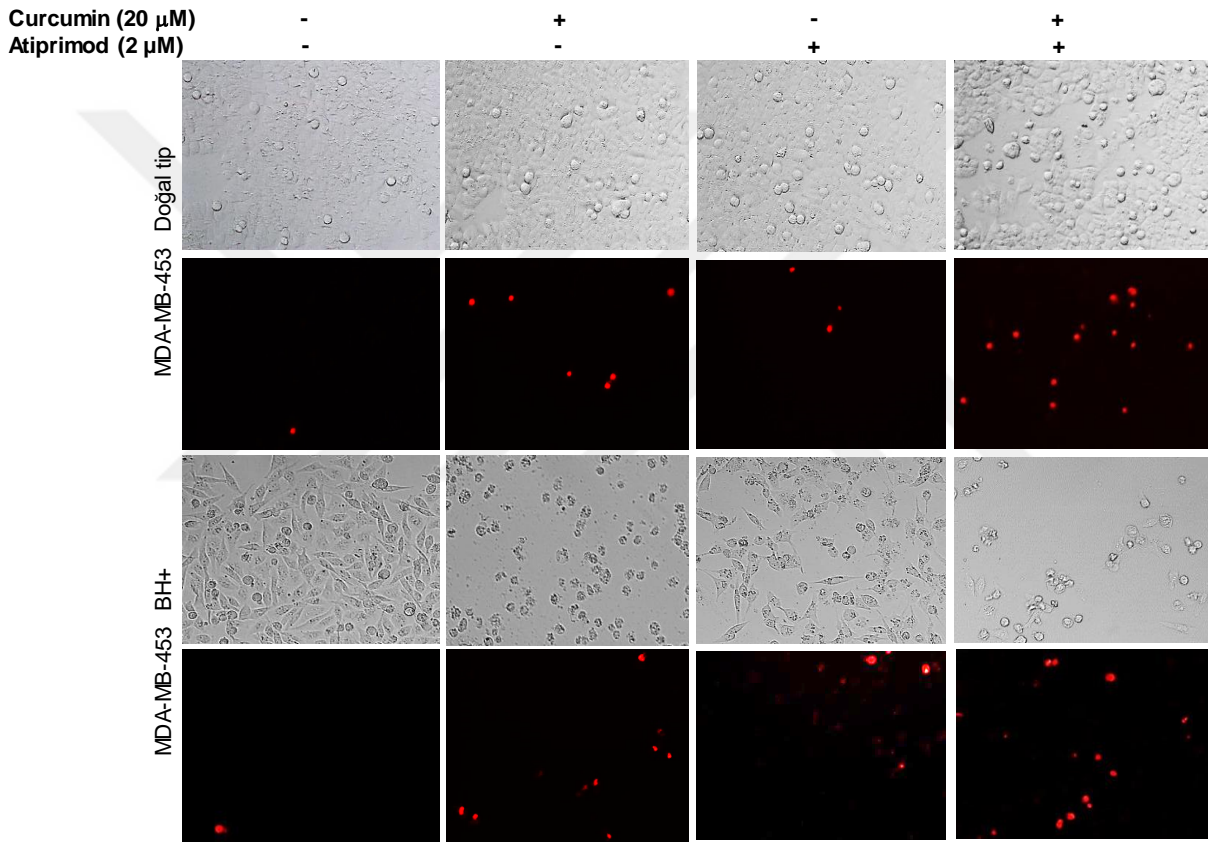
Şekil 47. MCF-7 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini PI boyaması ile floresan mikroskopunda gösterilmesi. Büyütme: 20X.

MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde curcumin uygulaması hücre ölümünü tetiklediği PI boyaması ile gösterilmiş, atiprimod ile beraber curcumin uygulamasında ise PI ile boyalı hücre sayısında artışın olduğu tespit edilmiştir. Otokrin BH anlatımı arttırılmış olan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde, curcuminin hücre ölümü üzerine etkisi atiprimod ile beraber uygulamasının sadece curcumin uygulamasına kıyasla belirgin olarak arttığı ve bu artışın doğal tip MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine kıyasla daha yüksek olduğu PI boyaması ile floresan mikroskobunda gösterilmiştir (Şekil 48).



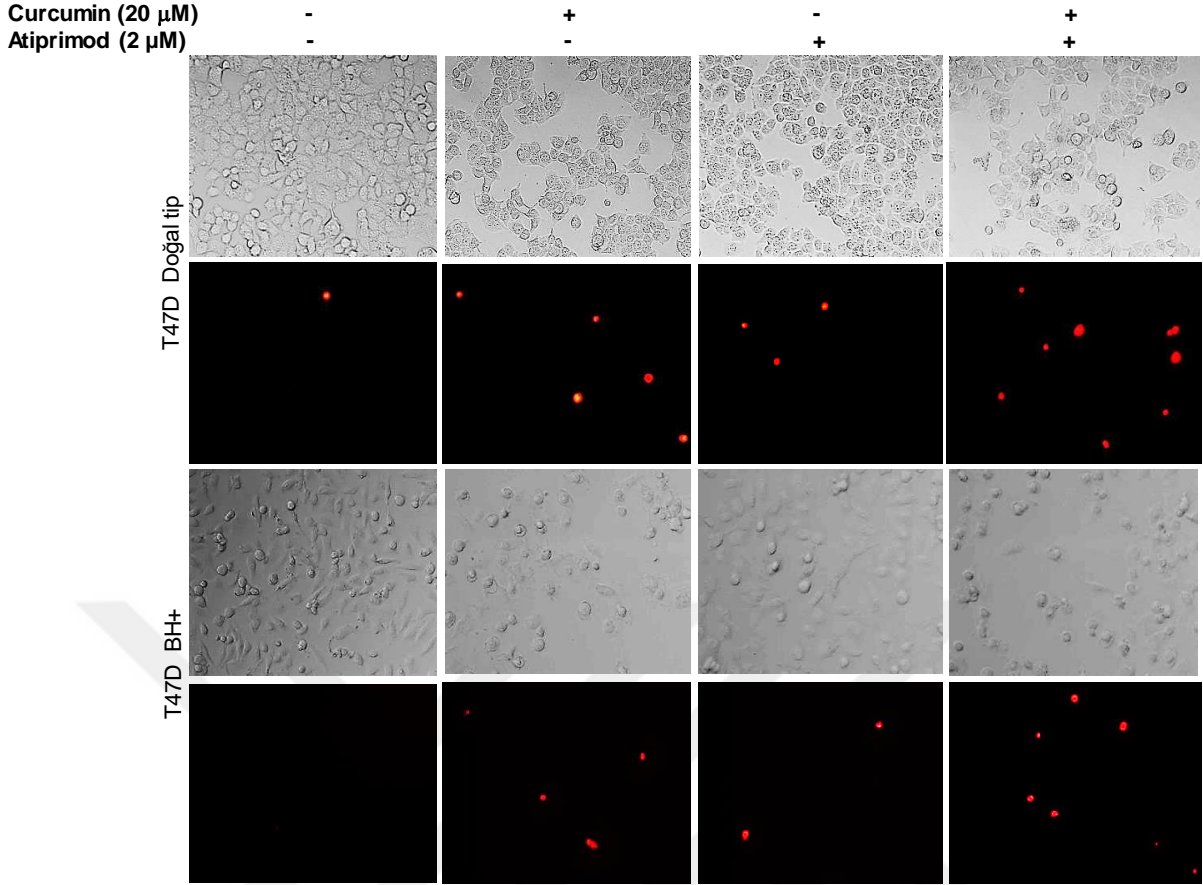
Şekil 48. MDA-MB-231 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini PI boyaması ile floresan mikroskobunda gösterilmesi. Büyütme: 20X.

Curcumin uygulamasının hem MDA-MB-453 doğal tip hem de otkrin BH anlatımı arttırılmış olan meme kanseri hücrelerinde hücre ölümü benzer şekilde etkisi PI boyaması ile görülmüş. Ayrıca atiprimod ile beraber curcumin uygulamasının hem doğal hem de otkrin BH anlatımı arttırılmış MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde sadece curcumine kıyasla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Atiprimod uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin hem doğal tip hem de otkrin BH anlatımı arttırılmış MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde curcumine kıyasla çok düşük oranda PI boyanan hücreye neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 49).



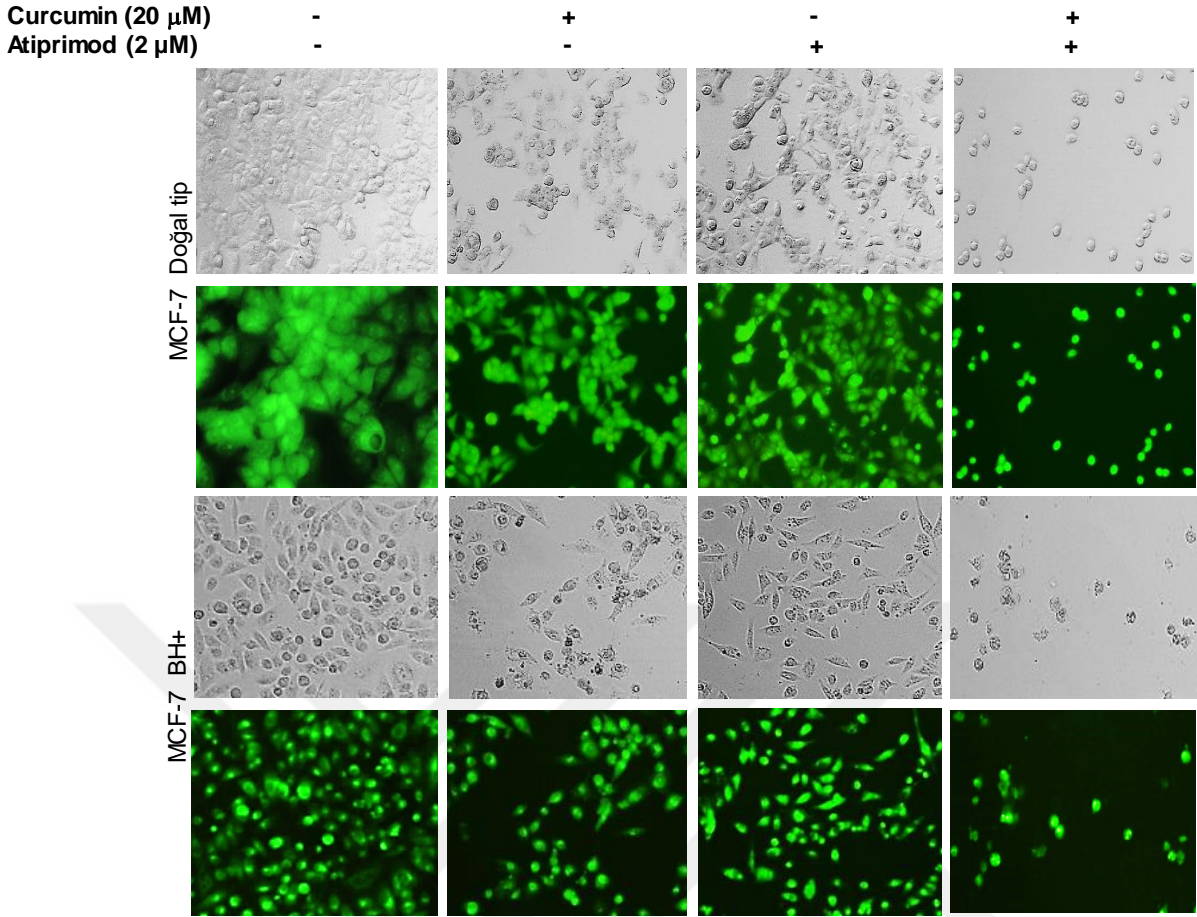
Şekil 49. MDA-MB-453 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini PI boyaması ile floresan mikroskopunda gösterilmesi. Büyütme: 20X.

Curcumin uygulamasının atiprimod ile beraber uygulamasının sadece curcumin uygulamasına kıyasla hücre ölümü T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde fazla olduğu tespit edilmiştir. Ancak atiprimod uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin otkrin BH anlatımı arttırılmış T47D meme kanseri hücrelerinde curcumin'e kıyasla çok düşük oranda PI boyanan hücreye neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 50).



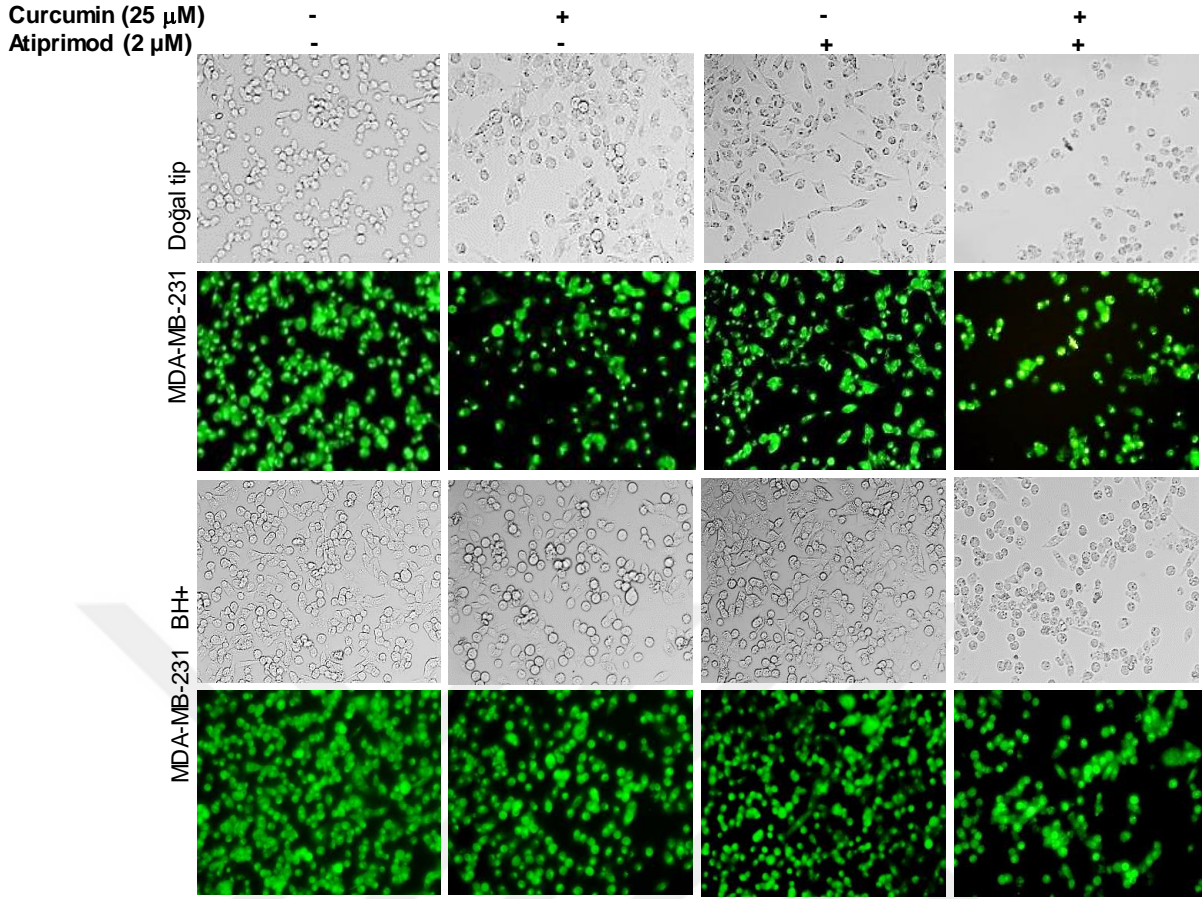
Şekil 50. T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini PI boyaması ile floresan mikroskobunda gösterilmesi. Büyütme: 20X.

DiOC6 floresan boyaması uygulanarak, hücrelerdeki $\Delta\psi_m$ (mitokondri membran potansiyeli) floresans mikroskobunda görünür kılınmıştır. DiOC6 boyaması ile; MCF-7 doğal tip ve otkrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasıyla $\Delta\psi_m$ potansiyelinin belirgin olarak düştüğü görülmektedir. Curcumin ile beraber atiprimod uygulamasının ise hem doğal tip hem de otkrin BH anlatımı arttırılmış MCF-7 meme kanseri hücrelerinde sadece curcumine kıyasla $\Delta\psi_m$ ciddi düşme tespit edilmiştir. Ayrıca sadece atiprimod uygulamasının hem doğal tip hem de otkrin BH hücrelerinde $\Delta\psi_m$ potansiyeli üzerinde herhangi bir farka neden olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 51).



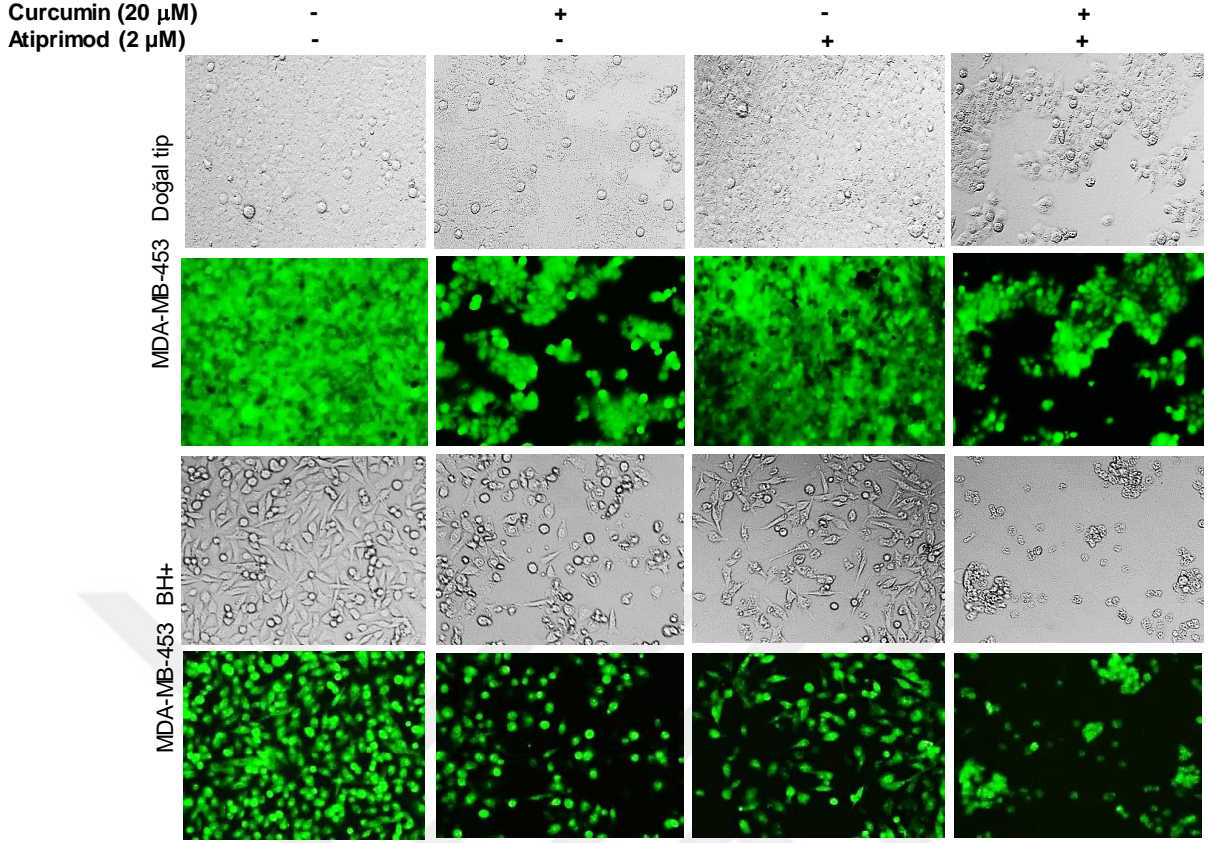
Şekil 51. MCF-7 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini DiOC6 boyaması ile floresan mikroskobunda gösterilmesi. Büyütme: 20X.

MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde $\Delta\psi_m$ (mitokondri membran potansiyeli) DiOC6 boyamasını takiben floresans mikroskobunda görünür kılınmıştır. DiOC6 boyaması ile; MDA-MB-231 doğal tip ve otkrin BH anlatımı arttırılmış meme kanser hücrelerinde curcumin uygulamasıyla $\Delta\psi_m$ potansiyelinin belirgin olarak düştüğü görülmektedir. Curcumin ile beraber atiprimod uygulamasının ise hem doğal tip hem de otkrin BH anlatımı arttırılmış MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde sadece curcumin'e kıyasla $\Delta\psi_m$ ciddi düşme tespit edilmiştir. Ayrıca sadece atiprimod uygulamasının hem doğal tip hem de otkrin BH hücrelerinde $\Delta\psi_m$ potansiyeli üzerinde herhangi bir farka neden olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 52).



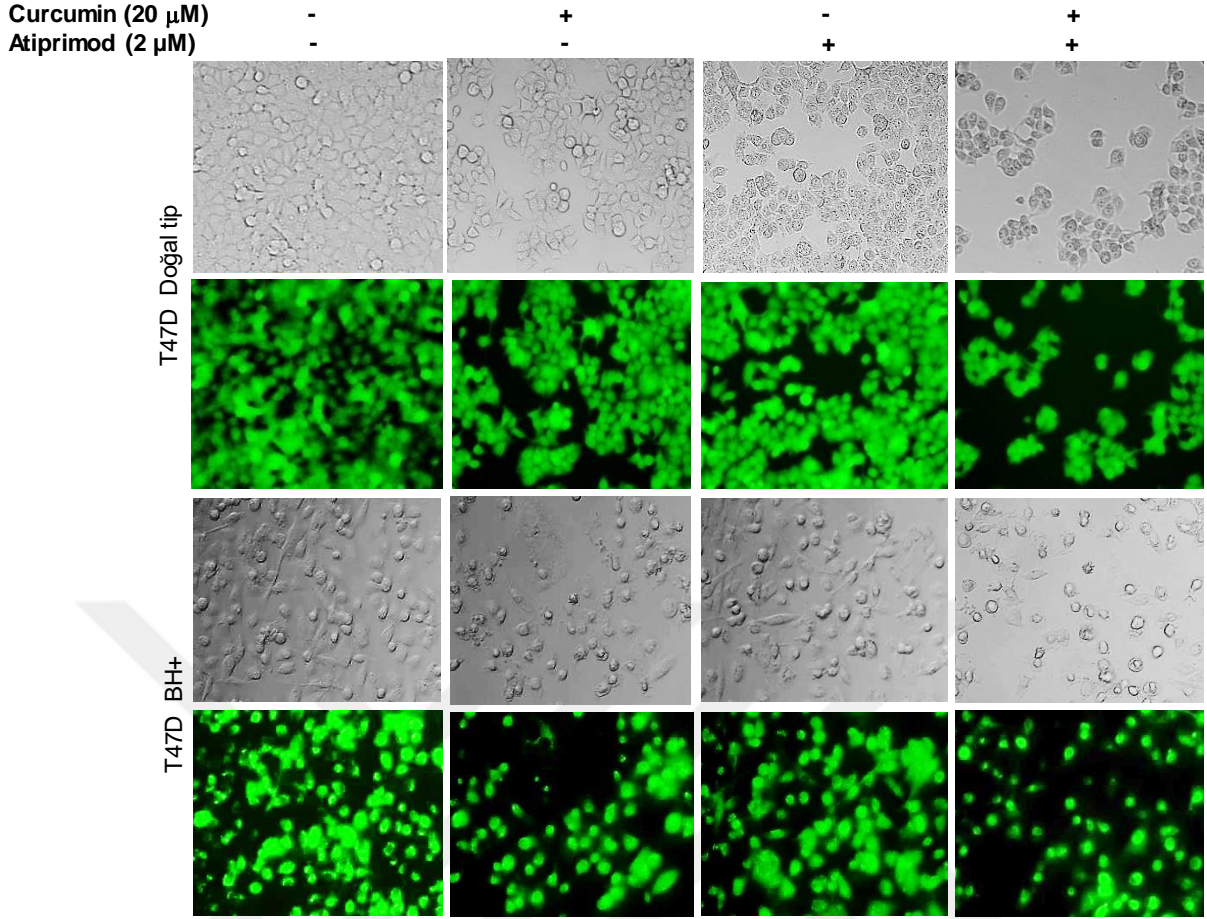
Şekil 52. MDA-MB-231 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini DiOC6 boyaması ile floresan mikroskopunda gösterilmesi. Büyütme: 20X.

MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde $\Delta\psi_m$ (mitokondri membran potansiyeli) doğal tip ve otkrin BH anlatımı arttırılmış meme kanser hücrelerinde curcumin uygulamasıyla belirgin olarak düştüğü görülmektedir. Curcumin ile beraber atiprimod uygulamasının ise hem doğal tip hem de otkrin BH anlatımı arttırılmış MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde sadece curcumin'e kıyasla $\Delta\psi_m$ ciddi düşme tespit edilmiştir (Şekil 53).



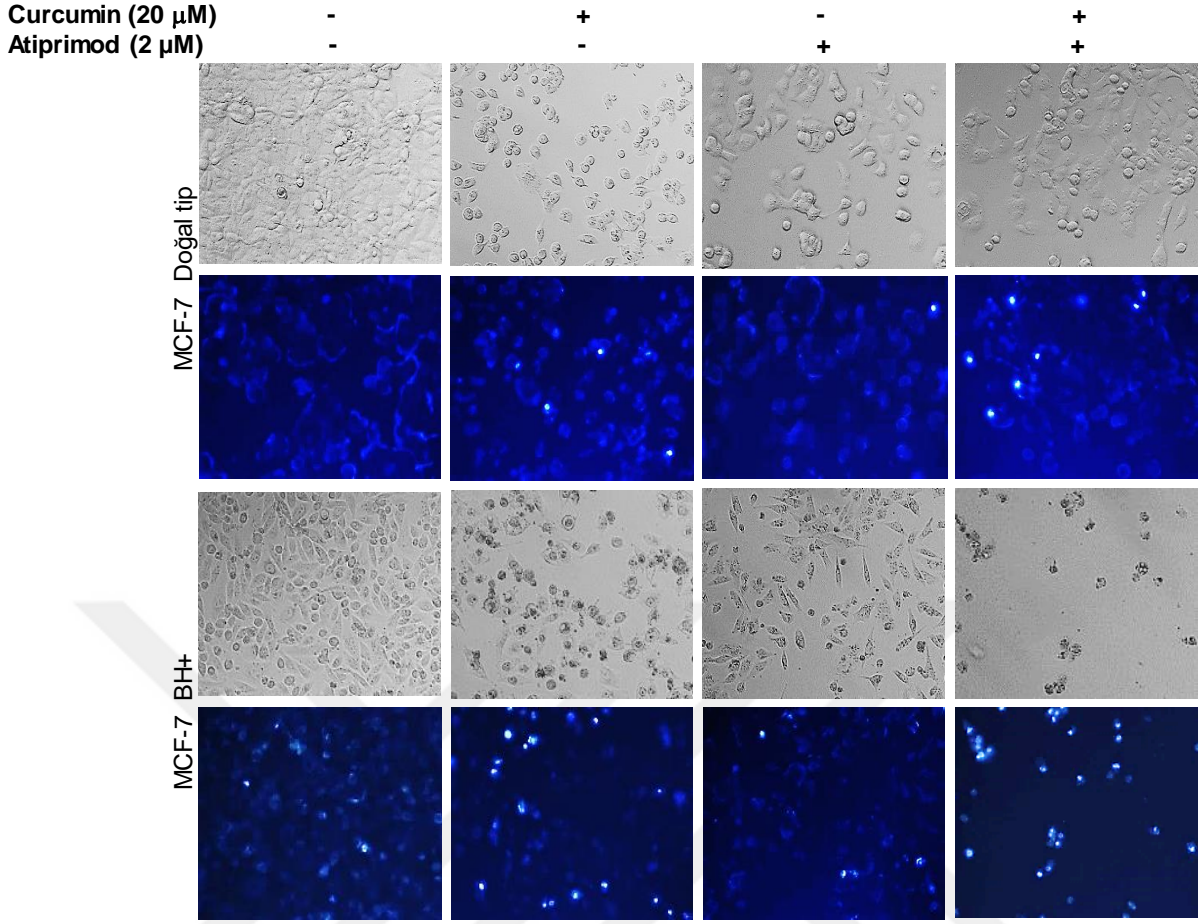
Şekil 53. MDA-MB-453 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini DiOC6 boyaması ile floresan mikroskopunda gösterilmesi. Büyütme: 20X.

T47D meme kanseri hücrelerinde curcumin ile beraber atiprimod uygulamasının ise doğal tip T47D hücrelerinde sadece curcumin uygulamasına kıyasla $\Delta\psi$ m azaldığı görülmüştür. Ancak atiprimod uygulamasının otokrin BH anlatımı arttırılmış T47D meme kanseri hücreleri üzerinde sadece curcumin uygulamasına ek olarak etkin bir $\Delta\psi$ m üzerinde farklılık belirlenmemiştir (Şekil 54).



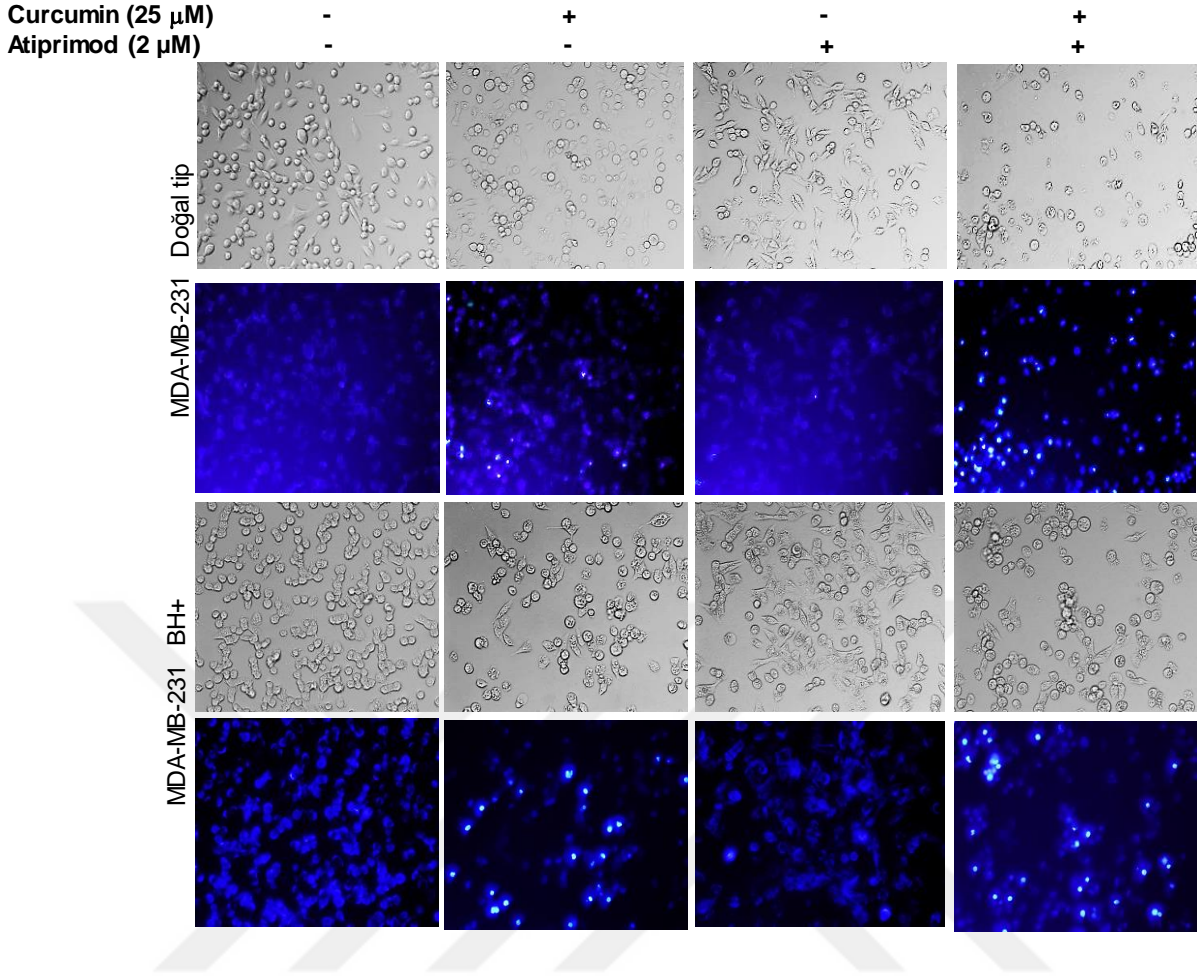
Şekil 54. T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini DiOC6 boyaması ile floresan mikroskopunda gösterilmesi. Büyütme: 20X.

DAPI floresan boyaması uygulanarak apoptotik ölüm ile nükleer kondenzasyon gerçekleştiren hücrelerin nükleusları parlak mavi olarak boyanarak görünür kılınmıştır. DAPI boyaması ile; MCF-7 hücre hattında curcumin uygulamasıyla hücre ölümünün arttığı görülmektedir. Atiprimod uygulaması ile beraber curcumin uygulamasının sadece curcumin uygulamasına kıyasla doğal tip ve otkrin BH anlatımı arttırılmış MCF-7 hücrelerinde DAPI boyaması ile apoptotik hücre ölümünün arttığı görülmektedir. Ayrıca sadece atiprimod uygulamasının hem doğal tip hem de BH anlatımı arttırılmış MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında atiprimod hücre ölümünü tetiklemediği DAPI boyaması ile gösterilmiştir (Şekil 55).



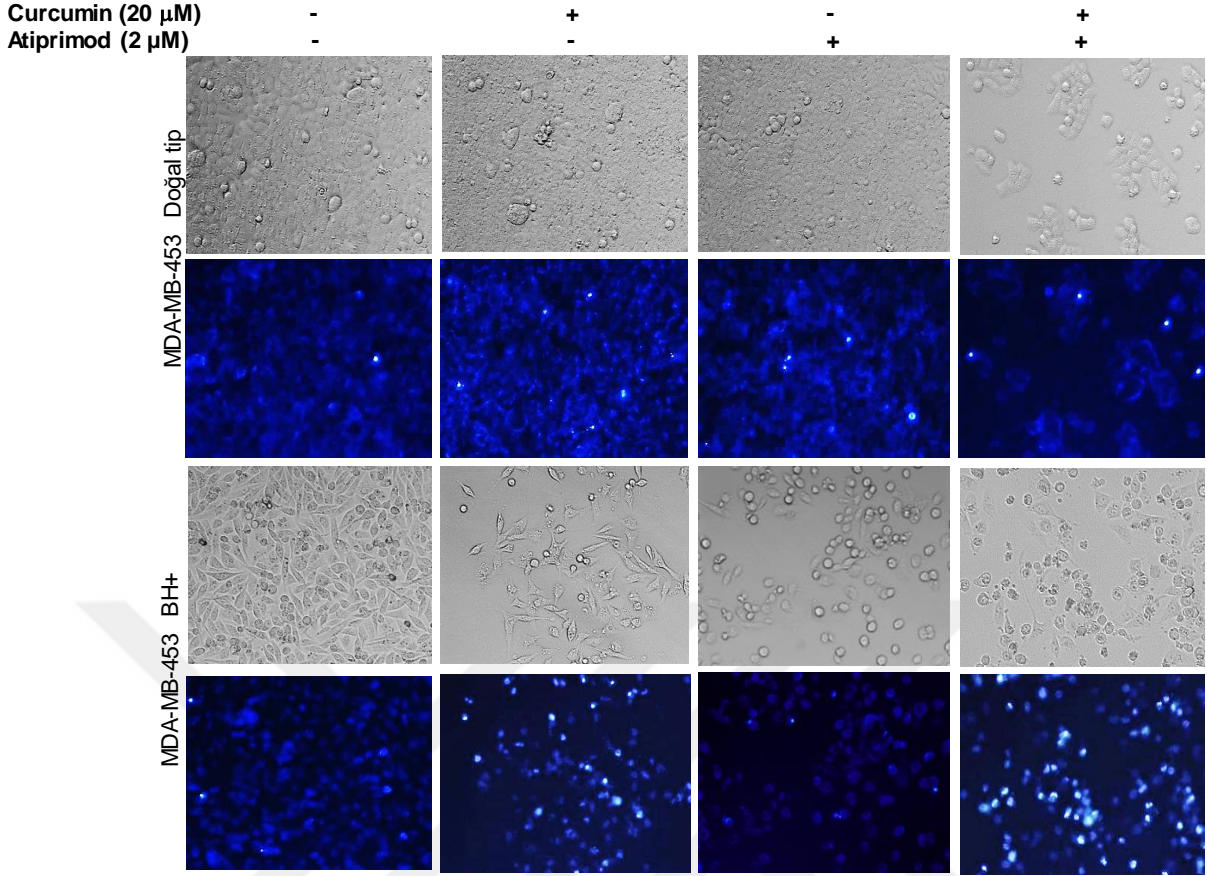
Şekil 55. MCF-7 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini DAPI boyaması ile floresan mikroskopunda gösterilmesi. Büyütme: 20X.

MDA-MB-231 hücre hattında curcumin uygulamasıyla birlikte hem doğal tip hem de otokrin BH anlatımı arttırılmış hücre hatlarında hücre ölümünün arttığı tespit edilmiştir. Otokrin BH anlatımı arttırılmış MDA-MB-231 hücrelerinde, doğal tip MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına kıyasla daha fazla apoptotik hücre ölümü olduğu görülmektedir. 2mM atiprimod uygulaması ile beraber 25 μ M curcumin uygulamasının sadece curcumin uygulamasına kıyasla otokrin BH anlatımı arttırılmış ve doğal tip hücre hatlarında apoptotik hücre ölümünün DAPI boyaması ile arttığı görülmektedir. Bununla birlikte; sadece atiprimod uygulamasının hem doğal tip hem de BH anlatımı arttırılmış MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında atiprimod hücre ölümünü tetiklemediği DAPI boyaması ile gösterilmiştir (Şekil 56).



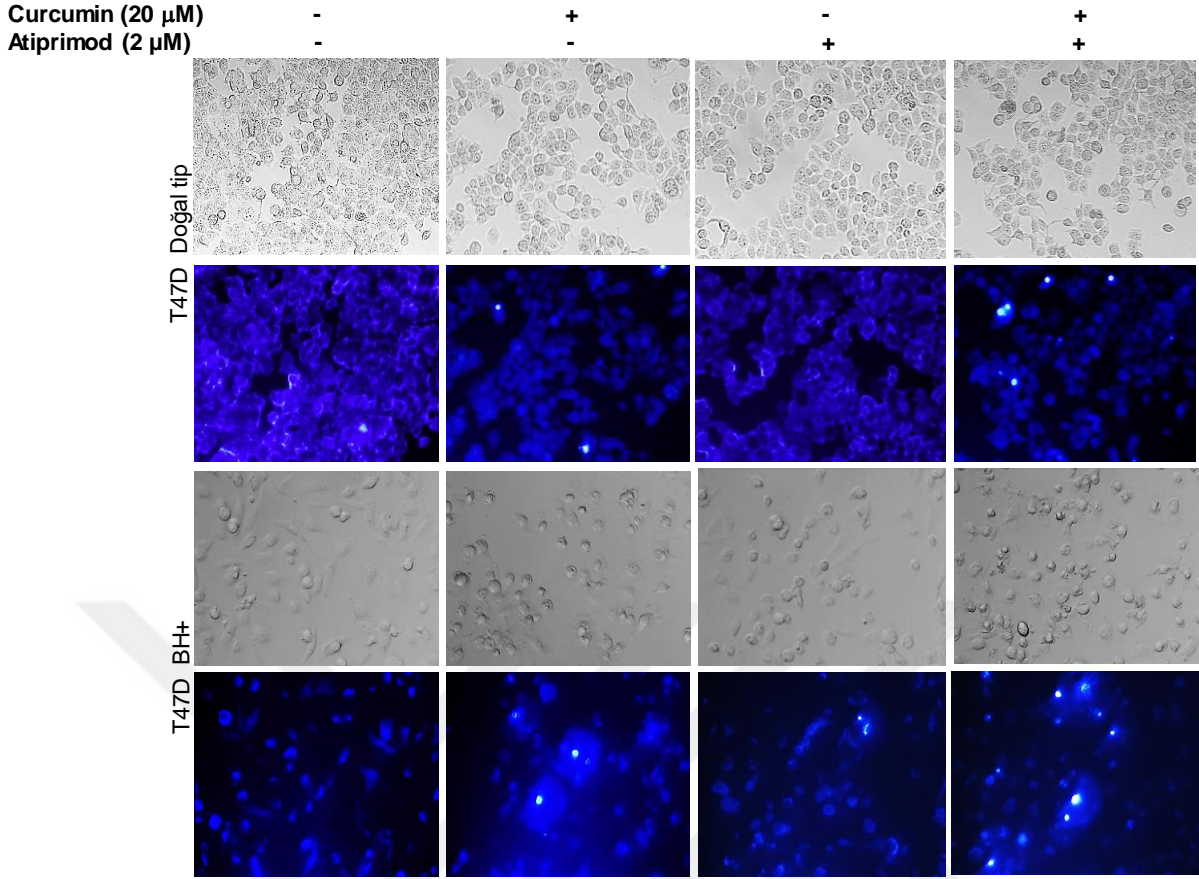
Şekil 56. MDA-MB-231 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini DAPI boyaması ile floresan mikroskopunda gösterilmesi. Büyütme: 20X.

DAPI boyaması ile; MDA-MB-453 hücre hattında curcumin uygulamasıyla hücre ölümünün arttığı görülmektedir. Otokrin BH anlatımı arttırılmış MDA-MB-453 meme kanseri hücre hatında, doğal tip MDA-MB-453 hücrelerine oranla daha fazla bir apoptotik hücre ölümü DAPI boyaması ile görünmektedir. Atiprimod uygulaması ile beraber curcumin uygulamasının sadece curcumin uygulamasına kıyasla doğal tip MDA-MB-453 hücrelerinde belirgin apoptotik hücre ölümü artışı görülmezken, otokrin BH anlatımı arttırılmış MDA-MB-453 meme kanseri hücre hatlarında belirgin apoptotik hücre ölümünün arttığı görülmektedir. Ayrıca sadece atiprimod uygulamasının BH anlatımı arttırılmış MDA-MB-453 meme kanseri hücre hatlarında etki göstermezken, doğal tip MDA-MB-453 meme kanseri hücre hatlarında atiprimod hücre ölümünü tetiklediği DAPI boyaması ile gösterilmiştir (Şekil 57).



Şekil 57. MDA-MB-453 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini DAPI boyaması ile floresan mikroskobunda gösterilmesi. Büyütme: 20X.

T47D hücre hattında curcumin uygulamasıyla hem doğal tip hatlarında hem de otokrin BH anlatımı arttırılmış hücre hatlarında hücre ölümünün arttığı görülmektedir. Doğal tip ve otokrin BH anlatımı arttırılmış T47D meme kanseri hücre hatlarında eşit oranda hücre ölümü DAPI boyası ile görülmektedir. Atiprimod uygulaması ile beraber curcumin uygulamasının sadece curcumin uygulamasına kıyasla hem doğal tip hem de otokrin BH anlatımı arttırılmış T47D meme kanseri hücre hatlarında apoptotik artış DAPI boyaması ile görülmektedir. Ayrıca sadece atiprimod uygulamasının hem doğal tip hem de BH anlatımı arttırılmış T47D meme kanseri hücre hatlarında atiprimod hücre ölümünü tetiklemediği DAPI boyaması ile gösterilmiştir (Şekil 58).



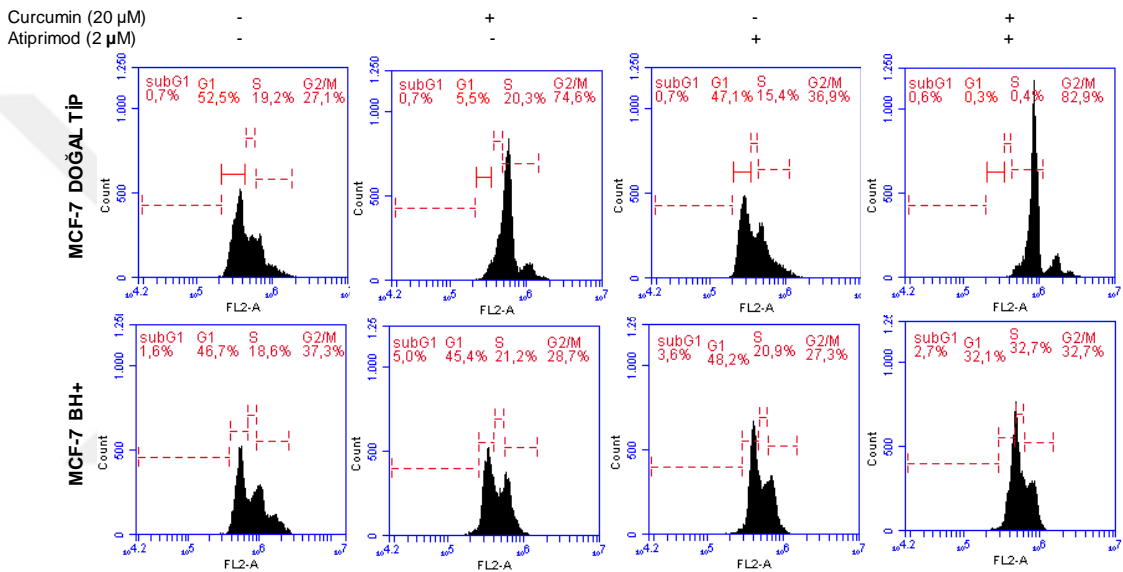
Şekil 58. T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde atiprimodun curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini DAPI boyaması ile floresan mikroskopunda gösterilmesi. Büyütme: 20X.

4.6. Curcumin ve atiprimod'un MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında hücre döngüsü üzerine etkisi

MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un hücre döngüsü üzerine etkisinin gösterilmesi için PI boyaması yapılarak hücre akış sitometresi tekniği kullanılarak gösterilmiştir.

MCF-7 doğal tip meme kanseri hücre hattında kontrol hücrelerde G1 % 52,5 iken curcumin uygulanmış hücrelerde % 5,5, MCF-7 BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında G1 hücre popülasyonu % 46,7 iken curcumin uygulanmış hücrelerde % 45,4 azaldığı PI FACS hücre akış sitometresi analizi ile gösterilmiştir. Ayrıca MCF-7 doğal tip meme kanseri hücre hattında curcumin atiprimodla beraber uygulandığında G1 hücre popülasyonununun % 0,3, BH anlatımı kazandırılmış MCF7 hücrelerinde ise % 32,1 olduğu belirlenmiştir. Curcumin uygulaması; MCF-7 doğal tip meme kanseri hücre hatlarında S fazındaki hücre popülasyonunu ilaç

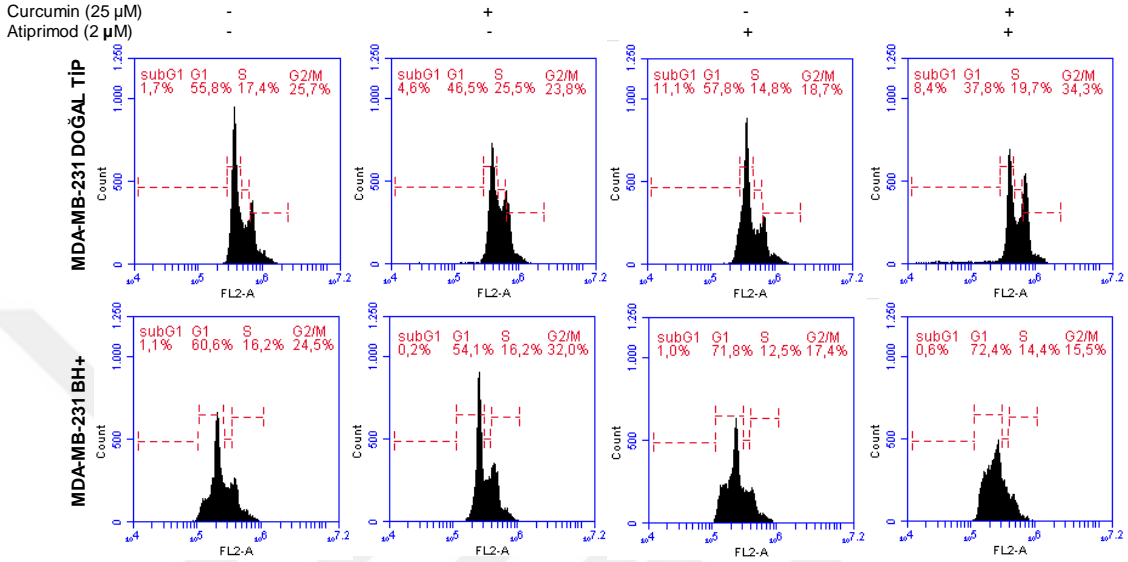
uygulanmamış kontrol hücelere kıyasla % 19,2'den % 20,3'e, BH anlatımı kazandırılmış MCF7 hücelerinde ise % 18,6'dan % 21,2'ye arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca G2/M popülasyonu incelendiğinde hücre popülasyonunun % 27,1'den curcumin uygulaması ile % 74,6'ya döndüğü MCF-7 doğal tip hücelerde; MCF-7 BH anlatımı artırılmış meme kanseri hücre hatlarında ise % 37,3'den curcumin uygulaması ile % 28,7 olduğu belirlenmiştir. Tüm bunlara ilaveten MCF-7 doğal tip meme kanseri hücre hattında curcumin atiprimodla beraber uygulandığında G2/M hücre popülasyonunun % 82,9, MCF-7 BH+ ise % 32,7 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 59).



Şekil 59. MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimodun apoptotik hücre döngüsü üzerine etkisinin PI FACS hücre akış sitometresi analizi yöntemi ile gösterilmesi

MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücre hattında kontrol hücelerde G1 % 55,8 iken curcumin uygulanmış hücelerde % 46,5; MDA-MB-231 BH anlatımı artırılmış meme kanseri hücre hatlarında G1 % 60,6 iken curcumin uygulanmış hücelerde % 54,1 azaldığı PI FACS hücre akış sitometresi analizi ile gösterilmiştir. Ayrıca G1 fazında MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücre hattında curcumin atiprimodla beraber uygulandığında % 37,8; BH anlatımı artırılmış meme kanseri hücre hatlarında % 72,4 olarak belirlenmiştir. S fazında curcumin uygulamasıyla; doğal tip hücre hatlarında kontrol hücelere kıyasla % 17,4'den % 25,5'e artarken, BH anlatımı artırılmış hücelerde popülasyonun % 16,2 olarak değişmediği tespit edilmiştir. Bununla birlikte G2/M popülasyonu incelendiğinde MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücre hattında kontrol hücelerde % 25,7 iken curcumin

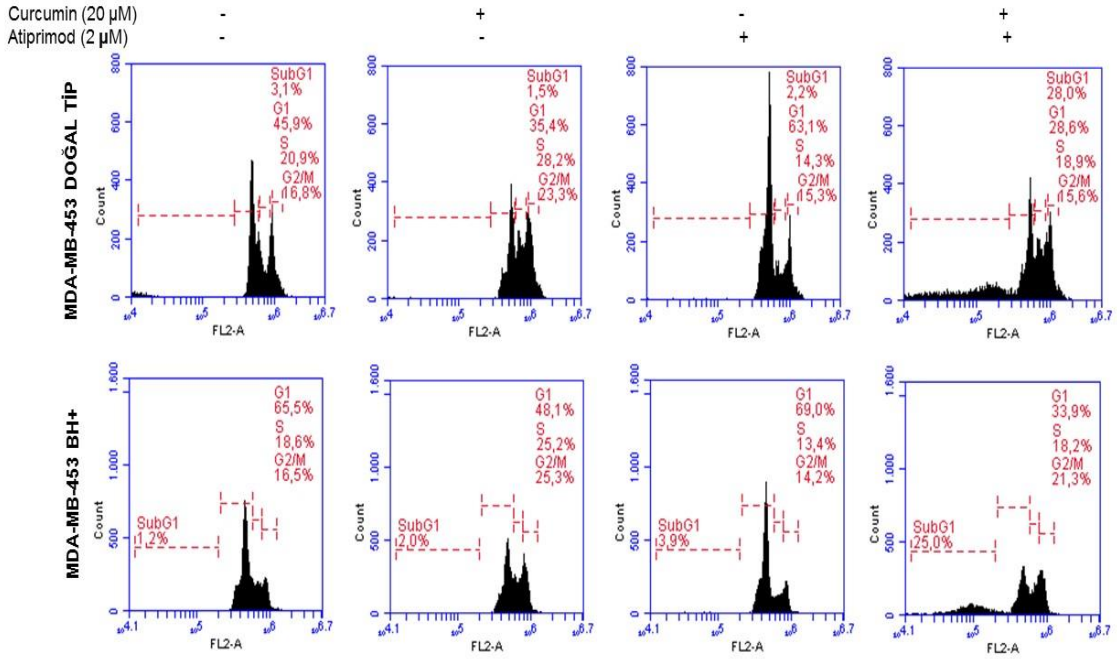
uygulamasıyla % 23,8 azalırken, MDA-MB-231 BH anlatımı arttırılmış hücre hatlarında % 24,5 iken curcumin uygulamasıyla % 32 olarak artmıştır. Ayrıca MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücre hattında curcumin atiprimodla beraber uygulandığında G2/M hücre popülasyonunun % 34,3, BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında ise % 15,5 olarak tespit edilmiştir (Şekil 60).



Şekil 60. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik hücre döngüsü üzerine etkisinin PI FACS hücre akış sitometresi analizi yöntemi ile gösterilmesi

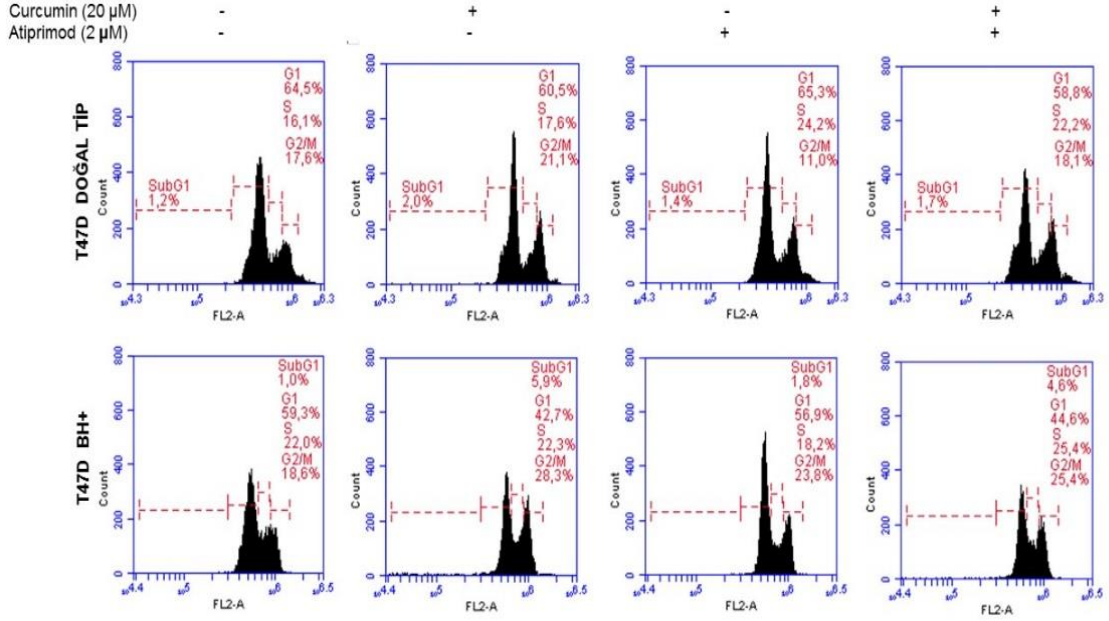
MDA-MB-453 doğal tip meme kanseri hücre hattında kontrol hücrelerde G1 % 45,9 iken curcumin uygulamasıyla % 35,4, MDA-MB-453 BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında G1 % 65,5 iken curcumin uygulamasıyla % 48,1 olarak azaldığı PI FACS hücre akış sitometresi analizi ile gösterilmiştir. MDA-MB-453 doğal tip meme kanseri hücre hattında curcumin atiprimodla beraber uygulandığında G1 hücre popülasyonunun % 28,6, BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında ise % 33,9 olarak belirlenmiştir. S fazında; doğal tip meme kanseri hücre hatlarında curcumin uygulanmış hücrelerde kontrole oranla popülasyonun % 20,9'dan % 28,2'ye, BH anlatımı arttırılmış hücre hatlarında ise % 18,6'dan % 25,2'ye arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca MDA-MB-453 doğal tip meme kanseri hücre hattında kontrol hücrelerde G2/M popülasyonu % 16,8 iken curcumin uygulamasıyla % 23,3 olarak; BH anlatımı arttırılmış hücre hatlarında ise % 16,5 iken curcumin uygulamasıyla % 25,3 olarak arttığı belirlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak; MDA-MB-453 doğal tip meme kanseri hücre hattında curcumin atiprimodla beraber uygulandığında G2/M

popülasyonun % 15,6, BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında ise % 21,3 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 61).



Şekil 61. MDA-MB-453 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik hücre döngüsü üzerine etkisinin PI FACS hücre akış sitometresi analizi yöntemi ile gösterilmesi

T47D doğal tip meme kanseri hücre hattında kontrol hücrelerde G1 popülasyonu % 64,5 iken curcumin uygulanmış hücrelerde %60,5, T47D BH anlatımı arttırılmış hücre hatlarında % 59,3 iken curcumin uygulanmış hücrelerde % 42,7 olarak azaldığı PI FACS hücre akış sitometresi analizi ile gösterilmiştir. Bunun yanısıra T47D doğal tip meme kanseri hücre hattında curcumin atiprimodla beraber uygulandığında G1 popülasyonu % 58,8; T47D BH anlatımı arttırılmış hücre hatlarında ise % 44,6 olduğu belirlenmiştir. S fazında; T47D doğal tip meme kanseri hücre hatlarında ilaç uygulanmamış kontrol hücrelere kıyasla curcumin uygulanmış hücrelerde popülasyonun % 16,1'den % 17,6'ya, BH anlatımı arttırılmış hücrelerde ise % 22'den % 22,3'e arttığı tespit edilmiştir. Tüm bunlara ilaveten T47D doğal tip meme kanseri hücre hattında kontrol hücrelerde G2/M popülasyonu % 17,6 iken curcumin uygulamasıyla % 21,1, T47D BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında ise % 18,6 iken curcumin uygulamasıyla % 28,3 olarak arttığı belirlenmiştir. Ayrıca T47D doğal tip meme kanseri hücre hattında curcumin atiprimodla beraber uygulandığında G2/M hücre popülasyonunun % 18,1; T47D BH anlatımı arttırılmış hücre hatlarında ise % 25,4 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 62).



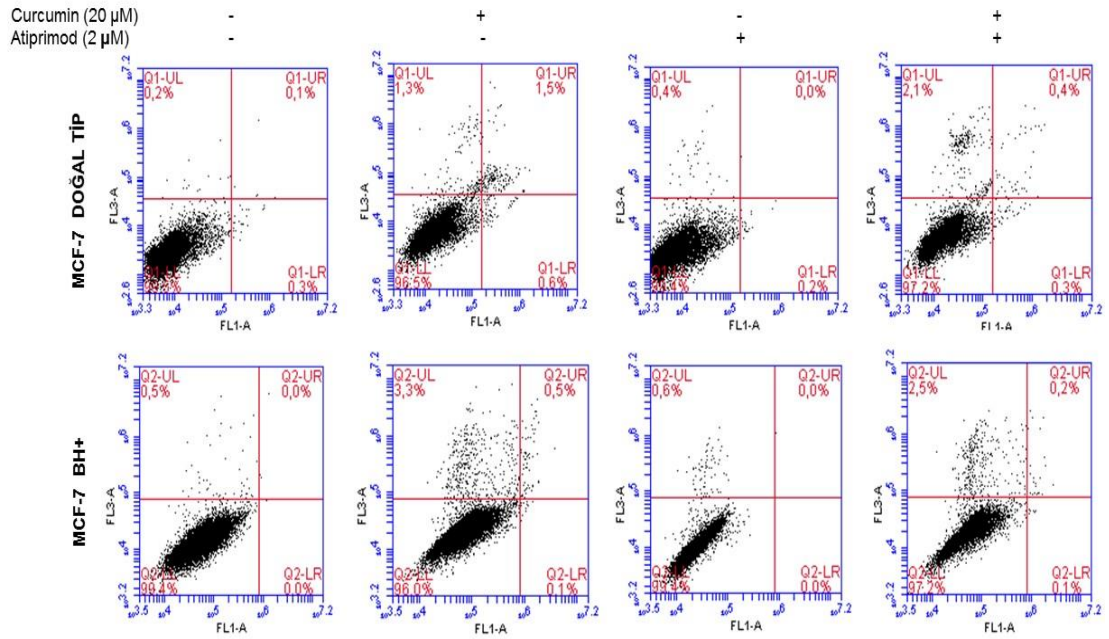
Şekil 62. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik hücre döngüsü üzerine etkisinin PI FACS hücre akış sitometresi analizi yöntemi ile gösterilmesi

4.7. Curcumin ve atiprimod'un MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında apoptotik hücre ölümü üzerine etkisi

MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin gösterilmesi için Annexin V-Propidyum İyodür (Annexin V-PI) boyaması yapılarak hücre akış sitometresi kullanılarak hücre popülasyonları gösterilmiştir. Normal koşullarda hücre içi membranda bulunan fosfotidilserinin apoptotik süreçte hücrenin dış membranına geçişi söz konusu olması nedeni ile ancak apoptotik ölüme giden hücreler Annexin V boyası ile fosfotidilserinleri üzerinden bağlanmaktadır. PI boyası ise ölü hücrelerde sitoplazmik membran bütünlüğünün bozulması ile hücre içerisine girebilmekte ve DNA'ya bağlanmaktadır. Böylelikle MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un erken, geç apoptotik ve nekrotik ölüm üzerine etkisi gösterilmiştir.

MCF-7 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcumin apoptotik hücre ölümünü tetiklemektedir. MCF-7 doğal tip meme kanserinde curcumin uygulanması apoptotik hücre ölümünü % 2,1 [erken apoptotik ölüm (% 0,6), geç apoptotik hücre ölümü (% 1,5)] olarak uyardığı tespit edilmiştir.

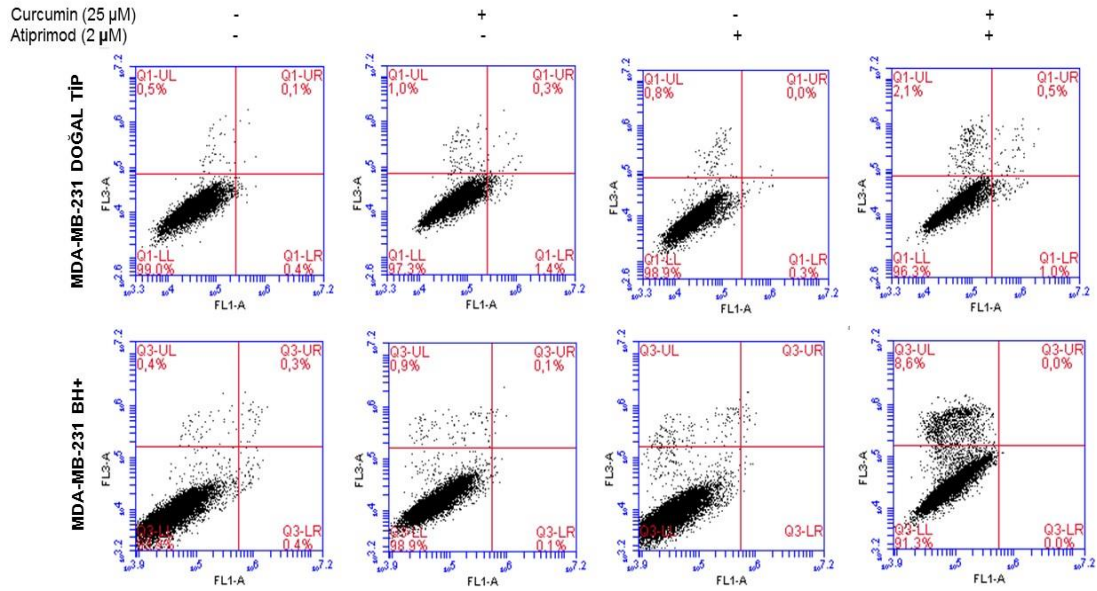
Otokrin BH anlatımı kazandırılmış MCF-7 hücrelerinde curcumin uygulanması apoptotik hücre ölümünü % 0,6 [erken apoptotik ölüm (% 0,1), geç apoptotik hücre ölümü (% 0,5)] olarak uyardığı tespit edilmiştir. MCF-7 doğal tip meme kanseri hücre hattında sadece curcumin uygulamasının hücre ölümünü % 3,4; atiprimodla beraber curcumin uygulaması hücre ölümünü % 2,8 olduğu tespit edilmiştir. MCF-7 BH+ meme kanseri hücre hattında sadece curcumin uygulamasının hücre ölümünü % 3,9; atiprimodla beraber curcumin uygulaması hücre ölümünü % 2,8 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 63).



Şekil 63. MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin V-PI boyama yöntemi ile gösterilmesi

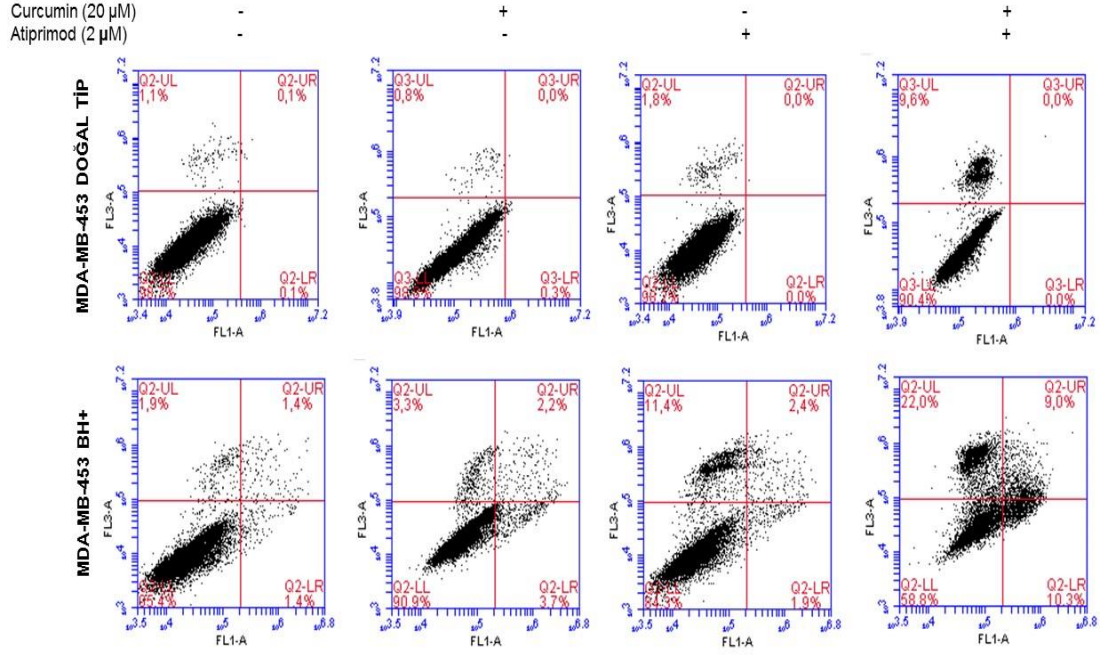
MDA-MB-231 doğal tip ve BH anlatımı artırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcumin apoptotik hücre ölümünü tetiklemektedir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanserinde curcumin uygulanması apoptotik hücre ölümünü % 1,7 [erken apoptotik ölüm (% 1,4), geç apoptotik hücre ölümü (% 0,3)] olarak uyardığı tespit edilmiştir. Otokrin BH anlatımı kazandırılmış MDA-MB-231 hücrelerinde curcumin uygulanması apoptotik hücre ölümünü % 0,2 [erken apoptotik ölüm (% 0,1), geç apoptotik hücre ölümü (% 0,1)] olarak uyardığı tespit edilmiştir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücre hattında sadece curcumin uygulamasının hücre ölümünü % 2,7; atiprimodla beraber curcumin uygulaması hücre ölümünü % 3,6 olduğu tespit edilmiştir. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücre hattında sadece curcumin

uygulamasının hücre ölümünü % 1,1; atiprimodla beraber curcumin uygulaması hücre ölümünü % 8,6 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 64).



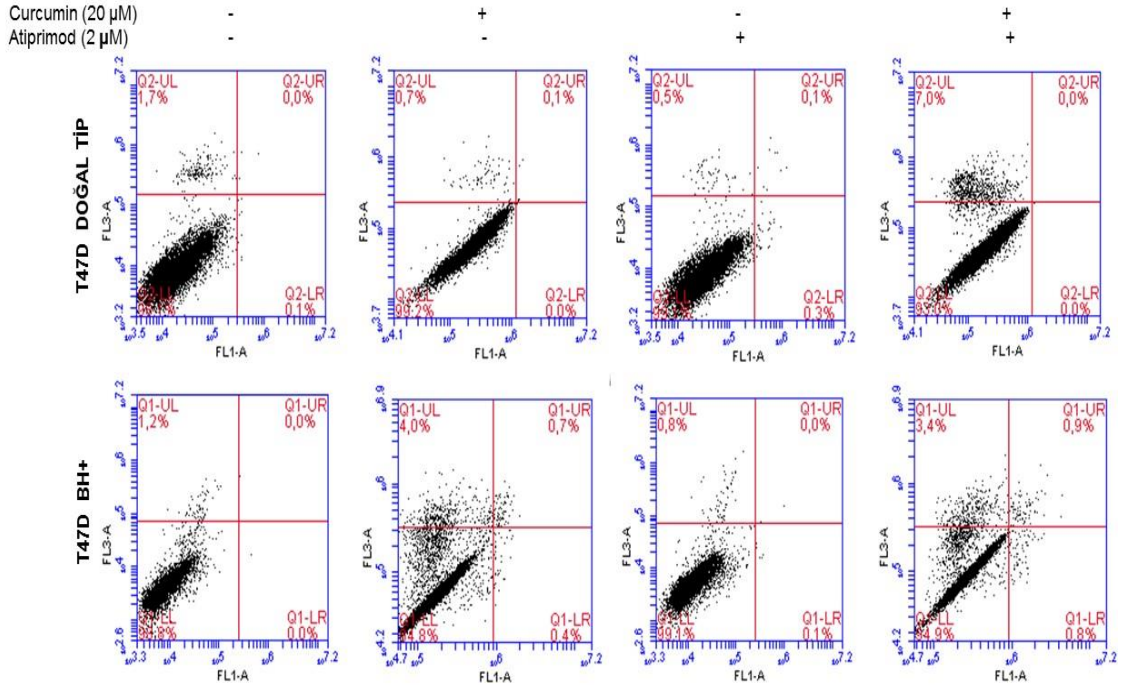
Şekil 64. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimodun apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin V-PI boyama yöntemi ile gösterilmesi

MDA-MB-453 doğal tip ve BH anlatımı artırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcumin apoptotik hücre ölümünü tetiklemektedir. MDA-MB-453 doğal tip meme kanserinde curcumin uygulanması apoptotik hücre ölümünü % 0,3 [erken apoptotik ölüm] olarak uyardığı tespit edilmiştir. Otokrin BH anlatımı kazandırılmış MDA-MB-453 hücrelerinde curcumin uygulanması apoptotik hücre ölümünü % 5,9 [erken apoptotik ölüm (% 3,7), geç apoptotik hücre ölümü (% 2,2)] olarak uyardığı tespit edilmiştir. MDA-MB-453 doğal tip meme kanseri hücre hattında sadece curcumin uygulamasının hücre ölümünü % 1,1; atiprimodla beraber curcumin uygulaması hücre ölümünü % 9,6 olduğu tespit edilmiştir. MDA-MB-453 BH+ meme kanseri hücre hattında sadece curcumin uygulamasının hücre ölümünü % 9,2; atiprimodla beraber curcumin uygulaması hücre ölümünü % 41,3 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 65).



Şekil 65. MDA-MB-453 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimodun apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin V-PI boyama yöntemi ile gösterilmesi

T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcumin apoptotik hücre ölümünü tetiklemektedir. MDA-MB-453 doğal tip meme kanserinde curcumin uygulanması apoptotik hücre ölümünü % 0,1 (geç apoptotik hücre ölümü) olarak uyardığı tespit edilmiştir. Otokrin BH anlatımı kazandırılmış T47D hücrelerinde curcumin uygulanması apoptotik hücre ölümünü % 1,1 [erken apoptotik ölüm (% 0,4), geç apoptotik hücre ölümü (% 0,7)] olarak uyardığı tespit edilmiştir. T47D doğal tip meme kanseri hücre hattında sadece curcumin uygulamasının hücre ölümünü % 0,8; atiprimodla beraber curcumin uygulaması hücre ölümünü % 7,0 olduğu tespit edilmiştir. T47D BH+ meme kanseri hücre hattında sadece curcumin uygulamasının hücre ölümünü % 5,1; atiprimodla beraber curcumin uygulaması hücre ölümünü % 5,1 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 66).



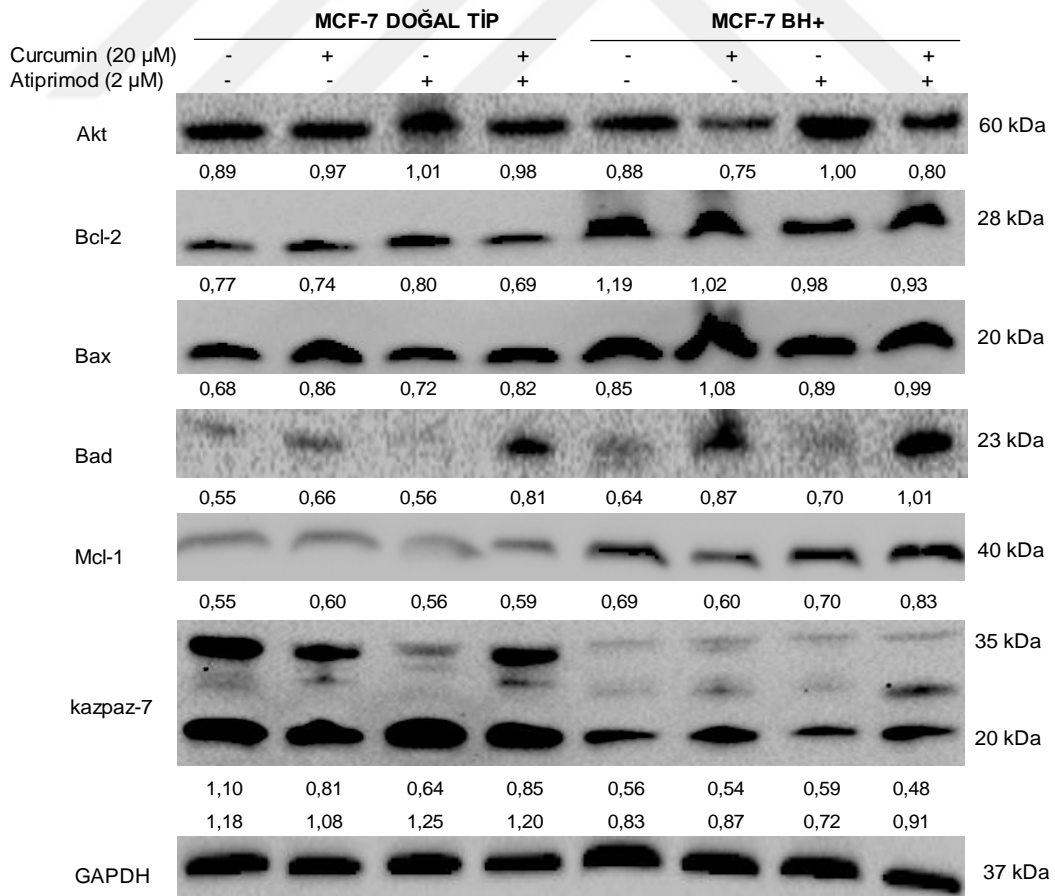
Şekil 66. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimodun apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin V-PI boyama yöntemi ile gösterilmesi

4.8. Curcumin ve atiprimod'un MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında hücre ölümü üzerine etkisi

Curcumin ve atiprimod'un MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla immunoblotlama tekniği kullanılmıştır.

Hücre canlılığı başta olmak üzere hücre içinde pek çok proliferasyon ile ilişkili sinyal yolları üzerinde etkisi olan Akt protein anlatımı üzerine 20 µm curcumin uygulamasının otokrin BH anlatımı kazandırılmış olan MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında anlatımı belirgin olarak düşürdüğü ve bu etkinin atiprimod ile beraber Akt anlatımı üzerinde baskılayıcı etkisinin devam ettiği belirlenmektedir. Ancak doğal tip MCF-7 hücrelerinde belirgin bir Akt anlatımı üzerinde curcumin ve/veya atiprimod uygulamasının etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Hücre içinde anti-apoptotik görevi olan Bcl-2 protein anlatımı irdelendiğinde, MCF-7 doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılan hücrelerde 20 µm curcumin uygulaması ile Bcl-2 anlatımı üzerine baskılayıcı etkisi tespit edilmektedir. Ayrıca doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılan hücre hatlarında curcumin ile beraber atiprimod uygulamasının Bcl-2 anlatımı üzerinde baskılayıcı etkisi devam etmektedir. Pro-apoptotik ölüm sinyali

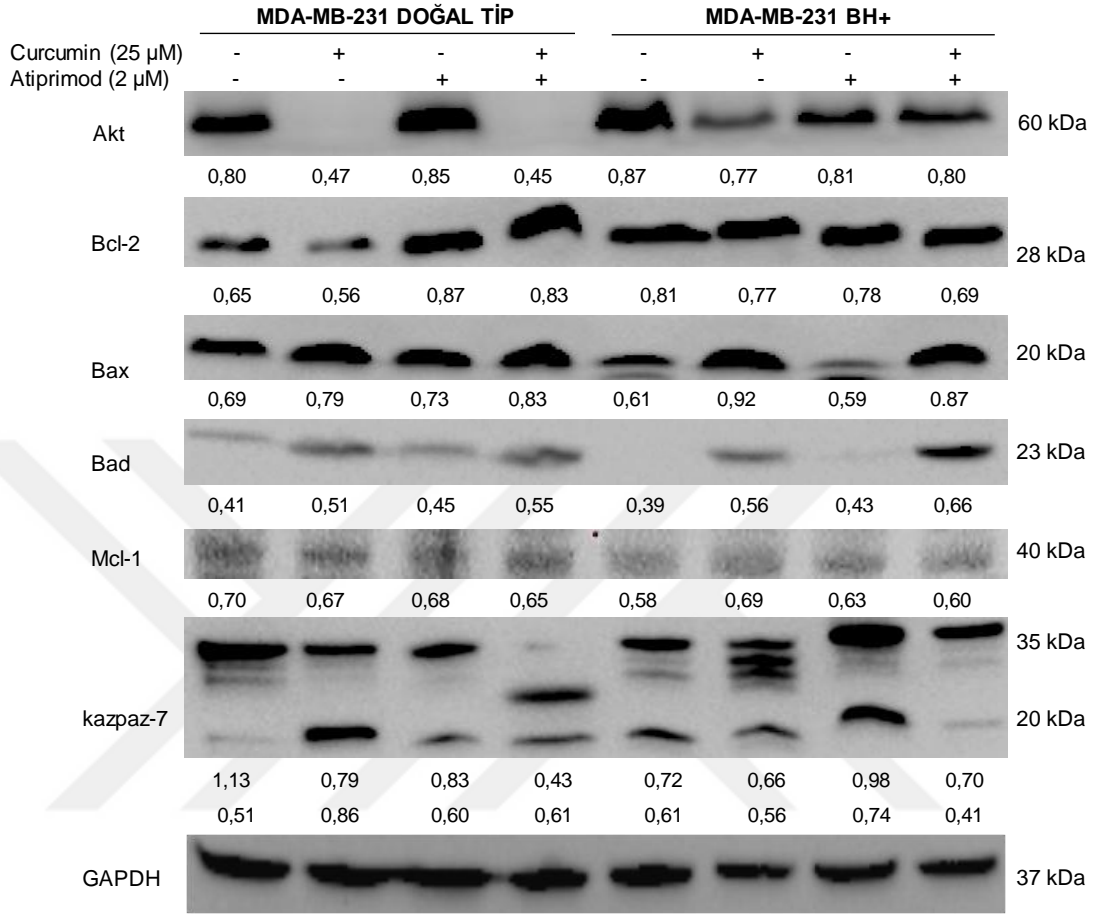
üzerinde göreve sahip olan Bax protein anlatımının curcumin uygulaması ile anlatımının hem doğal tip hem de otokrin BH anlatımı kazandırılmış MCF-7 hücrelerinde arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılmış olan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde atiprimod ile beraber curcumin uygulamasının Bax anlatımını belirgin olarak arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca Bax ile beraber çalışan pro-apoptotik protein olan Bad anlatımının ise hem doğal tip hem de otokrin BH anlatımı kazandırılmış MCF-7 meme kanseri hücrelerinde curcuminin Bad üzerindeki baskılayıcı etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Her iki hücre hattında da atiprimodla beraber curcumin uygulaması Bad anlatımını arttırdığı gösterilmiştir. Anti-apoptotik protein olarak hücre içinde görev yapan Mcl-1 protein anlatımı üzerinde belirgin anlatımda azalma otokrin BH anlatımı kazandırılmış MCF-7 hücrelerinde sadece curcumin uygulaması ile belirlenmiştir. Ayrıca doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılmış hücrelerde curcumin ve curcumin ile beraber atiprimod uygulamasının pro-kazpaz-7 anlatımını azaltırken cleaved kaspaz 7 anlatımının arttığı tespit edilmiştir (Şekil 67).



Şekil 67. MCF-7 doğal tip ve BH anlatımı artırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi

Akt protein anlatımı üzerine 25 µm curcumin uygulamasının doğal tip MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında anlatımı belirgin olarak baskıladığı ve bu etkinin atiprimod ile beraber Akt anlatımı üzerinde baskılayıcı etkisinin devam ettiği, ancak BH+ hücrelerinde atiprimodla beraber curcumin uygulamasında bu baskının devam etmediği belirlenmiştir. Hücre içinde anti-apoptotik görevi olan Bcl-2 protein anlatımı irdelendiğinde, MDA-MB-231 doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılan hücrelerde 25 µm curcumin uygulaması ile Bcl-2 anlatımı üzerine baskılayıcı etkisi tespit edilmektedir. Ayrıca doğal tip hücre hattında curcumin ile beraber atiprimod uygulamasının Bcl-2 anlatımını üzerinde baskılayıcı etkisi devam etmezken, otokrin BH anlatımı kazandırılan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde Bcl-2 anlatımı üzerinde baskılayıcı etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca otokrin BH anlatımı kazandırılmış olan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde sadece atiprimod uygulaması Bcl-2 anlatımı üzerinde baskılayıcı etkisi olduğu görülmektedir. Pro-apoptotik ölüm sinyali üzerinde göreve sahip olan Bax protein anlatımının otokrin BH anlatımı kazandırılmış MDA-MB-231 hücrelerinde baskılandığının ancak curcumin uygulaması ile Bax anlatımının hem doğal tip hem otokrin BH anlatımı kazandırılmış MDA-MB-231 hücrelerinde baskılayıcı etkisi belirlenmemiştir. Doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılmış olan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde atiprimod ile beraber curcumin uygulamasının Bax anlatımını üzerinde baskılayıcı etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca otokrin BH anlatımı kazandırılmış olan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde sadece atiprimod uygulaması Bax anlatımı üzerinde baskılayıcı etkisi olduğu görülmektedir. Bad anlatımının ise hem doğal tip hem de otokrin BH anlatımı kazandırılmış MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulanması ile baskılayıcı etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde atiprimod ile beraber curcumin uygulamasında da hem doğal tip hem de otokrin BH anlatımı kazandırılmış hücrelerinde baskılayıcı etkisi olmadığı belirlenmiştir. Curcumin; doğal tip MDA-MB-231 hücrelerinde anti-apoptotik protein olan Mcl-1 protein anlatımını baskımlarken, otokrin BH anlatımı kazandırılmış hücrelerde baskılayıcı etkisi olmadığı belirlenmiştir. Curcumin ile beraber atiprimod uygulamasında da doğal tip MDA-MB-231 hücrelerinde Mcl-1 anlatımını baskımlarken, otokrin BH anlatımı kazandırılmış hücrelerde baskılayıcı etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Otokrin BH anlatımı kazandırılmış hücrelerde cleaved kaspaz 7 anlatımını hariç, doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılmış hücrelerde curcumin ve

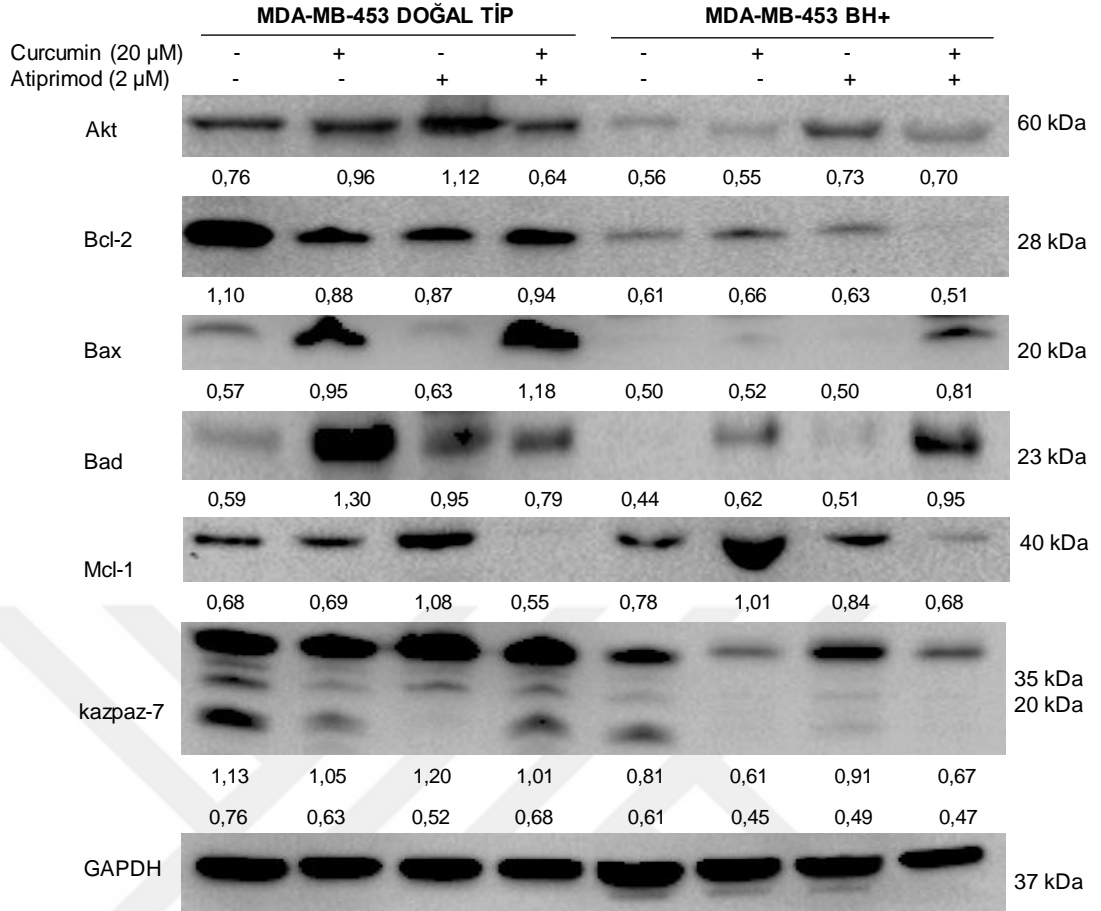
atiprimod ile beraber curcumin uygulamasının pro-kaspaz anlatımını azalttığı, cleaved kaspaz 7 anlatımını arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 68).



Şekil 68. MDA-MB-231 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi

MDA-MB-453 meme kanseri hücre hatlarına otokrin BH anlatımı kazandırıldığında Akt anlatımının baskılandığı tespit edilmektedir. 20 µm curcumin uygulaması doğal tip MDA-MB-453 hücrelerinde Akt anlatımını baskılamazken, otokrin BH anlatımı kazandırılan hücrelerde baskılayıcı etkisi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca atiprimodla beraber curcumin uygulandığında doğal tip MDA-MB-453 hücrelerinde anlatımı baskılandığı, otokrin BH+ hücrelerde ise baskılayıcı bir etki olmadığı tespit edilmiştir. Curcuminin MDA-MB-453 doğal tip hücrelerde Bcl-2 anlatımını baskıladığı tespit edilirken aynı etki otokrin BH anlatımı kazandırılan hücrelerde belirgin olarak ifade düzeyinde değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Atiprimodla beraber curcumin uygulandığında her iki MDA-MB-453 meme kanseri hücresinde baskılayıcı etkinin olduğu tespit edilmiştir. Bax protein anlatımının

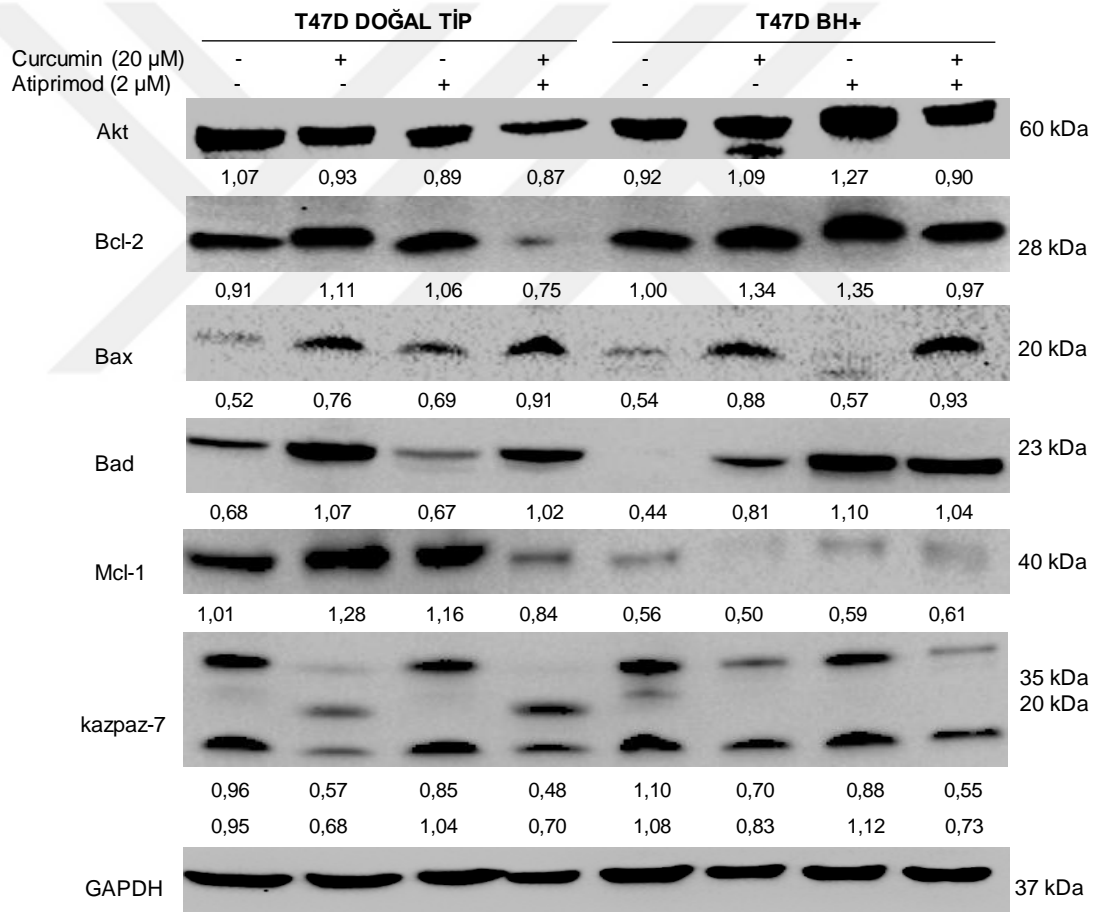
curcumin uygulaması ile doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılan MDA-MB-453 hücrelerinde anlatımının arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca doğal tip hücre hattında atiprimod ile curcumin Bax protein anlatımı üzerinde indükleyici etkisinin artırıldığı gözlemlenmiştir. Otokrin BH anlatımı olan MDA-MB-453 hücrelerinde bu etki kombine tedavide daha belirgin olarak görülmektedir. Doğal tip hücrelerde curcumin Bad anlatımını arttırdığı ama bu etkinin MDA-MB-453 BH+ hücrelerinde etkinliğinin düşük olduğu belirlenmiştir. MDA-MB-453 BH+ hücrelerinde atiprimod ile beraber curcumin uygulamasının Bad anlatımını sadece curcumin uygulamasına kıyasla arttırdığı tespit edilmiştir. Mcl-1 protein anlatımı üzerinde hem doğal tip hem de otokrin BH anlatımı kazandırılmış MDA-MB-453 hücrelerinde sadece curcumin uygulaması ile baskılanma belirlenmezken, atiprimod ile beraber curcumin uygulaması ile hem doğal tip hem de otokrin BH anlatımı kazandırılmış MDA-MB-453 hücrelerinde Mcl-1 anlatımında baskılanma belirlenmiştir. Ayrıca doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılmış hücrelerde curcumin uygulamasıyla kazpaz-7 anlatımını azalttığı, curcumin ile beraber atiprimod uygulamasında ise otokrin BH anlatımı kazandırılmış hücrelerde azalma görülmezken, doğal tip hücrelerde azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 69).



Şekil 69. MDA-MB-453 doğal tip ve BH anlatımı artırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi

Akt protein anlatımı üzerine 20 µm curcumin uygulamasının doğal tip T47D meme kanseri hücre hatlarında Akt anlatımını baskıladığı ve bu etkinin atiprimod ile beraber devam ettiği belirlenmiştir. Ancak otokrin BH anlatımı kazandırılmış olan T47D meme kanseri hücre hatlarında curcumin Akt anlatımını artırırken, curcumin ile atiprimod beraber uygulamasının Akt anlatımının baskılandığı tespit edilmektedir. Bcl-2 protein anlatımı 20 µm curcumin uygulaması durumunda hem doğal tip hem de otokrin BH anlatımı kazandırılan T47D meme kanseri hücrelerinde arttırdığı belirlenmektedir. Ancak T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde curcumin ile birlikte atiprimod uygulamasının Bcl-2 anlatımını baskıladığı tespit edilmiştir. Bax proteini anlatımının curcumin uygulaması ile hem doğal tip hem de otokrin BH anlatımı kazandırılmış T47D hücrelerinde anlatımı arttığı tespit edilmiştir. Bu etki atiprimod ile beraber curcumin uygulamasında doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılmış hücrelerde de devam ederek Bax anlatımını belirgin olarak arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca Bax ile beraber çalışan pro-apoptotik protein olan Bad

anlatımının ise; doğal tip ve otkrin BH anlatımı kazandırılmış T47D meme kanseri hücrelerinde, curcumin ve atiprimod ile beraber curcumin uygulamasının Bad üzerindeki indükleyici etkisini arttırdığı tespit edilmiştir. Mcl-1 protein anlatımı üzerinde azalma otkrin BH anlatımı kazandırılmış T47D hücrelerinde curcumin uygulaması ile belirlenmiştir. Curcumin atiprimodla beraber uygulandığında Mcl-1 anlatımında artma görülmektedir. Doğal tip T47D hücrelerinde curcumin uygulaması Mcl-1 anlatımını arttırırken, curcumin ile beraber atiprimod uygulamasının Mcl-1 protein anlatımı üzerinde belirgin azalma tespit edilmiştir. Kazpaz-7 anlatımı ise doğal tip ve otkrin BH anlatımı kazandırılmış hücrelerde curcumin ve atiprimod ile beraber curcumin uygulamasının anlatımı azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 70).



Şekil 70. T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında curcumin ve atiprimod'un apoptotik sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi

5. TARTIŞMA

Dünyada kadınlar arasında görülen en yaygın kanser tipi meme kanseridir [185]. Son yıllarda bilgilendirme ile erken tanı artmakta olduğu gösterilse de meme kanseri mortalitesi azalmış olmasına rağmen, gelişmekte olan ülkelerde görülme sıklığı ve ölüm oranları artmaya devam etmektedir [186, 187]. Meme kanseri üzerine yapılan kapsamlı araştırmalarda görüldüğü üzere; meme kanseri etiyojisi kompleks ve çok faktöre bağlı olduğu, bununla birlikte çevresel risk faktörlerini içerdiği bilinmektedir [188]. Meme kanseri etiyojisi başta elektromanyetik alan, diyet, menarş erken yaşı, menopozda geç yaş, emzirme, penetrasyonu yüksek yatkınlık genlerinin kalıtımı, meme kanseri öyküsü, yaşam biçimi gibi bir çok etkene bağlı olduğu bilinmektedir [189]. Kanser patofizyolojisi; genel olarak, başlama, ilerleme ve proliferasyon gibi normal bir hücrenin mutasyonel olarak aktive edildiği adımlarla gerçekleşir [190]. Meme kanseri vakalarının % 10'u otozomal dominant kalıtıma bağlı BRCA1 ve BRCA2 allellerinde ki mutasyonlar ile olduğu bilinmektedir [190, 191].

Hipofiz bezinden salınan BH, anabolik etkilere sahip büyümeyi teşvik eden ve metabolizmayı regüle eden bir hormondur. Ayrıca kendine özgü membran reseptörü olan BHR'ye bağlanarak proliferasyon, farklılaşma ve kemotaksis gibi bir çok hücre fonksiyonu düzenlemektedir [192]. BH salgılanması için öncelikle hipotalamustan salgılanan GHRH salınır, GHRH salımıyla BH anlatımı ve salınımı artarken, yine hipotalamustan salınan SST hormonu salımıyla da BH salınımını inhibe ederek seviyesini azaltır böylelikle kandaki BH seviyesi korunmuş olmaktadır [193]. BH ilk olarak BHR bağlanır, büyüme fonksiyonunu hem tirozin kinaz aktivasyonu ile direkt, hem de dolaylı olarak JAK-STAT yolağının aktivasyonunun ardından IGF-1 ve diğer BH bağımlı genleri ifadesini arttırarak gerçekleştirir [194]. Postnatal büyüme üzerinde etkisi gösterilen BH'nun otokrin anlatımının artışı meme kanseri tetikleyicisi ve ilaç direncine neden olduğu gösterilmiştir [195, 196].

Otokrin BH anlatımı kazandırılmış MCF-10 meme epitel hücrelerinde BH sinyalinin invazyon ve metastazı indüklediği tespit edilmiş [96] ve BH+ ksenograft MDA-MB-453 meme kanseri fare modellerinde tümör çapını arttırdığı tespit edilmiştir [99]. Ayrıca otokrin BH sinyali kazandırılan meme kanseri hücrelerinde hücre proliferasyon, invazyon ve metastaz indüklenmesinin siklin-D1, Bcl-2 ve c-myc anlatımlarını arttırarak indüklediği MCF-7, NIH-3T3 *in vitro* ve MCF-10A ksenograft

in vivo fare modellerinde gösterilmiştir [197]. Bunlara ilaveten otokrin BH anlatımı kazandırılmış olan MDA-MB-453 ve SKBR-3 meme kanseri *in vivo* fare modellerinde tümör çapının doğal tip hücrelere kıyasla yüksek miktarda artış gösterdiği belirlenmiştir [99]. Ayrıca otokrin BH anlatımı kazandırılan meme kanseri hücrelerinin çeşitli kemoterapötik ajanlara karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Bu kemoterapötik ilaçlar arasında olan tamoksifen [98], doksorubisin [198], daunorubisin [197], mitomisin C [97] karşı direncin otokrin BH anlatımı kaynaklı olduğu meme kanseri *in vitro* hücre hattı modellerinde gösterilmiştir. Literatürdeki bu bilgiler ışığında laboratuvarımızda gerçekleştirilen otokrin BH anlatımı stabil olarak gerçekleştiren MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 ve T-47D meme kanseri hücrelerinde curcumine karşı ilaç direncinin olduğu ve bu direncin doza ve zamana bağlı olarak ilaç direncinin kırıldığı tespit edilmiştir (Merve Çelik ve Merve Uğur Yüksek Lisans Tez Çalışmaları).

Curcuma longa bitkisinin rizomlarından izole edilen doğal olarak oluşan sarı renkli polifenol Curcumin (diferuloylmethane) halk arasında ki ismiyle Zerdeçal; cilt, meme, kolon, mesane, karaciğer, akciğer kanserlerinde karsinogenezisini baskıladığı bilinmektedir [199]. NF- κ B ve STAT3 aktivasyonunu inhibe ederek MM hücrelerini apoptoze götürdüğü bilinmektedir [200]. Curcumin aktif STAT3'ü inhibe ederek hücre büyüme sinyaline ket vurduğu ve $\Delta\Psi$ m düşürüp, sitokrom c salınmasını, kaspaz bağımlı apoptozun aktivasyonunu sağladığı bildirilmiştir [201]. Anti-inflamatuar, anti-oksidan ve anti-kanserojen özelliği olan curcumin, aynı zamanda hücre döngüsünü kontrol etmekte ve çeşitli kanser türlerinde hücre döngüsünü durdurup hücreyi apoptoza yönlendirmektedir [202]. Siklin D1'in downregülasyonu sağlayarak, transkripsiyonel ve translasyonel seviyeleri vasıtasıyla CDK419 ile ilişkisini bloke ederek hücre döngüsünün ilerleyişini inhibe etmekte, ayrıca; p21 ve p2720, 21 gibi CDKI'ların upregülasyonunu sağlayarak hücre döngüsünün durdurulmasını tetiklemektedir [203].

Curcuminin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda meme kanseri, prostat, melanoma, kolon kanseri gibi çeşitli kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü tektiklediği ve etkin bir NF- κ B inhibitörü olduğu gösterilmiştir [142, 143]. Pre-klinik denemelerin pozitif etkisine bağlı olarak klinik denemeler prostat, pankreas, meme ve kolon kanseri gibi vakalarda gerçekleştirilmiştir. Günlük 8.000 mg curcumin uygulamasının non-toksik olduğu ve anti-karsinojenik etkisi çoklu malign vakalarda gösterilmiştir [144,

147]. Oral curcumin tedavisi gören kanser hastalarında serum curcumin miktarının HPLC analizi ile miktarının azaldığı ve hem curcumin hem de sekonder metabolitlerinin seviyesinin düşük tespit edilmesinin curcuminin etkisini azalttığı gösterilmiştir [144]. Ancak 5-FU, gencitabine, docetaxel gibi kemoterapötik ilaçlar ile beraber curcumin uygulamasının kolon, pankreas ve meme kanseri klinik çalışmalarında tedavi edici etkisinin arttığı gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında etkin bir *in vitro* ve *in vivo* NF- κ B inhibitörü gibi görev yapan apoptotik ajan curcuminin klinik etkinliğinin artırılması için nanopartikül, lizozomal ajan ile kapsulasyon aracılığı ile curcuminin etkinliği ve stabilitesi artırılması yönünde stratejiler devam etmektedir. Bu bilgiler ışığında bu çalışmada amacımız; laboratuvarımızda hali hazırda yaratılmış olan otokrin BH anlatımı yapan MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 ve T47D meme kanseri hücre hatlarına seçili dozlarda [(MCF-7, MDA-MB-453, T47D hücre hatlarında 20 μ M; MDA-MB-231 hücre hattında 25 μ M)] curcumin uygulamasının apoptotik etkisini arttırmak üzere bir JAK-2 inhibitörü olan atiprimod ile beraber ikili ilaç uygulaması ile otokrin BH sinyaline bağlı ilaç direncini yıkmak stratejisi geliştirme hedeflenmiştir.

BH sinyali JAK2/STAT5 sinyal yolu üzerinden onkogenik genlerin anlatımı ile hücre büyüme ve çoğalmasını tetiklediği bilinmektedir [105]. JAK/STAT sinyal yolu hücre proliferasyon, metastaz ve invazyonu tetiklediği bilindiği için bu sinyal yolağını inhibe eden çeşitli inhibitörler kanser tedavisinde potansiyel olarak ön görülmüştür [159]. JAK-2 inhibitörü olan atiprimodun hepatosellüler karsinoma, multiple miyeloma, lenfoma, ER+ ve ER- meme kanseri hücrelerinde JAK/STAT sinyali üzerinde baskılayıcı etkisi, özellikle STAT-3, -5 defosforile ettiği gösterilmiştir [163, 166]. Ayrıca JAK/STAT sinyal yolu alt hedefi olan sitokinlerden IL-6 üzerinde engelleyici etkisi gösterilmiştir [161, 162]. Curcuminin klinik araştırmalarda sekonder metabolitlerinin düşük olması, yarı-ömrünün düşük olması nedeni ile literatürde ikili kombine ilaç denemelerinin *in vitro* ve klinik çalışmalarda etkin olarak apoptotik ölümü indüklediği ve tümör hacmini belirgin olarak azalttığı tespit edilmiştir [204]. Bu bilgiler ışığında curcuminin gibi anti-proliferatif, anti-oksidan, anti-karsinojenik etkisi olan kuvvetli terapötik etkisi *in vitro* ve *in vivo*da kanıtlanan doğal bitkisel ajanın terapötik etkinliğini arttırmak için atiprimod gibi JAK/STAT sinyalinde ve sitokinler üzerinde baskılayıcı etkisi olduğu gösterilen azapiran bileşeninin birlikte uygulanması ile otokrin BH anlatımı kaynaklı curcumin direncinin kırılması yönünde bu tez kapsamında moleküler mekanizma irdelenmiştir.

Otokrin BH anlatımı kazandırılan MCF-7, T47D ve MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde parental hücrelere kıyasla proliferasyonu invazyon, metastazın indüklendiği gösterilmiştir [94]. Ayrıca *in vivo* MCF-10 otokrin BH anlatımı ile tümör gelişimi ve metaztazı indüklediği gösterilmiştir [96]. Otokrin BH anlatımı kazandırılan meme kanseri hücrelerinde mitomisin C [97], tamoksifen [98], daunorubicin [99] ve doksorubisin [100] gibi kemoterapötik ilaçlara karşı direnç mekanizması gösterilmiştir. Literatürdeki bu bilgiler ışığında anti-proliferatif etkisi dışında anti-hormonal etkisi gösterilen curcuminin otokrin BH anlatımı kazandırılmış laboratuvarımızda hali hazırda mevcut MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-231, T47D meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine ket vurma etkisi, hücre ölümü, apoptotik ölüm durumu ilk defa curcumin ile beraber JAK-2 inhibitörü olan atiprimod ile beraber uygulayarak bu tez kapsamında irdelenmiştir. Elde edilen verilere göre atiprimod ile beraber curcumin uygulamasının hücre canlılığına ket vurduğu tüm doğal tip hücrelerde gösterilmiştir. Ayrıca curcumine direnç gösteren otokrin BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücrelerinde de direncin kırıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca sadece curcumin uygulamasına kıyasla atiprimod ile beraber curcumin uygulamasının en etkin hücre canlılığına ket vurma potansiyelinin MDA-MB-231 ve T47D BH+ meme kanseri hücrelerinde görüldüğü tespit edilmiştir. Atiprimod'un ER- ve ER+ meme kanseri hücrelerinde hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda belirgin olarak hücre canlılığına ket vurduğu ve apoptotik ölümü indüklediği gösterilmiştir [158]. Ayrıca atiprimod kaynaklı hücre proliferasyonuna ket vurma durumu hepatosellüler HepG2 hücre hatlarında [164], MM [167], lenfoma [165] hücrelerinde gösterilmiştir. Bu tez ile yaratılan BH+ meme kanseri hücreleri üzerinde atiprimodun etkisi irdelendiğinde MCF-7, MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığına ket vurma potansiyelinin yüksek olduğu ancak bu etkinin MDA-MB-453 ve T47D daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeninin literatürdeki atiprimod dozundan daha az kullanıldığı ve süresinin daha kısa olduğu ön görülmektedir. Ancak atiprimodun curcumin kaynaklı hücre ölümünü tüm meme kanseri doğal tip hücrelerde gösterdiği tespit edilirken, BH+ hücrelerinde ise MCF-7, MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 BH+ hücrelerinde hücre ölümünü artırıcı etki tespit edilirken, T47D BH+ hücrelerinde böyle bir etki 1 saat kombine ilaç uygulamasında belirgin olarak tespit edilememiştir. İlaç uygulama süresinin uzatılarak optimize edilerek bunun üstesinden gelinmesi ön görülmüştür. Ayrıca benzer cevap $\Delta\Psi_m$ içinde tespit edilmiş, ve tüm doğal tip meme kanseri hücrelerinde ikili ilaç uygulaması sadece curcumin uygulamasına kıyasla $\Delta\Psi_m$

belirgin olarak azaldığı gösterilmiş, ancak atiprimodun curcumin kaynaklı $\Delta\Psi_m$ azaltma etkisi MCF-7, MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 BH+ meme kanseri hücrelerinde belirlenmiştir. Bu tez kapsamında literatürde ilk defa curcumin ile beraber atiprimod uygulamasının curcumine karşı direnç gösteren BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığına ket vurma potansiyelinin arttığı ve hücre ölümünü $\Delta\Psi_m$ düşürerek indüklendiği gösterilmiştir.

Curcumin prostat, kolon, servikal, melanoma ve meme kanseri gibi pek çok kanser hücre hattında hücre döngüsüne ket vurarak hücre ölümünü tetikleyen bitkisel türevli bir ajandır [126]. İlaç direnç mekanizmasında rol alan Bcl-2 anti-apoptotik protein anlatımı arttırılmış MCF-7 meme kanseri hücrelerinde curcuminin PI3K ve NF- κ B inhibe ederek G2/M fazında hücre döngüsüne ket vurduğu gösterilmiştir [205]. Ayrıca curcuminin G2/M fazında hücre döngüsüne ket vurduğu PANC1 ve BxPC3 pankreatik kanser hücrelerinde gösterilmiştir [206]. Literatürdeki verilere göre bu tez kapsamında hücre döngüsü üzerine curcuminin etkisi irdelendiğinde, tüm meme kanseri hücrelerinde hem doğal tip hem de BH otokrin sinyal aktif olan meme kanseri hücrelerinde G2/M hücre döngüsünde bloke ettiği gösterilmiştir. Atiprimod ile beraber curcumin uygulamasının ise belirgin olarak hücre döngüsüne ket vurma yanında subG1 popülasyonunu arttırdığı doğal tip MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 ve T47D BH+ meme kanseri hücrelerinde tespit edilmiştir [158]. Atiprimodun U266-B1, OCI-MY5, MM-1, ve MM-1R miyeloma hücre hatlarında doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonuna ket vurduğu ve U266-B1 miyeloma hücrelerinde G0/G1 fazında hücre döngüsüne ket vurduğu tespit edilmiştir [207]. Ayrıca atiprimod ER-olan BT-549, MDA-MB-231 ve ER+ olan MCF-7, ve BT-474 meme kanseri hücrelerinde de tıpkı miyeloma hücrelerinde olduğu gibi G0/G1 fazında hücre döngüsüne ket vurduğu gösterilmiştir [208]. Ancak bu tez kapsamında atiprimodun hücre döngüsüne ket vurma etkisi en belirgin olarak MDA-MB-453 doğal tip ve BH+ meme kanseri G₁ fazında elde edilmiştir. Curcumin ile beraber atiprimod uygulamasının Annexin V/PI analizlerine göre curcumin apoptotik hücre ölümüne hem doğal tip hem de BH+ MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 ve T47D meme kanseri hücrelerinde tespit edilmiştir. Ancak atiprimod ile beraber curcumin uygulamasının tüm doğal tip meme kanseri hücrelerinde sadece curcumine kıyasla ikili ilaç uygulamasının apoptotik hücre ölümünü indüklediği gösterilse de bu etki

BH+ otokrin sinyali olan MDA-MB-453, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde en belirgin olarak belirlenmiştir.

Literatürde yapılan curcumin ile beraber pek çok kombine ilaç uygulaması hem pre-klinik hem de klinik açıdan gerçekleştirilmiştir. Pre-klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda curcuminin klinik uygulamaları prostat, kolon, pankreas ve meme kanserinde devam etmektedir [142, 143]. Pek çok malign klinik vakalarda curcuminin günlük 8.000 mg uygulamasının etkin tedavi edici rolü gösterilmiştir ve günlük curcumin ilaç uygulama dozununun 12.000 mg/gün olarak daha etkin olacağı üzerinde çalışmalar bulunmaktadır [144]. Curcumin uygulamasının kolorektal kanser vakalarında etkisinin hasta serumlarında curcumin ve metabolitlerinin beklenenden düşük olduğu gösterilmiştir [147]. Ancak curcumin ile beraber 5-FU beraber uygulamasının kolon kanseri vakalarında etkin tümör çapını düşürdüğü gösterilmiştir. Faz I ilerlemiş ve metastatik meme kanseri çalışmasında curcumin ile beraber dosetaksel kombine tedavisinin altı siklus halinde her üç haftada bir uygulanan docetaksel ile kombine olarak uygulanmasının etkili olduğu gösterilmiştir [151]. Ayrıca gentanamib dirençli ileri pankreatik kanseri vakalarında faz I, II çalışmalarına göre curcumin ile beraber gentamib uygulamasının etkin karsinojenik etkisi gösterilmiştir [152]. Ayrıca sitral ile curcuminin beraber uygulamasının meme kanseri hücrelerinde hücre proliferasyon ve hücre ölümü ve hücre döngüsüne ket vurarak etkilediği tespit edilmiştir [209]. Bunlara ilaveten atiprimod ile beraber proteozom inhibitörü olan bortezomib beraber uygulamasının *in vivo* ve *in vitro* olarak Hodgkin lenfoma hücrelerinde tespit edilmiştir [210]. Ancak literatürde atiprimod ile curcuminin kombine uygulamasının meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisi irdelenmemiştir. Bu tez kapsamında literatürde ilk defa atiprimod ile beraber curcumin uygulamasının BH otokrin sinyali kazandırılmış MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 ve T47D meme kanseri hücrelerinde curcumine karşı ilaç direncini hücre proliferasyonuna ket vurarak, $\Delta\Psi_m$ azaltıp, hücre döngüsüne ket vurarak veya bazı meme kanseri modelinde subG1 hücre popülasyonunu arttırarak, apoptotik ölümü indüklediği gösterilmiştir.

Atiprimod, JNK aktive etmekte, Bax, Bad seviyelerini regülasyonunu arttırdığı ve Bcl-2'yi fosforilleyerek AIF indüklediği ve mitokondriden sitokrom c'nin salınmasına, kaspaz-9, kaspaz-3 ve PARP'ın kırılmasını aktive ettiği gösterilmiştir [156, 157]. Atiprimod Bcl-2, Bcl-x_L ve Mcl-1 gibi anti apoptotik proteinlerin

anlatımını indirgediği, PARP kırılımını indükleyerek apoptozu tetiklediği gösterilmiştir [158]. Ayrıca Bcl-2 anlatımı artırılmış olan meme kanseri hücrelerinde PI3K/Akt yolağını Akt defosforile ederek etki ederek curcumine karşı ilaç direncini kırdığı gösterilmiştir [205]. Literatürde elde edilen verilere paralel olarak bu tez kapsamında Akt anlatımının curcumin uygulaması ile belirgin olarak baskılandığı tüm meme kanseri hücrelerinde tespit edilmiştir. Ayrıca bu tez çalışması ile ilk defa Akt anlatımının curcumin ile beraber atiprimod uygulamasında daha fazla baskılandığı MDA-MB-231, T47D ve MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde tespit edilmiştir.

Klinik kullanımda rutin olarak kullanılan deksametazon, doksorubisin, melfalan kemoterapötik ajanlar yanında kanser direnç mekanizmasının üstesinden gelinmesi yönünde yeni jenerasyon ilaçtan çeşitli hücre içi proliferatif sinyal anahtar moleküllerin inhibitörleri üzerinde potansiyel ilaç denemeleri yapılmaktadır. JAK/STAT sinyal inhibitörü olarak atiprimod'un indüklediği apoptozu arttırdığı ve anti-proliferatif ve anti-anjiyojenik aktiviteler sergilediğini, kaspaz-3 ve kaspaz-8'in aktivasyonu yoluyla apoptozu indüklediğini MM'de Akt ve STAT3'ün fosforilasyonunu inhibe ettiğini ileri sürmektedir [153, 158]. Ayrıca *in vivo* ve *in vitro* hücre lenfoma modellerinde atiprimodun JNK üzerinde etki ederek Bax, Bad anlatımını arttırdığı ve Bcl-2 fosforilasyonunu indükleyerek sitokrom c salınımını arttırdığı ve kaspaz-9, -3 aktive ederek apoptotic ölümü indüklediği belirlenmiştir [163]. Ayrıca atiprimodun apoptotik etkisi hepatosellüler karsinoma hücresi olan HepG2 AD38 hücrelerinde Akt, STAT-3 üzerinde inhibitive etki göstererek ölüme indüklediği tespit edilmiştir [164]. Lösemi hücrelerinde etkin apoptotik indüktör görevi yaptığı tespit edilen atiprimodun kaspaz-3 ve PARP kesilimini indüklediği ve STAT3 ile STAT5 fosforilasyonunu baskılayarak gerçekleştirdiği akut miyeloid lösemi hücrelerinde gösterilmiştir [165]. Azaspiran ailesi üyesi bileşen olan Atiprimod hem anti-proliferatif hem de anti-anjiyogenik aktivitesi çok düşük konsantrasyonlarda bile etkin olduğu T84 kolon karsinoma hücrelerinde hem kaspaz-9 ve -3 indükleyerek apoptotik ölümü tetiklediği gösterilmiştir [166]. Ayrıca curcumin çoklu sinyal yollarını kontrol ettiği ve farmakolojik olarak güvenli olduğundan dolayı ideal bir kemopreventif ajandır [152]. Anti apoptotik sinyal yollarını inhibe ederek kanser hücrelerini kemoterapötik ajanlara karşı duyarlı hale getirir [211]. Ayrıca atiprimodun kemik iliği çoklu miyelom gelişiminin hem *in vivo* hem de *in vitro*da büyüme ve farklılaşmasını engellediği tespit edilmiştir [167]. Akt proteini PI3K/Akt yolağı üzerinde bulunan hücre sağ kalımı ve proliferasyonda görevli bir proteindir [212]. Bu

tez kapsamında doğal tip MDA-MB-231, T47D meme kanseri hücrelerinde curcumin kaynaklı Akt anlatımının baskılanması atiprimodla beraber curcumin uygulamasında artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin kaynaklı Bcl-2 anlatımının baskılanması atiprimod ile beraber daha da arttığı gösterilmişken bu etki MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde elde edilmiş ama MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde tespit edilememiştir. Atirimodla beraber curcumin uygulaması doğal tip MCF-7, MDA-MB-453, T47D ve BH+ MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D hücre hatlarında belirgin bir baskılayıcı etkisi tespit edilmiştir. Ayrıca hem Bax hem de Bad anlatımı curcumin ile beraber atiprimod uygulamasında sadece curcumin uygulamasına kıyasla artış gösterdiği T47D ve MDA-MB-453 doğal tip ve hatta BH+ meme kanseri hücrelerinde ilk defa bu tez kapsamında elde edilmiştir.

Anti-proliferatif, anti-karsinojenik, anti-oksidan özelliği yanında anti-hormonal etkisi GH3 ve MMQ hücre hatlarında hem PRL hem de BH hormonal seviyelerinin 48 saat içinde baskıladığı gösterilmiştir [213]. Ayrıca GH3 ve At2 pitüater adenoma hücreleri üzerinde curcumin BH, ACTH ve prolactin gibi hormonların sentez ve salınımını baskıladığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir [214]. Böylece bizde bu tez kapsamında gerçekleştirdiğimiz BH yüksek anlatımı kazandırılan meme kanseri modellerinde curcuminin BH başta olmak üzere PRL, ve BH aşağıda sinyal yolağında etkin büyüme faktörü olan IGF-I salınımı ve sentez durumu ELİZA ve immunoblotlama ile gösterilmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre stabil BH salınım MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D meme kanseri hücrelerinde anlatım ve salınımında artış tespit edilen BH üzerinde curcuminin 24 saat ilaç uygulaması ile baskılayıcı etkisi literatürdeki veriler ile paralellik göstermiştir.

Curcuminin hormonal ve büyüme faktörleri üzerinde baskılayıcı etkisi yanında pek çok pro-inflammatuar sitokin olan TNF, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, ve kemokinleri transkripsiyon faktörü NF- κ B aracılığı ile baskıladığı gösterilmiştir [215]. Curcumin'in çok sayıda sitokin salınımını inhibe ettiği bilinmektedir. Curcumin'in monosit ve makrofajlardan IL-1 β , IL-8, TNF- α , MCP1 ve MIP1 α salınımını baskıladığı bildirilmektedir. Bunlara ilaveten, IL-6, IL-10, interferon γ gibi sitokinlerinde ekspresyonunu curcuminin azalttığı, inflamazyonda belirgin bir azalmaya ve fibrozis azalması ile bağlantılı olduğu görülmektedir [140]. Pankreas kanserine sahip kişilerle yapılan klinik çalışmalarda curcuminin klinik biyolojik

etkileri araştırılmıştır. On sekiz aydır hastalığı stabil devam eden kişilerde serum sitokin seviyelerinde (IL-6, IL-8, IL-10 ve IL-1 reseptör antagonistleri) anlamlı artışlar (4-35 kat) buna eşlik eden kısa fakat belirgin bir tümör gerilemesi (%73) tespit edilmiş ve herhangi bir toksisite görülmemiştir [146]. Curcuminin hastalarda ki periferik kan mononükleer hücrelerinde NF- κ B, COX-2, fosforillenmiş sinyal transdüseri ve transkripsiyon 3 aktivatörünün anlatımının azaldığı bildirilmiştir. Oral curcumin iyi derecede tolere edildiği ve sınırlı absorpsiyonuna rağmen pankreas kanseri olan bazı hastalarda biyolojik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Böylece, biyolojik stabilitesinin curcumin formülasyonları arttırmak üzere farmakolojik etkinliği yüksek analoglar veya nanopartikül, lipozom ile kaplı curcumin geliştirmeye yönelik planlar curcuminin antitümör aktivitesini desteklemek ve arttırmak için faydalı bir strateji olarak önerilmektedir [146, 149]. IL-6 ve IGF-I önemli MM hücre büyüme faktörleri olmasına ve Dex ile indüklenen apoptoza karşı koruma sağlamasına rağmen, eksojen IL-6 ve IGF-I atiprimod kaynaklı sitotoksosite karşı koruma sağlar [161, 162]. Ayrıca atiprimodun aynı zamanda güçlü bir JAK2/JAK3 inhibitörü olduğu bilinmektedir [159]. Ayrıca ERK1/2'yi, TNF- α tarafından tetiklenen I κ B α ve NF κ B p65 fosforilasyonunu inhibe eder [160]. Pankreas kanseri olan hastalarda günlük 12 gram'a kadar güvenli kullanımda oral yolla alındığında curcuminin sitokinlerin anlatımını arttırarak, tümör baskılanması sağlanmıştır [144]. Bu tez kapsamında literatürdeki bilgiler ışığında otokrin BH anlatımı kazandırılan meme kanseri hücrelerinde IL-6, IL-8, IL-10 gibi sitokinlerin anlatım durumu gösterilmiştir. Otokrin BH sinyali olan tüm meme kanseri hücrelerinde IL-6 salınımı BH anlatımı olmayan hücrelere kıyasla istatistiksel olarak artmış ve curcumin uygulaması ile IL-6 salınımı en belirgin MCF-7, MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde azalmıştır. Ayrıca anti-inflammatuar IL-10 sitokin salınımı BH anlatımı kazandırılmış olan meme kanseri hücrelerinde arttığı gösterilmiş ve curcumin uygulaması ile MCF-7, MDA-MB-231 ve T47D hücre hatlarında IL-10 salınımı azalırken, MDA-MB-453 hücre hattında arttığı tespit edilmiştir.

Bu tez kapsamında; literatürle paralel olarak stabil BH salan MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D meme kanseri hücrelerinde anlatım ve salınımında artış tespit edilen BH üzerinde curcuminin 24 saat uygulanması ile baskılayıcı etkisi olduğu ve literatürde ilk defa; otokrin BH anlatımı kazandırılmış MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D meme kanseri hücrelerinde BH, IGF-1, prolaktin, IL-6, IL-10 salgılarının ve IL-1 β , IL-6, IL-8 sitokinlerin anlatımının curcumin tarafından

baskılandığı tespit edilmiştir. Ayrıca yine literatürde ilk defa atiprimod ile beraber curcumin uygulamasının otokrin BH sinyali kazandırılmış MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D meme kanseri hücrelerinde curcumine karşı ilaç direncini, hücre proliferasyonu ve mitokondriyel membran potansiyelini azaltıp, hücre döngüsüne ket vurarak veya subG1 hücre popülasyonunu arttırarak apoptotik hücre ölümünü indüklediği tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçların gelecekte *in vitro* ve *in vivo* fare modellerinde de kombine tedavilerin uygulanması, aynı deneylerin MCF-10A gibi çeşitli hücre hatlarında da uygulanması ve karşılaştırılması, ayrıca T47D meme kanseri hücre hattı için curcumin ile beraber atiprimodun daha uzun süre uygulanarak, anti-inflamatuar ve anti-kanserojen etkisini arttırarak daha fazla tedavi edici olması sağlanacaktır.

Tablo 6. Curcuminin otokrin BH salınımı yapan MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D meme kanseri hücrelerinde hormon ve sitokinler üzerine etkisi

	MCF-7	MDA-MB-231	MDA-MB-453	T47D
BH	↓	↓	↓	↓
PRL	↑	↓	↓	■
IGF-I	↑	↓	↓	↓
IL-1β	↑	↓	↓	↓
IL-6	↓	↓	↑	↓
IL-8	↑	↓	■	↓
IL-10	↑	↑	↓	↑

Tablo 7. Curcumin ile beraber atiprimod uygulamasının sadece curcumin uygulamasına kıyasla otokrin BH salınımı yapan meme kanseri hücrelerinde hücre ölümü ve apoptotik ölüm üzerine etkisi

	MCF-7	MDA-MB-231	MDA-MB-453	T47D
Hücre canlılığı	↓	↓	↓	↓
Hücre ölümü	↑	↑	↑	■
Mitokondriyel membran potansiyeli	↓	↓	↓	■
Apoptotik hücre ölümü	↑	↑	↑	↑
Akt	↑	↑	↑	↓
Bax	↓	↓	↑	↑
Bad	↑	↑	↑	↑
Bcl-2	↓	↓	↓	↓
Mcl-1	↑	↓	↓	↑
Kaspaz-7	↓	↓	↓	↓

KAYNAKLAR

1. Singhal, S.K., et al., Towards understanding the breast cancer epigenome: a comparison of genome-wide DNA methylation and gene expression data. *Oncotarget*, 2016. **7**(3): p. 3002.
2. Ozsoy, A., et al., The Relationship Between Breast Cancer and Risk Factors: A Single-Center Study. *European journal of breast health*, 2017. **13**(3): p. 145.
3. Kaplan, S.L., Hormonal regulation of growth and metabolic effects of growth hormone. *Comprehensive Physiology*, 1999.
4. Waters, M.J. and B.L. Conway-Campbell, The oncogenic potential of autocrine human growth hormone in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(42): p. 14992-14993.
5. Prasanna, A., et al., Exploiting sensitization windows of opportunity in hyper and hypo-fractionated radiation therapy. *Journal of thoracic disease*, 2014. **6**(4): p. 287.
6. Sinha, D., et al., Chemopreventive and chemotherapeutic potential of curcumin in breast cancer. *Current drug targets*, 2012. **13**(14): p. 1799-1819.
7. Lv, Z.-D., et al., Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2014. **7**(6): p. 2818.
8. Verma, S.P., B.R. Goldin, and P.S. Lin, The inhibition of the estrogenic effects of pesticides and environmental chemicals by curcumin and isoflavonoids. *Environmental health perspectives*, 1998. **106**(12): p. 807.
9. Dean, E.J., et al., Novel therapeutic targets in lung cancer: Inhibitor of apoptosis proteins from laboratory to clinic. *Cancer treatment reviews*, 2007. **33**(2): p. 203-212.
10. Esquivel-Velázquez, M., et al., The role of cytokines in breast cancer development and progression. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2015. **35**(1): p. 1-16.
11. Hamasaki, M., et al., In vitro and in vivo activity of atiprimod (NN-diethyl-8, 8-dipropyl-2-azaspiro [4.5] decane-2-propanamine) inhibits human multiple myeloma cell growth in the bone marrow milieu. *Blood*, 2005.
12. Lockshin, R.A. and C.M. Williams, Programmed cell death—I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkworm. *Journal of insect physiology*, 1965. **11**(2): p. 123-133.
13. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 1972. **26**(4): p. 239.
14. Mustacchi, P., Ramazzini and Rigoni-Stern on Parity and Breast Cancer: Clinical Impression and Statistical Corroboration. *Archives of internal medicine*, 1961. **108**(4): p. 639-642.
15. De Stavola, B., Statistical facts about cancers on which doctor Rigoni-stern based his contribution to the Surgeons' Subgroup of the IV Congress of the Italian Scientists on 23 September 1842. *Statistics in medicine*, 1987. **6**(8): p. 881-884.
16. Erez, A., et al., Insights into the pathogenesis and treatment of cancer from inborn errors of metabolism. *The American Journal of Human Genetics*, 2011. **88**(4): p. 402-421.
17. Investigators, W.G.f.t.W.s.H.I., Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*, 2002. **288**(3): p. 321-333.
18. Coombs, N.J., et al., The impact of changes in hormone therapy on breast cancer incidence in the US population. *Cancer Causes & Control*, 2010. **21**(1): p. 83-90.
19. Nicholson, D., Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death & Differentiation*, 1999. **6**(11).
20. Banik, U., et al., Curcumin: the spicy modulator of breast carcinogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2017. **36**(1): p. 98.
21. G Grothaus, P., G. M Cragg, and D. J Newman, Plant natural products in anticancer drug discovery. *Current Organic Chemistry*, 2010. **14**(16): p. 1781-1791.
22. Luke, C., K. Priest, and D. Roder, Changes in incidence of in situ and invasive breast cancer by histology type following mammography screening. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2006. **7**(1): p. 69.
23. Guan, X., Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2015. **5**(5): p. 402-418.
24. Kang, Y. and K. Pantel, Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer cell*, 2013. **23**(5): p. 573-581.
25. Ma, L., J. Teruya-Feldstein, and R.A. Weinberg, Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, 2007. **449**(7163): p. 682-688.
26. Melzer, C., J. von der Ohe, and R. Hass, Breast Carcinoma: From Initial Tumor Cell Detachment to Settlement at Secondary Sites. *BioMed research international*, 2017. **2017**.
27. Allen, P.J., et al., Multi-institutional validation study of the American Joint Commission on Cancer changes for T and N staging in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Annals of surgery*, 2017. **265**(1): p. 185-191.
28. Kolak, A., et al., Primary and secondary prevention of breast cancer. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2017. **24**(4): p. 549-553.
29. Wolff, A.C., et al., Cancer of the breast, in *Abeloff's Clinical Oncology: Fifth Edition*. 2013, Elsevier Inc.

30. King, M.-C., J.H. Marks, and J.B. Mandell, Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 2003. **302**(5645): p. 643-646.
31. Levi, F., F. Lucchini, and C. La Vecchia, Worldwide patterns of cancer mortality, 1985-89. *European Journal of cancer prevention*, 1994. **3**(2): p. 109-144.
32. SEER, S., Stat Database: Incidence—SEER 9 Regs Research Data, Nov 2013 Sub (1973–2011) < Katrina/Rita Population Adjustment >—Linked To Country Attributes—Total US, 1969–2012 Countries, National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Surveillance Systems Branch, released April 2014, based on the November 2013 submission. *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program*, 2014.
33. DeSantis, C., et al., Breast cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2014. **64**(1): p. 52-62.
34. Ferzoco, R.M. and K.J. Ruddy, The epidemiology of male breast cancer. *Current oncology reports*, 2016. **18**(1): p. 1.
35. Anderson, B.O. and R. Jakesz, Breast cancer issues in developing countries: an overview of the Breast Health Global Initiative. *World journal of surgery*, 2008. **32**(12): p. 2578-2585.
36. Erdem, Y. and F. Tekşen, Genetic screening services provided in Turkey. *Journal of genetic counseling*, 2013. **22**(6): p. 858-864.
37. Berrino, F., S. Panico, and P. Muti, Dietary fat, nutritional status and endocrine associated cancers. *Diet and the aetiology of cancer*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1989: p. 3-13.
38. Protani, M., M. Coory, and J.H. Martin, Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*, 2010. **123**(3): p. 627-635.
39. Mansfield, C.M., A review of the etiology of breast cancer. *Journal of the National Medical Association*, 1993. **85**(3): p. 217.
40. Wynder, E.L., I.J. Bross, and T. Hirayama, A study of the epidemiology of cancer of the breast. *Cancer*, 1960. **13**(3): p. 559-601.
41. La Vecchia, C., et al., Menstrual cycle patterns and the risk of breast disease. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 1985. **21**(4): p. 417-422.
42. Hsieh, C.C., et al., Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: Associations and interactions in an international case-control study. *International journal of cancer*, 1990. **46**(5): p. 796-800.
43. Paffenbarger Jr, R.S., J.B. Kampert, and H.-G. Chang, Characteristics that predict risk of breast cancer before and after the menopause. *American Journal of Epidemiology*, 1980. **112**(2): p. 258-268.
44. Yuan, J.-M., et al., Risk factors for breast cancer in Chinese women in Shanghai. *Cancer research*, 1988. **48**(7): p. 1949-1953.
45. Ottman, R., et al., Familial breast cancer in a population-based series. *American journal of epidemiology*, 1986. **123**(1): p. 15-21.
46. Ottman, R., et al., Practical guide for estimating risk for familial breast cancer. *The Lancet*, 1983. **322**(8349): p. 556-558.
47. Masood Gilani, G. and S. Kamal, Risk factors for breast cancer in Pakistani women aged less than 45 years. *Annals of human biology*, 2004. **31**(4): p. 398-407.
48. Newman, B., et al., Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1988. **85**(9): p. 3044-3048.
49. Bishop, D., et al., Segregation and linkage analysis of nine Utah breast cancer pedigrees. *Genetic epidemiology*, 1988. **5**(3): p. 151-169.
50. Claus, E.B., N. Risch, and W.D. Thompson, Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *American journal of human genetics*, 1991. **48**(2): p. 232.
51. Howe, G.R., et al., Dietary factors and risk of breast cancer: combined analysis of 12 case—control studies. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 1990. **82**(7): p. 561-569.
52. Bernstein, L., et al., 94288033 Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women. *Maturitas*, 1995. **21**(3): p. 260-261.
53. Brinton, L.A., et al., Cigarette smoking and breast cancer. *American journal of epidemiology*, 1986. **123**(4): p. 614-622.
54. LONDON, S.J., et al., Lactation and risk of breast cancer in a cohort of US women. *American journal of epidemiology*, 1990. **132**(1): p. 17-26.
55. Goldgar, D.E., et al., Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 1994. **86**(21): p. 1600-1608.
56. Petrakis, N.L., et al., Epithelial Dysplasia in Nipple Aspirates of Breast Fluid: Association With Family History and Other Breast Cancer Risk Factors 2 3. *Journal of the National Cancer Institute*, 1982. **68**(1): p. 9-13.
57. Bernstein, J.L., L. López-Carrillo, and L. Wang, The epidemiology of Her-2/neu and P53 in breast cancer. *salud pública de méxico*, 1999. **41**: p. S114-S121.
58. Lahmann, P.H., et al., Physical activity and breast cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 2007. **16**(1): p. 36-42.
59. Tehard, B., et al., Effect of physical activity on women at increased risk of breast cancer: results from the E3N cohort study. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 2006. **15**(1): p. 57-64.
60. Doll, R. and R. Peto, The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 1981. **66**(6): p. 1192-1308.

61. Zheng, W., et al., Well-done meat intake and the risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 1998. **90**(22): p. 1724-1729.
62. Holmes, M.D. and W.C. Willett, Does diet affect breast cancer risk? *Breast Cancer Research*, 2004. **6**(4): p. 170.
63. Rohan, T.E., et al., Alcohol consumption and risk of breast cancer: a cohort study. *Cancer Causes and Control*, 2000. **11**(3): p. 239-247.
64. Singletary, K.W. and S.M. Gapstur, Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *Jama*, 2001. **286**(17): p. 2143-2151.
65. Pöschl, G., et al., Alcohol and cancer: genetic and nutritional aspects. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2004. **63**(1): p. 65-71.
66. Dong, J.-Y. and L.-Q. Qin, Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. *Breast cancer research and treatment*, 2011. **125**(2): p. 315-323.
67. Krishnan, A.V., et al., Tissue-selective regulation of aromatase expression by calcitriol: implications for breast cancer therapy. *Endocrinology*, 2010. **151**(1): p. 32-42.
68. Colston, K., Mechanisms implicated in the growth regulatory effects of vitamin D in breast cancer. *Endocrine-related cancer*, 2002. **9**(1): p. 45-59.
69. Wang, D., et al., Breast cancer risk is positively associated with height. *Breast cancer research and treatment*, 1997. **43**(2): p. 123-128.
70. Dupont, W.D. and D.L. Page, Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *New England Journal of Medicine*, 1985. **312**(3): p. 146-151.
71. Blackwood, M.A. and B.L. Weber, BRCA1 and BRCA2: from molecular genetics to clinical medicine. *Journal of Clinical Oncology*, 1998. **16**(5): p. 1969-1977.
72. Frank, T.S., et al., Sequence analysis of BRCA1 and BRCA2: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *Journal of Clinical Oncology*, 1998. **16**(7): p. 2417-2425.
73. Nevanlinna, H., Cancer risks in BRCA2 mutation carriers: The Breast Cancer Linkage Consortium. *Journal of the National Cancer Institute*, 2007.
74. Ford, D., et al., Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *The Lancet*, 1994. **343**(8899): p. 692-695.
75. Verma, R., et al., Pathological and epidemiological factors associated with advanced stage at diagnosis of breast cancer. *British medical bulletin*, 2012. **103**(1): p. 129-145.
76. Wu, L., et al., Promoter methylation of BRCA1 in the prognosis of breast cancer: a meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*, 2013. **142**(3): p. 619-627.
77. Antoniou, A., et al., Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *The American Journal of Human Genetics*, 2003. **72**(5): p. 1117-1130.
78. Ford, D., et al., Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *The American Journal of Human Genetics*, 1998. **62**(3): p. 676-689.
79. Foulkes, W.D., I.E. Smith, and J.S. Reis-Filho, Triple-negative breast cancer. *New England journal of medicine*, 2010. **363**(20): p. 1938-1948.
80. Badve, S., et al., Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern pathology*, 2011. **24**(2): p. 157-167.
81. Jitariu, A.-A., et al., Triple negative breast cancer: the kiss of death. *Oncotarget*, 2017. **5**.
82. Collignon, J., et al., Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 2016. **8**: p. 93.
83. Mirzania, M., Approach to the Triple Negative Breast Cancer in new drugs area. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*, 2016. **10**(2): p. 115.
84. Stanton, S.E., S. Adams, and M.L. Disis, Variation in the incidence and magnitude of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer subtypes: a systematic review. *JAMA oncology*, 2016. **2**(10): p. 1354-1360.
85. Hartmann, L.C., et al., Benign breast disease and the risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 2005. **353**(3): p. 229-237.
86. Dupont, W.D., et al., Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. *CANCER-PHILADELPHIA-*, 1993. **71**: p. 1258-1258.
87. Sabiston, D.C. and C.M. Townsend, *Sabiston textbook of surgery: The biological basis of modern surgical practice*. 2002: Saunders.
88. Sternlicht, M.D., Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Research*, 2005. **8**(1): p. 201.
89. Wu, Z.-S., et al., Tumor expression of human growth hormone and human prolactin predict a worse survival outcome in patients with mammary or endometrial carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2011. **96**(10): p. E1619-E1629.
90. Kaulsay, K.K., et al., The Effects of Autocrine Human Growth Hormone (hGH) on Human Mammary Carcinoma Cell Behavior Are Mediated via the hGH Receptor** Supported by the National Science and Technology Board of Singapore (PEL) and The National Medical Research Council (KOL). *Endocrinology*, 2001. **142**(2): p. 767-777.
91. Emerman, J.T., et al., Elevated growth hormone levels in sera from breast cancer patients. *Hormone and metabolic research*, 1985. **17**(08): p. 421-424.
92. Raccurt, M., et al., High stromal and epithelial human gh gene expression is associated with proliferative disorders of the mammary gland. *Journal of Endocrinology*, 2002. **175**(2): p. 307-318.

93. Mukhina, S., et al., Phenotypic conversion of human mammary carcinoma cells by autocrine human growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(42): p. 15166-15171.
94. Chen, Y.-J., et al., Autocrine human growth hormone stimulates the tumor initiating capacity and metastasis of estrogen receptor-negative mammary carcinoma cells. *Cancer letters*, 2015. **365**(2): p. 182-189.
95. Kaulsay, K.K., et al., Autocrine stimulation of human mammary carcinoma cell proliferation by human growth hormone. *Exp Cell Res*, 1999. **250**(1): p. 35-50.
96. Zhu, T., et al., Oncogenic transformation of human mammary epithelial cells by autocrine human growth hormone. *Cancer research*, 2005. **65**(1): p. 317-324.
97. Bougen, N.M., et al., Autocrine human growth hormone reduces mammary and endometrial carcinoma cell sensitivity to mitomycin C. *Oncol Rep*, 2011. **26**(2): p. 487-93.
98. Mojarrad, M., et al., Autocrine human growth hormone expression leads to resistance of MCF-7 cells to tamoxifen. *Med Oncol*, 2010. **27**(2): p. 474-80.
99. Chen, Y.J., et al., Autocrine human growth hormone stimulates the tumor initiating capacity and metastasis of estrogen receptor-negative mammary carcinoma cells. *Cancer Lett*, 2015. **365**(2): p. 182-9.
100. Zatelli, M.C., et al., Growth hormone excess promotes breast cancer chemoresistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2009. **94**(10): p. 3931-3938.
101. Minoia, M., et al., Growth hormone receptor blockade inhibits growth hormone-induced chemoresistance by restoring cytotoxic-induced apoptosis in breast cancer cells independently of estrogen receptor expression. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2012. **97**(6): p. E907-E916.
102. Zekri, A., et al., Autocrine human growth hormone increases sensitivity of mammary carcinoma cell to arsenic trioxide-induced apoptosis. *Molecular and cellular endocrinology*, 2013. **377**(1): p. 84-92.
103. Touw, I.P., et al., Signaling mechanisms of cytokine receptors and their perturbances in disease. *Molecular and cellular endocrinology*, 2000. **160**(1): p. 1-9.
104. Green, H., M. Morikawa, and T. Mxon, A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation*, 1985. **29**(2): p. 195-198.
105. Lanning, N.J. and C. Carter-Su, Recent advances in growth hormone signaling. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2006. **7**(4): p. 225-235.
106. Smit, L.S., et al., Molecular events in growth hormone-receptor interaction and signaling. *Comprehensive Physiology*, 1999.
107. Zhu, T., et al., Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cellular signalling*, 2001. **13**(9): p. 599-616.
108. Giacosa, A., et al., Can nausea and vomiting be treated with ginger extract. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015. **19**(7): p. 1291-6.
109. Costa, M. and P. Saldanha, Risk reduction strategies in breast cancer prevention. *European journal of breast health*, 2017. **13**(3): p. 103.
110. Curtis, R.E., et al., Risk of leukemia after chemotherapy and radiation treatment for breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 1992. **326**(26): p. 1745-1751.
111. Vidali, C., et al., FMECA Application to Intraoperative Electron Beam Radiotherapy Procedure As a Quality Method to Prevent and Reduce Patient's Risk in Conservative Surgery for Breast Cancer. *Frontiers in medicine*, 2017. **4**: p. 138.
112. Slamon, D.J., et al., Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine*, 2001. **344**(11): p. 783-792.
113. Di Maio, M., et al., Patient-reported outcomes in the evaluation of toxicity of anticancer treatments. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2016. **13**(5): p. 319-325.
114. Lu, C.-S., et al., Chemotherapeutics-induced Oct4 expression contributes to drug resistance and tumor recurrence in bladder cancer. *Oncotarget*, 2017. **8**(19): p. 30844.
115. Locker, G., Hormonal therapy of breast cancer. *Cancer treatment reviews*, 1998. **24**(3): p. 221-240.
116. Group, E.B.C.T.C., Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet*, 2005. **365**(9472): p. 1687-1717.
117. Allegra, J.C., et al., Estrogen receptor status: an important variable in predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *European Journal of Cancer* (1965), 1980. **16**(3): p. 323-331.
118. Rose, C., et al., An open randomised trial of second-line endocrine therapy in advanced breast cancer: comparison of the aromatase inhibitors letrozole and anastrozole. *European Journal of Cancer*, 2003. **39**(16): p. 2318-2327.
119. Kim, M.-S., H.-J. Kang, and A. Moon, Inhibition of invasion and induction of apoptosis by curcumin in H-ras-transformed MCF10A human breast epithelial cells. *Archives of pharmacol research*, 2001. **24**(4): p. 349-354.
120. Goel, A., A.B. Kunnumakkara, and B.B. Aggarwal, Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochemical pharmacology*, 2008. **75**(4): p. 787-809.
121. Panda, A.K., et al., New insights into therapeutic activity and anticancer properties of curcumin. *Journal of Experimental Pharmacology*, 2017. **9**: p. 31.
122. Hasima, N. and B.B. Aggarwal, Cancer-linked targets modulated by curcumin. *International journal of biochemistry and molecular biology*, 2012. **3**(4): p. 328.
123. Gupta, S.C., et al., Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Natural product reports*, 2011. **28**(12): p. 1937-1955.

124. Devassy, J.G., I.D. Nwachukwu, and P.J. Jones, Curcumin and cancer: barriers to obtaining a health claim. *Nutrition reviews*, 2015. **73**(3): p. 155-165.
125. Jiao, Y., et al., Curcumin, a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, is a biologically active iron chelator. *Blood*, 2009. **113**(2): p. 462-469.
126. Zheng, J., et al., Spices for prevention and treatment of cancers. *Nutrients*, 2016. **8**(8): p. 495.
127. Ren, J., et al., Chabamide induces cell cycle arrest and apoptosis by the Akt/MAPK pathway and inhibition of P-glycoprotein in K562/ADR cells. *Anti-cancer drugs*, 2015. **26**(5): p. 498-507.
128. Jung, K.T. and K.J. Lim, Curcumin, COX-2, and Protein p300/CBP. *The Korean journal of pain*, 2014. **27**(4): p. 365-366.
129. Shishodia, S., Molecular mechanisms of curcumin action: gene expression. *Biofactors*, 2013. **39**(1): p. 37-55.
130. Conney, A.H., et al., Inhibitory effect of curcumin and some related dietary compounds on tumor promotion and arachidonic acid metabolism in mouse skin. *Advances in enzyme regulation*, 1991. **31**: p. 385-396.
131. Menon, L.G., R. Kuttan, and G. Kuttan, Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. *Cancer letters*, 1999. **141**(1): p. 159-165.
132. Kizhakkayil, J., et al., Modulation of curcumin-induced Akt phosphorylation and apoptosis by PI3K inhibitor in MCF-7 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 2010. **394**(3): p. 476-481.
133. Rao, C.V., et al., Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer research*, 1995. **55**(2): p. 259-266.
134. Koozpar, Z.K., et al., Anticancer activity of curcumin on human breast adenocarcinoma: role of Mcl-1 gene. *Iranian journal of cancer prevention*, 2015. **8**(3).
135. Ströfer, M., W. Jelkmann, and R. Depping, Curcumin decreases survival of Hep3B liver and MCF-7 breast cancer cells. *Strahlentherapie und Onkologie*, 2011. **187**(7): p. 393-400.
136. Kim, J.-M., et al., Curcumin suppresses the TPA-induced invasion through inhibition of PKC α -dependent MMP-expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Phytomedicine*, 2012. **19**(12): p. 1085-1092.
137. Huang, H.-C., C.-L. Lin, and J.-K. Lin, 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- β -D-glucose, quercetin, curcumin and lycopene induce cell-cycle arrest in MDA-MB-231 and BT474 cells through downregulation of Skp2 protein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2011. **59**(12): p. 6765-6775.
138. Panda, A., et al., Intratumoral immune landscape: immunogenicity to tolerogenicity. *Austin J Clin Immunol*, 2015. **2**(1): p. 1025.
139. Lowe, S.W. and A.W. Lin, Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(3): p. 485-495.
140. Avasarala, S., et al., Curcumin modulates the inflammatory response and inhibits subsequent fibrosis in a mouse model of viral-induced acute respiratory distress syndrome. *PloS one*, 2013. **8**(2): p. e57285.
141. Aggarwal, S., et al., Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I κ B α kinase and Akt activation. *Molecular pharmacology*, 2006. **69**(1): p. 195-206.
142. Maheshwari, R.K., et al., Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life sciences*, 2006. **78**(18): p. 2081-2087.
143. Sharma, R., A. Gescher, and W. Steward, Curcumin: the story so far. *European journal of cancer*, 2005. **41**(13): p. 1955-1968.
144. HSIEH, C.-Y., Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer research*, 2001. **21**: p. 2895-2900.
145. Li, L., et al., Nuclear factor- κ B and I κ B kinase are constitutively active in human pancreatic cells, and their down-regulation by curcumin (diferuloylmethane) is associated with the suppression of proliferation and the induction of apoptosis. *Cancer*, 2004. **101**(10): p. 2351-2362.
146. Dhillon, N., et al., Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 2008. **14**(14): p. 4491-4499.
147. Sharma, R.A., et al., Phase I clinical trial of oral curcumin. *Clinical Cancer Research*, 2004. **10**(20): p. 6847-6854.
148. Sharma, R.A., et al., Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 2001. **7**(7): p. 1894-1900.
149. Kurzrock, R. and L. Li, Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology*, 2005. **23**(16_suppl): p. 4091-4091.
150. Lao, C.D., et al., Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC complementary and alternative medicine*, 2006. **6**(1): p. 10.
151. Bayet-Robert, M., et al., Phase I dose escalation trial of docetaxel plus curcumin in patients with advanced and metastatic breast cancer. *Cancer biology & therapy*, 2010. **9**(1): p. 8-14.
152. Kanai, M., et al., A phase I/II study of gemcitabine-based chemotherapy plus curcumin for patients with gemcitabine-resistant pancreatic cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2011. **68**(1): p. 157-164.
153. Hamasaki, M., et al., Azaspirane (NN-diethyl-8, 8-dipropyl-2-azaspiro [4.5] decane-2-propanamine) inhibits human multiple myeloma cell growth in the bone marrow milieu in vitro and in vivo. *Blood*, 2005. **105**(11): p. 4470-4476.
154. Badger, A.M., et al., Induction of non-specific suppressor cells in normal Lewis rats by a novel azaspirane SK&F 105685. *Journal of autoimmunity*, 1990. **3**(4): p. 485-500.
155. Tassone, P., et al., A clinically relevant SCID-hu in vivo model of human multiple myeloma. *Blood*, 2005. **106**(2): p. 713-716.

156. Faderl, S., et al., Atiprimod blocks phosphorylation of JAK-STAT and inhibits proliferation of acute myeloid leukemia (AML) cells. *Leukemia research*, 2007. **31**(1): p. 91-95.
157. Munshi, C., et al., In vitro and in vivo activity of atiprimod (NN-diethyl-8, 8-dipropyl-2-azaspiro.
158. Amit-Vazina, M., et al., Atiprimod blocks STAT3 phosphorylation and induces apoptosis in multiple myeloma cells. *British journal of cancer*, 2005. **93**(1): p. 70-80.
159. Quintás-Cardama, A., et al., Preclinical characterization of atiprimod, a novel JAK2 AND JAK3 inhibitor. *Investigational new drugs*, 2011. **29**(5): p. 818-826.
160. Hideshima, T., et al., Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene*, 2001. **20**(42): p. 5991-6000.
161. Tu, Y., A. Gardner, and A. Lichtenstein, The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. *Cancer Research*, 2000. **60**(23): p. 6763-6770.
162. Klein, B., et al., Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood*, 1995. **85**(4): p. 863-872.
163. Wang, M., et al., Atiprimod inhibits the growth of mantle cell lymphoma in vitro and in vivo and induces apoptosis via activating the mitochondrial pathways. *Blood*, 2007. **109**(12): p. 5455-62.
164. Choudhari, S.R., et al., Deactivation of Akt and STAT3 signaling promotes apoptosis, inhibits proliferation, and enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to an anticancer agent, Atiprimod. *Mol Cancer Ther*, 2007. **6**(1): p. 112-21.
165. Faderl, S., et al., Atiprimod blocks phosphorylation of JAK-STAT and inhibits proliferation of acute myeloid leukemia (AML) cells. *Leuk Res*, 2007. **31**(1): p. 91-5.
166. Shailubhai, K., et al., Atiprimod is an inhibitor of cancer cell proliferation and angiogenesis. *J Exp Ther Oncol*, 2004. **4**(4): p. 267-79.
167. Hamasaki, M., et al., Azaspirane (N-N-diethyl-8,8-dipropyl-2-azaspiro [4.5] decane-2-propanamine) inhibits human multiple myeloma cell growth in the bone marrow milieu in vitro and in vivo. *Blood*, 2005. **105**(11): p. 4470-6.
168. Fulda, S., Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *International journal of cell biology*, 2010. **2010**.
169. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
170. Halazonetis, T.D., V.G. Gorgoulis, and J. Bartek, An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *science*, 2008. **319**(5868): p. 1352-1355.
171. Plati, J., O. Bucur, and R. Khosravi-Far, Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of cellular biochemistry*, 2008. **104**(4): p. 1124-1149.
172. Bauer, J.H. and S.L. Helfand, New tricks of an old molecule: lifespan regulation by p53. *Aging cell*, 2006. **5**(5): p. 437-440.
173. Liepinsh, E., et al., NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *The EMBO Journal*, 1997. **16**(16): p. 4999-5005.
174. Schneider, P. and J. Tschopp, Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica acta Helvetiae*, 2000. **74**(2): p. 281-286.
175. O'Brien, M.A. and R. Kirby, Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of veterinary emergency and critical care*, 2008. **18**(6): p. 572-585.
176. Wong, R.S., Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2011. **30**(1): p. 87.
177. Szegezdi, E., U. Fitzgerald, and A. Samali, Caspase-12 and ER-Stress-Mediated Apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003. **1010**(1): p. 186-194.
178. Ghobrial, I.M., T.E. Witzig, and A.A. Adjei, Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2005. **55**(3): p. 178-194.
179. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, Cell death: critical control points. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 205-219.
180. Tsujimoto, Y., et al., Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t (14; 18) chromosome translocation. *Science*, 1984. **226**: p. 1097-1100.
181. Reed, J.C. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. in *Seminars in hematology*. 1997.
182. Kroemer, G., L. Galluzzi, and C. Brenner, Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews*, 2007. **87**(1): p. 99-163.
183. LaCasse, E., et al., IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, 2008. **27**(48): p. 6252-6275.
184. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry*, 1999. **68**(1): p. 383-424.
185. Torre, L.A., et al., Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2015. **65**(2): p. 87-108.
186. Forouzanfar, M.H., et al., Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *The lancet*, 2011. **378**(9801): p. 1461-1484.
187. Crew, K.D., et al., How do we increase uptake of tamoxifen and other anti-estrogens for breast cancer prevention? *npj Breast Cancer*, 2017. **3**(1): p. 20.
188. Lakind, J.S., A.A. Wilkins, and M.N. Bates, Human breast biomonitoring and environmental chemicals: use of breast tissues and fluids in breast cancer etiologic research. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 2007. **17**(6): p. 525-540.

189. Archibeque-Engle, S.L., et al., Comparison of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast adipose tissue and serum. *Journal of toxicology and environmental health*, 1997. **52**(4): p. 285-293.
190. Mitri, Z., T. Constantine, and R. O'Regan, The HER2 receptor in breast cancer: pathophysiology, clinical use, and new advances in therapy. *Chemotherapy research and practice*, 2012. **2012**.
191. Slavin, T.P., et al., The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk. *NPJ breast cancer*, 2017. **3**(1): p. 22.
192. Choi, J.H., et al., Phospholipase C γ 1 negatively regulates growth hormone signalling by forming a ternary complex with Jak2 and protein tyrosine phosphatase-1B. *Nature cell biology*, 2006. **8**(12): p. 1389-1397.
193. Osterstock, G., et al., Somatostatin triggers rhythmic electrical firing in hypothalamic GHRH neurons. *Scientific reports*, 2016. **6**.
194. Brooks, A.J. and M.J. Waters, The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications. *Nature Reviews Endocrinology*, 2010. **6**(9): p. 515-525.
195. Chhabra, Y., M.J. Waters, and A.J. Brooks, Role of the growth hormone-IGF-1 axis in cancer. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 2011. **6**(1): p. 71-84.
196. Chhabra, Y., et al., A growth hormone receptor SNP promotes lung cancer by impairment of SOCS2-mediated degradation. *Oncogene*, 2017.
197. Zhu, Z., et al., p44/42 MAP kinase-dependent regulation of catalase by autocrine human growth hormone protects human mammary carcinoma cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene*, 2005. **24**(23): p. 3774-85.
198. Minoia, M., et al., Growth hormone receptor blockade inhibits growth hormone-induced chemoresistance by restoring cytotoxic-induced apoptosis in breast cancer cells independently of estrogen receptor expression. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012. **97**(6): p. E907-16.
199. Chuang, S., et al., Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(2): p. 331-335.
200. Bharti, A.C., et al., Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor- κ B and I κ B α kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood*, 2003. **101**(3): p. 1053-1062.
201. Uddin, S., et al., Curcumin suppresses growth and induces apoptosis in primary effusion lymphoma. *Oncogene*, 2005. **24**(47): p. 7022-7030.
202. Choudhuri, T., et al., Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(20): p. 20059-20068.
203. Park, M.-J., et al., Curcumin inhibits cell cycle progression of immortalized human umbilical vein endothelial (ECV304) cells by up-regulating cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, p27KIP1 and p53. *International journal of oncology*, 2002. **21**(2): p. 379-383.
204. Nelson, K.M., et al., The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *J Med Chem*, 2017. **60**(5): p. 1620-1637.
205. Berrak, O., et al., The inhibition of PI3K and NF κ B promoted curcumin-induced cell cycle arrest at G2/M via altering polyamine metabolism in Bcl-2 overexpressing MCF-7 breast cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 2016. **77**: p. 150-60.
206. Zhu, Y. and S. Bu, Curcumin Induces Autophagy, Apoptosis, and Cell Cycle Arrest in Human Pancreatic Cancer Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017. **2017**: p. 5787218.
207. Amit-Vazina, M., et al., Atiprimod blocks STAT3 phosphorylation and induces apoptosis in multiple myeloma cells. *Br J Cancer*, 2005. **93**(1): p. 70-80.
208. Sulaiman, N.B., et al., An azaspirane derivative suppresses growth and induces apoptosis of ER-positive and ER-negative breast cancer cells through the modulation of JAK2/STAT3 signaling pathway. *Int J Oncol*, 2016. **49**(3): p. 1221-9.
209. Patel, P.B., V.R. Thakkar, and J.S. Patel, Cellular Effect of Curcumin and Citral Combination on Breast Cancer Cells: Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest. *J Breast Cancer*, 2015. **18**(3): p. 225-34.
210. Sun, L., et al., Combination of atiprimod and the proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis of mantle cell lymphoma in vitro and in vivo. *Leuk Res*, 2012. **36**(3): p. 363-8.
211. Bava, S.V., et al., Sensitization of taxol-induced apoptosis by curcumin involves down-regulation of nuclear factor- κ B and the serine/threonine kinase Akt and is independent of tubulin polymerization. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(8): p. 6301-6308.
212. Jin, W., et al., Roles of the PI-3K and MEK pathways in Ras-mediated chemoresistance in breast cancer cells. *British journal of cancer*, 2003. **89**(1): p. 185-191.
213. Miller, M., et al., Curcumin (diferuloylmethane) inhibits cell proliferation, induces apoptosis, and decreases hormone levels and secretion in pituitary tumor cells. *Endocrinology*, 2008. **149**(8): p. 4158-67.
214. Schaaf, C., et al., Curcumin acts as anti-tumorigenic and hormone-suppressive agent in murine and human pituitary tumour cells in vitro and in vivo. *Endocr Relat Cancer*, 2009. **16**(4): p. 1339-50.
215. Jagetia, G.C. and B.B. Aggarwal, "Spicing up" of the immune system by curcumin. *J Clin Immunol*, 2007. **27**(1): p. 19-35.

Web siteleri

¹<https://theheartysoul.com/stress-hormones-prescribed-by-doctors--breast-cancer-harder-to-treat/>

²<https://www.medical-solicitors.com/medical-claims/cancer-cases/breast-cancer-claims/>

³https://www.physio-pedia.com/Physiotherapy_and_cancer_treatment

⁴<https://breakingmuscle.com/fitness/growth-and-longevity-the-enigma-and-potential-of-igf-1>

⁵ http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=Growth_Hormone_Signaling

⁶<http://www.goldvitamins.com/drcell.htm>

⁷<http://www.mdpi.com/2072-6651/2/1/128/htm>

⁸<https://www.creative-biostructure.com/custom-mempro%E2%84%A2-b-cell-lymphoma-2-bcl-2-family-66.htm>

⁹<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

¹⁰<https://www.nature.com/articles/nrc.2016.58>



EKLER

Tablo 8. Kullanılan cihazların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
UV-Transluminatör	GelDOC	BioRad
Santrifüj	5417R	Eppendorf
Spin mini spin plus	SN0708	LabNet
Yatay elektroforez sistemi	Gel XL ultra V-2	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EH52836	Thermo
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo
Mikropipet (200µl-1000µl)	T27274	Thermo
Otoklav	OTO32	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Distile Su Cihazı	TANKPE030	Millipore Direct Q-5UV
pH Metre	N315	SEM/Mettler Toledo
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
Dry heat sterilizer	FN120	Nüve
Spektrofotometre	Ultraspec 2100 pro	Biosciences
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Inverted Mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
İnkübatör	Heracell	Thermo
Floraslan Mikroskobu	Model: 1X71	Olympus
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer, U725 innova	New Brunswick Scientific

Elektroforez Aletleri	165-8000 / 170-4155	BioRad
Facs Flow Cihazı	AC6531180147	BD ACURI C6
HPLC Cihazı	120 Infinity Series	Afilent Technologies

Tablo 9. Hücre kültürü donanımları

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
75cm ² hücre büyütme kapları	90076	TPP
25cm ² hücre büyütme kapları	90026	TPP
100mm hücre büyütme kapları	93100	TPP
60mm hücre büyütme kapları	93060	TPP
Steril pipetler (5ml)	94005	TPP
Steril pipetler (10ml)	94010	TPP
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPP
Enjektör seti	21G Yeşil uç iğneli	ASTRAJECT
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Fetal Bovine Serum	10500-064	Gibco
DMEM Medium	41966-029	Gibco
MCF-7 hücreleri	61062004	ATCC
MDA-MB-231 hücreleri	61093072	ATCC

Tablo 10. Kullanılan kimyasalların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Etanol	CAS 64-17-5	ALKO MED
Saf Etanol	32221	SIGMA-ALDRICH
Metanol	24229	SIGMA-ALDRICH
İzopropanol	K44518295 321	MERCK
2-merkaptetanol	S4805940 517	MERCK
Akrilamid /Bis-Akrilamid 30% çözelti	A9099	SIGMA-ALDRICH

Amonyum persülfat	A2941	Applichem
Coomassie Blue Belirteci	A3480	Applichem
DMSO	K46505343 517	MERCK
DMSO	D2650	SIGMA-ALDRICH
EDTA	A2937	Applichem
DiOC6 Boya	2129966	Fluka
DCFH-DA Boya	C6827	Invitrogen
4',6-Diamidino-2 Phenylindole, Dihydrochloride	D1306	Thermo Scientific
PI Boya	P4170-100MG	SIGMA-ALDRICH
Fetal Bovine Serum (FBS)	P290310	Pan Biotech
Laemli Tamponu	S3401-1V	SIGMA
p-Coumaric Asid	C9008-1G	SIGMA-ALDRICH
Luminol	A2185	Applichem
MTT Solüsyonu	M2128-5G	SIGMA-ALDRICH
Phosphate buffered saline (PBS)	BE17-51-5F	LONZA
Sığır Serum Albumin (PSA)	A2153-10G	SIGMA-ALDRICH
SDS (Sodyum dedosil sülfat)	UN1888	Applichem
Protein İzolasyonu Tamponu	78501	Thermo
Page Ruller Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fermentas
Agaroz	A9539	SIGMA-ALDRICH
Tris Baz	648310	CALBIOCHEM
Asetik Asid	27225	SIGMA-ALDRICH
Ethidium Bromide	E1510	SIGMA-ALDRICH
Tris-HCl	648317	CALBIOCHEM
1 kb Marker	SM1163	Fermentas
6X yükleme Tamponu	R0631	Fermentas
Amonyum Asetat	1,110115,1000	MERCK
Fenol Kloroform	A2279,0250	Applichem
Curcumin	C1386-10G	SIGMA-ALDRICH
Sodyum Klorür	A2941	Applichem
Tween 20	S6740684 348	MERCK

TEMED	A1148,0100	Applichem
Yağsız Süt Tozu	SC-2325	Santa Cruz Biotechnology
Glisin	3570	CALBIOCHEM
H ₂ O ₂ Hidrojen peroksi	K39218400838	MERCK
ExPrime Taq PCR Kiti	G-4000	Genet Bio
Trizol	10296010	Thermo
Tripure	11 667 165 001	Roche
Rnase Free Water	42480093	QIAGEN
iScript cDNA Sentez Kiti	1708891	Bio Rad
Human BH ELISA	GR180572-1	Abcam
Millipore Falcon Centrifugal Filters	4FC901024	MERCK
Neomisin	G8168	SIGMA-ALDRICH
Invasion Chamber	354483	BD Bioscience
Super Block T20 Blocking Buffer	37536	Thermo
FuGENE® 6 Transfection Reagent	E2692	Promega
Ponceau Read Belirteci	A1405	Applichem
Hidroklorik Asit	K43804717 239	MERCK
Kloroform	UN1888	Applichem
Kristal Viyole	FN1048735	MERCK

Tablo 11. %12'lik SDS-PAGE jel içeriği

Adı	Alt Jel	Üst Jel
Distile su	3,4 ml	3,075 ml
Tris-HCl	2,5ml (1,5M,pH: 8,8)	1,125ml (0,5M, pH: 6,8)
%10 SDS	0,1 ml	0,05ml
Akrilamid/Bis-Akrilamid	4 ml	0,67 ml
Amonyum Persulfat (APS)	0,05 ml	0,025ml
TEMED	0,005ml	0,005ml
TOPLAM	10,005 ml	5,05ml

ÖZGEÇMİŞ

İsim: BUSE ÖZAKALTUN

Cinsiyet: Kadın

Doğum Tarihi: 23.01.1991

Medeni Durum: Bekar

Uyruk: Türk

Adress: Yeni Mahalle, Havuzbaşı Çeşme Sokak,

Rami Konakları B blok No:18 Rami /Eyüp/ İstanbul

Telefon: Ev (212) 563-37-92 GSM. (536) 861-28-71

E-mail : buse.ozakaltun@gmail.com



EĞİTİM

2015/ 2018: Yüksek Lisans - Kültür Üniversitesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

2015/ 2016: Yüksek Lisans - İstanbul Üniversitesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü - Özel Öğrenci

2014/ - : Lisans - İstanbul Üniversitesi İşletme Bölümü

2009/ 2013: Lisans - Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

2005/ 2009: Lise - Oğuzkaan Koleji

1996/ 2005: İlkokul / Ortaokul - Tantavi İlköğretim Okulu

EK EĞİTİM BİLGİLERİ

14.06.11 - 19.08.11: CAPITAL SCHOOL OF ENGLISH - İngilizce Dil Kursu

Birleşik Krallık - İngiltere - Bournemouth

13.01.14 - - : Amerikan Kültür Derneği Dil Okulları - İngilizce Kursu Beşiktaş

STAJLAR

31.01.12 - 17.02.12: T.C Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu – Yenibosna -

Biyoloji Departmanı

03.09.12 - 20.10.12: Genetiks Genetik Tanı Merkezi - Beşiktaş

BİLGİSAYAR BİLGİLERİ

MS office programs; Word, Excel, PowerPoint, Outlook , Image Lab, Endnote, İmagej, Graphpad

DİL BİLGİLERİ

İngilizce: İleri seviyede

İspanyolca: Başlangıç seviyesinde

SERTİFİKALAR

Haziran 2009: Oğuzkaan Koleji Başarı Belgesi

10 - 11.04. 2010: Boğaziçi Üniversitesi Bilim Kulübü "Moleküler Biyoloji ve Genetik Haftasonu 5 "

24 - 26. 02.2012: Özel Balat Orahayim Hastanesi Genetik Konferansı

07.03.2015: İstanbul Üniversitesi "9. İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kış Okulu’’

14-15.11.2015: Haliç Üniversitesi 1.Adli Bilimler Sempozyumu

28.03.2016: Boğaziçi Ünivertsitesi Bilim Kulübü "Moleküler Biyoloji ve Genetik Haftasonu 10 "

28.03.2016: Vizyon OSGB/Eser ALTUNHAN - Temel İş Sağlığı Ve Güvenliği Eğitimi
11-12.05.2016 : Vizyon

OSGB/Eser ALTUNHAN - Acil Durum Planları Eğitimi

29.03.2017: Gün İlkyardım Eğitim Merkezi - T.C. İstanbul Valiliği İl Sağlık Müdürlüğü, İlkyardımcı Serfitikası / İlkyardımcı Ehliyeti

22.04.2017: Doç. Dr. Neşe Buket AKSU - Hitabet Ve Konuşma Teknikleri Eğitimi

22.04.2017: Arzu ATASOY - Yaşam Becerileri Programı Eğitmen Sertifikası

25.10.2017: İstanbul Protein Araştırma Geliştirme ve İnovasyon Uygulama ve Araştırma Merkezi / Üsküdar Üniversitesi – İleri Kromatografik Yöntemler Uygulamalı Eğitimi

27.01.2018: Nesim LEVİ – Proje Yönetimi Eğitimi

28.01.2018: Doç. Dr. N. Buket AKSU – Çatışma Teknikleri ve İkna Eğitimi

28.01.2018: Tayfun TÜRKALP - Etkili Dinleme ve Geri Bildirim Eğitimi

SOSYAL AKTİVİTELER & HOBİLER

Değişik ülkelere seyahatler

Sosyal sorumluluk projeleri (Kahramanmaraş Göksun İlköğretim Okulu ziyareti; organizasyon görevlisi, Sevgi İzi projesi görevlisi, Kutu kutu mutluluk projesi görevlisi)

Bilim dergileri abonelikleri

Ebru sanatı

Karikatür, El Sanatları, Resim (kara kalem, scarlet graffiti, origami, ahşap boyama)

KULÜP VE ÜYELİKLER

Yeşilay üyeliği

Türk Eğitim Vakfı Üyeliği

Toplum Gönüllüleri Vakfı Üyeliği

Haliç Üniversitesi Gönüllülük Kulübü üyeliği

Haliç Üniversitesi Genetik Kulübü üyeliği

Haliç Üniversitesi Bilim ve Teknik Kulübü üyeliği

Haliç Üniversitesi Sosyal Sorumluluk Kulübü üyeliği

Haliç Üniversitesi Spor Kulübü üyeliği

REFERANSLAR

Prof.Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL

İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, MOBİGEN Bölüm Başkanı, Öğretim Görevlisi
Ataköy Yerleşkesi, E5 Karayolu Londra Asfaltı Üzeri, 34156, Bakırköy, İST., TR.

T : 0 212 498 43 47 - n.palavanunsal@iku.edu.tr

Prof.Dr. Emel BOZKAYA

T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik - Öğretim Görevlisi

Merkez Mah. Cendere Cad. No:11 Kağıthane-İstanbul

T : 0543 283 53 94 / (0212) 924 24 44 – (0212) 999 78 52 - emelbozkaya@halic.edu.tr

Uz.Dr. Ömer MÜSLÜMANOĞLU

T.C. Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu

Biyoloji İhtisas Dairesi Başkanı

T : 0505 294 96 62 – 0212 454 15 00 dahili 2095 - omer.muslumanoglu@gmail.com

Dr. Y. Hakan ÖZON

Genetik Genetik Tanı Merkezi

Moleküler Genetik Bölüm Sorumlusu ve Finans Direktörü

Gayrettepe Mah. Bahar Sok. No 4A 34349 Beşiktaş – İSTANBUL

T: 0532 294 64 05 - 0 (212) 275 70 20 - yhakanozon@genetiks.com.tr

Aybars TÜRKER

T.C. Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu

Biyoloji İhtisas Dairesi Uzmanı - Laboratuvar Sorumlusu

T : 0532 256 41 10 - aybarsturker@gmail.com

Dr. Mehmet Ali TÜFEKÇİ

Memorial Şişli Hastanesi Tüp Bebek ve Üreme Genetiği Merkezi

Embriyolog

Piyale Paşa Bulvarı 34385 Okmeydanı - Şişli / İstanbul / Türkiye

T: 0532 318 16 15 - 0 212 314 66 66 (Pbx) 3203 - malitufekci@gmail.com