

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİAMİN METABOLİZMASI VE OTOKRİN BÜYÜME HORMONU
SİNYAL YOLAĞININ CURCUMİN UYGULANAN MCF-7 VE MDA-MB-231
MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE TERAPOTİK ROLÜNÜN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve ÇELİK
(1409241001)

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

Haziran - 2016

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİAMİN METABOLİZMASI VE OTOKRİN BÜYÜME HORMONU
SİNYAL YOLAĞININ CURCUMİN UYGULANAN MCF-7 VE MDA-MB-231
MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE TERAPOTİK ROLÜNÜN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve ÇELİK
(1409241001)

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

Juri Üyeleri: Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL

Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

Doç. Dr. Fatemah BAHADORİ

Haziran - 2016

ÖNSÖZ

Tez çalışmamı tamamlama sürecinde en başından itibaren 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,

Tüm lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca akademik alanda sahip oldukları bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan ve desteklerini esirgemeyen çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL, Sayın Doç. Dr. Elif Damla ARISAN ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Pınar OBAKAN'a,

Akademik hayatımda bana destek olan Özge BERRAK ve Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ'a,

Hayatıma girdiği andan itibaren dünyamı değiştiren, özel hayatımdaki varlığı ile hissettirdiği huzur ve mutluluğun yanısıra tez çalışmalarımda da desteğini esirgemeyen, hem iyi hem de kötü zamanımda hep yanımda olan Furkan KAYSİN'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca özellikle laboratuvar çalışmalarını birlikte gerçekleştirdiğim, her zaman yanımda olduğunu hissettiren ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşım Merve UĞUR'a,

Yer aldığımız çalışmalarda ekip ruhu ile her zaman bir arada olduğumuzu hissettiren Zeynep Begüm DURDU ve Recep GENÇ'e,

Hem akademik hem de özel hayatımda bana destek olan Ayça Ece NEZİR'e,

Hayatım boyunca duydukları sevgi ve güveni bana hissettiren, ne olursa olsun desteklerini esirgemeyen ve yanımda olan, sonsuz yardımları ve sabırları için sevgili annem Selma ÇELİK, babam Tarık ÇELİK, abim Emir ÇELİK ve ikizim Ahmet Onur ÇELİK'e en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın gerçekleşmesi için finansal destek sağlayan ve bursiyer kapsamında görev aldığım TÜBİTAK 1001-113Z791 nolu projeye ve deneysel süreçte İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarlarına vermiş oldukları destek ve olanaklar için teşekkürlerimi sunarım .

Haziran, 2016

Merve ÇELİK

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM I.....	1
1. GİRİŞ	1
2. AMAÇ.....	3
BÖLÜM II.....	5
3. GENEL BİLGİLER.....	5
3.1. MEME KANSERİ	5
3.1.1. Epidemiyoloji.....	7
3.1.1.1. Yaş ve üreme ile ilgili faktörler	7
3.1.1.2. Ailesel geçmiş	8
3.1.1.3. Yaşam tarzı.....	8
3.1.1.4. Çevresel faktörler	8
3.2. BÜYÜME HORMONU (GH).....	9
3.2.1. Sentezi, Salınımı ve Fonksiyonu.....	9
3.2.2. Büyüme hormonun meme kanseri gelişimi üzerine etkisi	11
3.3. TEDAVİ YÖNTEMLERİ.....	11
3.3.1. Cerrahi yöntem.....	11
3.3.2. Radyoterapi	12
3.3.3. Kemoterapi	12
3.3.4. Hormonal terapi	12
3.3.5. Curcumin.....	13
3.3.6. Curcumin ve meme kanseri.....	14
3.3.7. Curcumin ve büyüme hormonu.....	15
3.4. HÜCRE SAĞKALIM YOLAKLARI	16

3.4.1.	JAK/STAT Sinyal Yolağı	16
3.4.2.	PI3K/Akt Sinyal Yolağı	18
3.4.3.	MAPK Sinyal Yolağı	19
3.4.4.	Onkogenler	20
3.5.	İNVAZYON ve METASTAZ	21
3.5.1.	Matriks Metalloproteinazlar (MMP).....	21
3.5.2.	Epitel Mezenkimal Geçiş (EMT).....	21
3.6.	NF-κB SİNYAL YOLAğI	23
3.7.	POLİAMİN METABOLİZMASI.....	24
3.8.	APOPTOZ	26
3.8.1.	İçsel Apoptotik Sinyal Yolağı	26
3.8.2.	Dışsal Apoptotik Sinyal Yolağı	27
BÖLÜM III		29
4.	MATERYAL ve METOT	29
4.1.	KULLANILAN MATERYALLER.....	29
4.1.1.	Kullanılan Cihazlar	29
4.1.2.	Hücre Kültürü Donanımları	29
4.1.3.	Kullanılan Kimyasallar	29
4.1.4.	Kullanılan Tamponlar	29
5.	YÖNTEMLER	30
5.1.	Hücre Kültürü.....	30
5.2.	GH ELISA Tekniği	31
5.3.	Hücre Canlılığının Belirlenmesi	32
5.4.	Hücre Sağkalım Analizi	32
5.5.	Floresans Boyama	33
5.6.	Hücre Akış Sitometresinde PI Analiz	34
5.7.	Annexin V/PI Boyama	34

5.8.	Koloni Oluşum Analizi	35
5.9.	Yarı Akışkan Agar Yöntemi	35
5.10.	Yara İyileşmesi Yöntemi.....	35
5.11.	İnvazyon ve Metastaz Tayini	36
5.12.	Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Analizleri	36
5.13.	Total Protein İzolasyonu	37
5.14.	Bradford Protein Miktar Tayini	37
5.15.	İmmunoblotlama Yöntemi	38
5.16.	Poliamin Miktarlarının Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Tayini.....	40
BÖLÜM IV		41
6.	SONUÇLAR	41
6.1.	MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında GH,GHR, GHRH, GHRHR, Prolaktin ve IGF-1 anlatımı	41
6.2.	PC3.1-GH plazmiti aracılığı ile MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde otokrin GH anlatımının gösterilmesi	42
6.3.	MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında GH'nin biyolojik aktivitesi ve salınımının gösterilmesi	44
6.4.	Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında GH anlatımı üzerine etkisi	46
6.5.	Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkisi	47
6.6.	Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre sağkalımı üzerine etkisi.....	49
6.7.	Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında JAK/STAT sinyal yolağı üzerine etkisi	50
6.8.	Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre proliferasyon ve sağ kalım yolları üzerine etkisi	52

6.9.	Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında koloni formasyonu üzerine etkisi.....	55
6.10.	Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında koloni oluşumu üzerine etkisi	57
6.11.	Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında yara kapanma aktivitesi üzerine etkisi	60
6.12.	Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında invazyon ve metastaz üzerine etkisi.....	63
6.13.	Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında MMP'lerin anlatımı üzerine etkisi	66
6.14.	Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında EMT üzerine etkisi.....	69
6.15.	Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde NF- κ B sinyal yolağı üzerine etkisi	71
6.16.	Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında poliamin metabolizması üzerine etkisi	75
6.17.	Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında reaktif oksijen türleri (ROS) üzerine etkisi.....	78
6.18.	Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre döngüsü üzerine etkisi.....	86
6.19.	Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre ölümü üzerine etkisi.....	90
BÖLÜM V		99
7. TARTIŞMA		99
REFERANSLAR		111
EKLER.....		117
ÖZGEÇMİŞ		122
Merve ÇELİK.....		122

KISALTMALAR

APS:	Amonyum Persülfat
AZ:	Antizim
AZI:	Antizim İnhibitörü
Bcl-2:	B-hücre lenfoma 2
BH:	Bcl-2 homoloji bölgeleri
cDNA:	Komplementer DNA
CO₂:	Karbondioksit
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
DiOC₆:	3, 3'-diheksiloksakarbosianin iyodür
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
ER:	Östrojen Reseptörü
GH:	Büyüme Hormonu
H₂O₂:	Hidrojen Peroksit
HPLC:	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
MAPK:	Mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz
MAPKK:	MAP kinaz kinaz
MAPKKK:	MAP kinaz kinaz kinaz
MTT:	Metiltiazol difeniltetrazolyum bromür
NAC:	N-asetil sistein
ODC:	Ornitin dekarboksilaz
PA:	Poliamin
PAO:	Poliamin oksidaz
PARP:	Poli ADP riboz polimeraz
PBS:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PI:	Propidyum iyodür
PI3K:	Fosfotidilinositol-3 kinaz
PTEN:	Tümör baskılayıcı protein olan fosfataz ve tensin homolog
Put:	Putresin
PVDF:	Poliviniliden fluorid

ROS:	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR:	Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE:	SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SMO:	Spermin oksidaz
Spd:	Spermidin
Spm:	Spermin
SSAT:	Spermidin, spermin asetil transferaz
TBS:	Tris tamponlu tuz çözeltisi
TCA:	Trikloroasetik asit
TEMED:	Tetrametletilendiamin
TNF:	Tümör nekroz faktörü
TRAIL:	TNF ile ilişkisi apoptoz indükleyici ligand reseptör

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Meme kanserinin gen anlatımı açısından sınıflandırılması.	7
Tablo 2. RT-PCR’da kullanılan primerlerin optimum bağlanma sıcaklıkları. Forward: F, Reverse: R	37
Tablo 3. Çalışma kapsamında kullanılan meme kanseri hücre hatlarında GH, GHR, GHRH, GHRHR, Prolaktin ve IGF-1 anlatım durumlarının gösterilmesi.	41
Tablo 4. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında EMT markırlarının anlatım (Graff, J.R. et al, 1995, Hajra, K.M. et al 2002).	69
Tablo 5. Kullanılan cihazların listesi	117
Tablo 6. Hücre kültürü donanımları.....	118
Tablo 7. Kullanılan kimyasalların listesi	118
Tablo 8. %12’lik SDS-PAGE Jel içeriği.....	120

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Meme yapısı, LCIS ve DCIS oluşumu.	6
Şekil 2. GH'nin bulunduğu gen kümesi ve GH geni.	9
Şekil 3. Somatotrof hücrelerinde GH sentezi ve salınımı.....	10
Şekil 12. Curcuminin moleküler yapısı (42).	14
Şekil 4. GH/GHR/JAK/STAT sinyal yolağı.	17
Şekil 5. PI3K/Akt sinyal yolağı.	18
Şekil 6. MAPK sinyal yolağı.	19
Şekil 7. Proto-onkogenlerin transkripsiyonel regülasyonu	20
Şekil 9. Epitel ve mezenkimal hücre belirteçleri.	22
Şekil 8. NF-κB sinyal yolağı.....	24
Şekil 10. Poliamin metabolizması substratları ve görevli enzimler.	26
Şekil 11. İçsel ve dışsal apoptotik yolak.	28
Şekil 13. Çalışma kapsamında kullanılan MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının ışık mikroskobu görüntüleri.	42
Şekil 14. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde PC3.1-GH plazmiti aracılığı ile otokrin GH anlatımı artırılması.....	43
Şekil 15. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde GH'nin biyolojik aktivitesinin belirlenmesi.	44
Şekil 16. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde GH'nin biyolojik aktivitesi ve medyaya salınan GH miktarının belirlenmesi. P: Pellet, M: Medya	45
Şekil 17. MCF-7 GH+ ve MDA-MB-231 GH+ meme kanseri hücrelerinde artan dozlarda uygulanan curcuminin GH anlatımı üzerine etkisinin belirlenmesi.....	46
Şekil 18. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi.	48
Şekil 19. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin hücre sağkalımı üzerine etkisinin gösterilmesi.	49

Şekil 20. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin JAK/STAT sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi.	51
Şekil 21. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin PI3K/Akt sinyal yolu üzerine etkisinin gösterilmesi.	52
Şekil 22. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin MAPK sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi.	53
Şekil 23. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin onkogenler üzerine etkisinin gösterilmesi.	54
Şekil 24. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi.	55
Şekil 25. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi.	56
Şekil 26. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin yumuşak agarda koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi.	58
Şekil 27. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin yumuşak agarda koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi.	59
Şekil 28. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin yara kapanma aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.	61
Şekil 29. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin yara kapanma aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.	62
Şekil 30. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde 24 saat boyunca uygulanan curcuminin invazyon ve metastas üzerine etkisinin belirlenmesi.	63
Şekil 31. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde 48 saat boyunca uygulanan curcuminin invazyon ve metastas üzerine etkisinin belirlenmesi.	64
Şekil 32. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde 24 saat boyunca uygulanan curcuminin invazyon ve metastas üzerine etkisinin belirlenmesi.	65
Şekil 33. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde 48 saat boyunca uygulanan curcuminin invazyon ve metastas üzerine etkisinin belirlenmesi.	66
Şekil 34. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin MMP cDNA ve protein düzeylerine etkisinin gösterilmesi.	67
Şekil 35. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin MMP cDNA ve protein düzeylerine etkisinin gösterilmesi.	68

Şekil 36. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin EMT üzerine etkisinin gösterilmesi.....	70
Şekil 37. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin klasik NF-κB sinyal yolağı üzerine etkisinin belirlenmesi..	72
Şekil 38. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin alternatif NF-κB sinyal yolağı üzerine etkisinin belirlenmesi.	73
Şekil 39. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin NF-κB göçü üzerine etkisinin belirlenmesi.	74
Şekil 40. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcuminin poliamin metabolizması üzerine etkisinin gösterilmesi.	76
Şekil 41. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcuminin poliamin metabolizması üzerine etkisinin gösterilmesi.....	77
Şekil 42. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin ROS değişimi üzerine etkisinin gösterilmesi.....	79
Şekil 43. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin ROS değişimi üzerine etkisinin gösterilmesi.....	80
Şekil 44. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcumin ve NAC uygulamasının hücre canlılığı ve apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin gösterilmesi.	82
Şekil 45. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcumin ve NAC uygulaması sonrası ROS düzeylerinin gösterilmesi.....	
Şekil 46. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcumin ve NAC uygulamasının hücre canlılığı ve apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin gösterilmesi.	
Şekil 47. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcumin ve NAC uygulaması sonrası ROS düzeylerinin gösterilmesi.	
Şekil 48. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin hücre döngüsü üzerine etkisinin gösterilmesi.	86
Şekil 49. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcuminin G1/S geçişinde foksiyonel proteinlerin anlatımı üzerine etkisinin gösterilmesi.	87
Şekil 50. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin hücre döngüsü üzerine etkisinin gösterilmesi.	88

Şekil 51. MDA-MB-2317 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcuminin G1/S geçişinde fksiyonel proteinlerin anlatımı üzerine etkisinin gösterilmesi.	89
Şekil 52. Curcuminin MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre ölümü üzerine etkisinin gösterilmesi. Büyütme 10X.....	
Şekil 55. Curcuminin MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre ölümü üzerine etkisinin gösterilmesi. Büyütme 10X.....	
Şekil 53. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin V-PI bayama yöntemi ile gösterilmesi	93
Şekil 56. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin V-PI bayama yöntemi ile gösterilmesi	94
Şekil 54. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin içsel ve dışsal apoptotik yolak üzerine etkisinin gösterilmesi.....	96
Şekil 57. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin içsel ve dışsal apoptotik yolak üzerine etkisinin gösterilmesi	98

SEMBOL LİSTESİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
bç	: Baz çifti
cc	: Santimetre küp
cm	: Santimetre
cm²	: Santimetre kare
IC₅₀	: Yarım maksimum inhibitör konsantrasyonu
kDa	: Kilo Dalton
mA	: Mili amper
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
V	: Volt
Δψ_m	Mitokondri membran potansiyeli

ÖZET

Meme kanseri kadınlarda kanser kaynaklı ölümler arasında ikinci sırada olan kanser tipidir. Meme kanseri patogenezinin irdelenmesine bağlı olarak geliştirilen çoğu ilaç terapötik olma potansiyeli açısından önem arz etmektedir. Curcumin, anti-inflammatuar, anti-proliferatif, anti-oksidan ve anti-kanserojenik etkisi prostat, melanoma, kolon, servikal ve meme kanseri üzerinde gösterilmiştir. Postnatal dönemde hipofiz bezinden salınan, lipit, karbonhidrat ve protein metabolizmasını etkileyerek büyüme üzerinde etkisi olan büyüme hormonu (GH) meme kanseri tümör biyopsi örneklerinde normal meme epitel hücrelerine kıyasla arttığı, akromegali gibi malign durumların sıklıkla görüldüğü hipoadenoma görülen endokrin bozukluklarda meme kanseri gelişimi göstermesi ve meme bezi gelişiminde prolaktin gibi indükleyici etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca otokrin meme kanseri hücre hatlarında hücre invazyon, metastaz ve kanserojenik artış gösterilmiştir. Bu tez ile amacımız, Otokrin GH anlatımı olan MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerinde curcuminin apoptotik ölüm üzerine etkisinin NF- κ B sinyal yolu ve Poliamin (PA) metabolizması incelenerek moleküler mekanizmasının irdelenmesidir. Otokrin GH anlatımı hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde invazyon, metastaz, koloni oluşumunu doğal tip hücrelere kıyasla arttırdığı gösterilmiştir. Doza ve zamana bağlı curcumin uygulamasının hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 GH+ ve doğal tip meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığına ve hücre büyümesi ile koloni oluşumuna ket vurduğu belirlenmiştir. Curcuminin her iki hücre hattında hücre ölümünü JAK/STAT, NF- κ B, PI3K/Akt/MAPK sinyal yoluna ket vurarak intrinsik apoptotik ölüme yol açtığı tespit edilmiştir. Bunlara ilaveten, curcumin PA katabolik enzimleri olan SSAT ve PAO indükleyerek hücre içi PA seviyesini düşürdüğü ve ROS oluşumunu indüklediği ve NAC ile bu etkinin geri çekildiği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, Büyüme Hormonu, Curcumin, NF- κ B, Poliamin, Reaktif Oksijen Türevleri

SUMMARY

Breast cancer is the second most common cancer among women leading breast cancer related cancer deaths. Among various chemical agents that have potential drug to use breast cancer treatment via investigating breast cancer pathogenesis. Anti-inflammatory, anti-proliferative, anti-oxidant and anti-carcinogenic effects of curcumin on melanoma, colon, cervical and breast cancer have been determined in various reports. Growth hormone, expresses from pituitary gland, induces growth development via acting on protein, carbohydrate, lipid metabolisms. Moreover, significant increased expression of GH levels have been determined in breast tumor biopsy samples compared to normal breast epithelial cells. In addition, the role of GH on breast cancer cases in frequently seen malignant profile, acromegaly people and the combined effect of GH with prolactin on breast development have been determined. Autocrine GH expression induced cell invasion, metastasis and carcinogenesis in breast cancer cells and mice xenografts. The aim of this thesis is to demonstrate molecular mechanism of curcumin induced-apoptotic cell death in autocrine GH expressing MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells by regarding the NF- κ B signaling and Polyamine (PA) metabolism. According to various methods used in order to evaluate this hypothesis in this thesis, autocrine GH expression induced cell invasion, metastasis and colony formation in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells compared to wild type cells. Dose and time dependent curcumin exposure prevented GH induced cell proliferation and growth inhibition in each cell lines. Curcumin induced apoptotic cell death in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells via preventing JAK/STAT, PI3K/Akt/MAPK, NF- κ B signals was determined. In addition, curcumin induced reactive oxygen species (ROS) generation via inducing PA catabolic enzymes PAO and SSAT expressions, but this effect was prevented by using N-acetyl cysteine was demonstrated in MCF-7 and MDA-MB-231 wild type and GH+ breast cancer cells.

Key words: Breast cancer, Growth Hormone, Curcumin, NF- κ B, Polyamine, Reactive Oxygen Species

BÖLÜM I

1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda dünya çapında yaygın olarak görülen bir hastalık olmakla birlikte bu hastalığa yakalanan insan sayısı görülme oranı yüksek olan bölgelerde halen artış göstermektedir. Meme kanseri oluşumunda günümüzde bilinen birçok risk faktörü bulunmaktadır. Bunlar içerisinde en önemlileri yaş, ailevi geçmiş, üreme ile ilgili faktörler ve çevresel faktörlerdir. Meme kanseri görülme oranı dünyada olduğu gibi Türkiye’de de jeografik, ekonomik, sosyal ve kültürel faktörler nedeniyle artmaktadır [1]. Bunun yanı sıra ailesel geçmiş de meme kanserine yakalanan bireylerde önemli bir risk faktörü olup 35 yaşındaki hastaların %10’unda hastalığın nedeninin kalıtsal kökenli olduğu saptanmıştır. Türkiye meme kanseri kayılarının açıkladığı verilere bakıldığında hastaların %27’si birinci, %53’ü ikinci, %6’sı ise üçüncü evrede olduğu görülmektedir [2]. Bu nedenle meme kanserinin erken evrede belirlenmesi, tedaviye yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesi ve etkileşim içerisinde olan moleküler yolların aydınlatılması önem taşımaktadır.

Büyüme hormonu (GH), hipofiz bezi türevli bir hormon olup sentezi postnatal süreçte en yüksek düzeyde gerçekleşmektedir. GH meme hücrelerinde proliferasyon, farklılaşma ve olgunlaşma süreçlerinde rol almaktadır. Yapılan çalışmalar doğrultusunda yüksek düzeyde GH varlığı genetik ve çevresel faktörlerle birlikte meme kanseri gelişimini tetiklediği görülmüştür. Bunun yanı sıra GH sentezi normalden yüksek olmasına bağlı olarak meydana gelen kadın akromegali hastalarında normal bireylere oranla meme kanserine yakalanma risklerinin 4 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeninin ise kemoterapik ajanlara karşı oluşan direncin GH tarafından tetiklenmesi olduğu düşünülmektedir [3].

Meme kanserinin, çoğu kanser çeşitlerinde olduğu gibi başlıca tedavi yöntemleri kemoterapi ve radyoterapidir. En yaygın olarak bilinen tamoksifen nonsteroid yapıda bir anti-östrojen reseptörü (ER) ajanıdır. Bunun yanı sıra tedavi amaçlı birçok ilaç tasarımı halen yapılmakta ve terapötik etkileri araştırılmaktadır. Günümüzde Alzheimer, Multiple sclerosis ve diyabet gibi çok sayıda hastalık

üzerinde terapötik etkinliğe sahip bitkisel kökenli olan ajan curcumin, *Curcuma longa* bitkisinden elde edilmiştir. Curcumin anti-inflamatuvar, anti-anjiyogenik, anti-oksidan ve anti-kanser etkinliğe sahip bir ajan olup Hindistan ve Çin'in tıbbi sistemlerinde tedavi edici özelliğe sahiptir. Yapılan çalışmalar sonunca curcuminin meme kanseri hücrelerinde anti-proliferatif etkisi olduğu ve hücrelerde apoptotik bir etki oluşturduğu saptanmıştır [4]. Ayrıca yapılan bir başka çalışmada ise curcuminin hipofiz bezi türevli adenomalarda GH ve prolaktin gibi hipofiz bezi hormon düzeyini ve salınımını baskıladığı görülmüştür [5].

Meme kanseri gelişim süreci hücre sağkalım yolları ile ilişkili olup JAK/STAT (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription), MAPK (Mitogen-activated protein kinases), PI3K (phosphoinositide 3-kinase) ve NF-κB (nuclear factor-kappaB) gibi çeşitli sinyal yollarının anormal veya aşırı aktivasyonu kötü prognoz ile sonuçlanmaktadır. JAK/STAT sinyal yolağında ekstrasellular alanda bulunan sitokinlerin sitokin reseptörüne bağlanması sonucu özellikle JAK2 tirozin kinaz molekülünün aktivasyonu başlamakta ve STAT moleküllerinin bu kinaz tarafından fosforillenerek aktivasyonu ile devamlılığını sürdürmektedir. Aktifleşen STAT molekülleri ise nukleusa geç ederek transkripsiyon faktörü olarak rol almaktadırlar [6]. MAPK sinyal yolağında fonksiyonel proteinler kaskad ile birbirlerini fosforile ederek aktive ederler. Son fosforile olan ERK molekülü ise transkripsiyon faktörü olarak nukleusa geç eder [7]. PI3K sinyal yolağı da hücre sağkalımında görevli önemli yollardan biridir. Bu sinyal yolağının regülasyonunda PTEN molekülü görevlidir. PI3K molekülü PIP₂'nin PIP₃'e dönüşümünü gerçekleştirir. PIP₃ molekülü Akt aktivasyonunu tetikler. Akt ise sağkalımda major rollere sahip olan mTOR komplekslerinin aktivasyonunda görevlidir [8]. NF-κB sinyal yolağı hücrede inflamasyon, immun sistem, proliferasyon, migrasyon ve apoptoz gibi çok çeşitli biyolojik süreçlerin regülasyonunda rol almaktadır. İki ana NF-κB sinyal yolağı bulunmaktadır. Bunlardan biri p65 ve p50 alt ünitelerinin görev aldığı klasik yolak olmakla birlikte diğeri ise p52 ve RelB alt ünitelerinin görev aldığı standart olmayan yolaktır. NF-κB alt üniteleri kompleks halinde nukleusa geçerek transkripsiyonel aktivitelerini gerçekleştirmektedir [9]. Tüm bu yollarda aktif olarak rol alan transkripsiyon faktörleri hastalığın gelişim sürecinde önem teşkil etmekle birlikte günümüzde meme kanserini tedavi amaçlı bu molekülleri hedef alan çok sayıda inhibitörler dizayn edilmektedir. Sağkalım yollarının yanı sıra özellikle metastatik süreçte rol oynayan

EMT'nin (epitel mezenkimal geçiş) [10] ve MMP'ler (matriks metalloproteinaz) [11] gibi moleküllerin aktivasyonu görölmektedir. Meme kanseri tedavisinde geliştirilen terapötik ilaçların çoğu hücre döngüsünü durdurmakta ve hücreyi ölüme sürüklemektedir. Hücre içerisinde süre gelen poliamin metabolizması hem hücre döngüsü üzerine etki etmekte hem de katabolizmanın aktivasyonu ile oluşan ürünler sonucunda hücre ölümü ile ilişkilendirilmektedir [12]. Hücre ölümü çeşitlerinden biri olan apoptoz iki sinyal yolağına ayrılmaktadır; içsel ve dışsal yolak. İçsel apoptotik yolakta ölüm sinyali hücrenin kendisinden gelmekle birlikte mitokondriye bağlı olarak gerçekleşmektedir. Dışsal apoptotik yolakta ise ölüm sinyali hücre dışından gelmektedir. Bu aşamada görevli en önemli moleküller ise sistein proteaz ailesi üyeleri olan kaspazlardır. Kaspaz kaskadının aktivasyonu sonucunda DNA ve hücre iskeleti materyalleri kaspazlar tarafından kesilerek hücre ölümü gerçekleşmektedir [13].

2. AMAÇ

Postnatal büyüme üzerinde etkisi olan, somatotrof hücreler tarafından hormonal düzenleme ile anlatımı olan GH, biyolojik aktivitesini kendine özgü olan reseptör (GHR) bağlanarak JAK/STAT sinyal yolağı aracılığı ile protein, karbonhidrat, yağ metabolizması üzerinde etkisini kemik, yağ dokusu başta olmak üzere vücuttaki tüm dokularda büyümeyi indüklemektedir. Postnatal gelişim üzerinde etkisi dışında GH meme gelişimi üzerinde prolaktin gibi indükleyici etkisi gösterilmiştir. Yüksek miktarda anlatımı meme kanseri dokularında normal meme epiteline kıyasla gösterilen GH ayrıca akromegali hastaları gibi malign durumların yüksek olduğu endokrin bozukluklarında da meme kanseri gelişiminde etkili olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca otokrin GH anlatımının meme kanseri hücrelerinde indükleyici ve karsinogenetik etkisi gösterilmiştir. Anti-inflammatuar, anti-oksidatif, anti-proliferatif ve anti-kanserojenik etkisi gösterilen curcuminin otokrin GH anlatımı üzerinde baskılayıcı etkisi fare hipofiz bezi hücre hatlarında gösterilmiştir. Ancak otokrin meme kanseri üzerinde curcuminin anti-hormonal ve anti-apoptotik etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tezin amacı MCF-7 (östrojen reseptörü pozitif) ve MDA-MB-231 (östrojen reseptörü negatif) meme kanseri hücre hatlarında otokrin GH sinyali aktive edilen hücrelerde curcuminin hücre proliferasyonu,

metastaz-invazyon, sağ kalım-hücre ölümlü üzerine etkisinde poliamin metabolizmasının irdelenmesidir.



BÖLÜM II

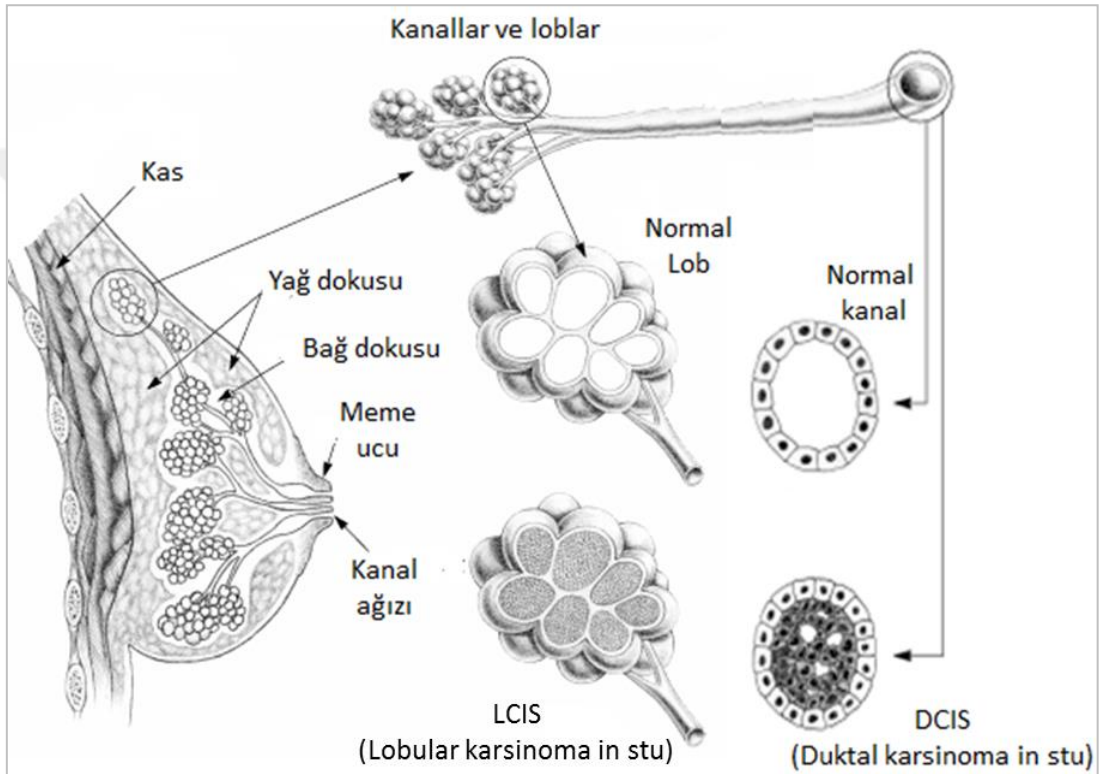
3. GENEL BİLGİLER

3.1.MEME KANSERİ

Kanser terimi, M. Ö. 460-370 yılları arasında Hipokrates tarafından tanımlanmış olup Rumca'da habis tümörleri betimlemek amacıyla kullanılan "Karkinos" kelimesinden türemiştir. Ancak kanserin ilk keşfi Hipokrates tarafından olmamıştır. M. Ö. 1600 yıllarında antik Mısır'da kalan mumyalar üzerinde yapılan çalışmalarda insan kemik kanseri tespit edilmiştir. Bununla birlikte yine antik Mısır'da M. Ö. 1500 yıllarında dünyadaki en eski kayıtlarda ilk kez belirlenen vakanın meme kanseri olduğu öne sürülmüştür [14].

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser çeşidi olup kompleks ve heterojen bir hastalıktır. Günümüzde daha az gelişmiş ülkelerde gelişmiş ülkelere oranla meme kanseri görülme sıklığı artış göstermektedir. Ekonomik refah ve yaşam tarzındaki değişikliklerin bu oranı azaltıcı etkiye sahip olduğu bilinmektedir [15]. Meme kanseri kaynaklı ölüm oranları on yıllık süre zarfı içerisinde artış göstermekte iken 1990'dan sonra batı ülkelerinde bu oran, hastalığın erken evrelerinde teşhis edilmesi ve etkili tedavi yöntemlerinin uygulanması ile azalış göstermektedir [16]. Her yıl bir milyondan fazla meme kanseri teşhisi konmakta ve bu artışa bağlı olarak da meme kanseri kaynaklı ölüm oranları artmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar sonucu erken yaşta menarş, ileri yaşta ilk hamilelik, düşük oranda doğum sayısı ve geç menapozun meme kanseri görülme sıklığını arttırdığı görülmektedir. Bunun yanısıra ailesel geçmiş de önem teşkil etmektedir. Genellikle hastaların % 10'u 35 yaşında olup kalıtsal kökenli olarak kendini göstermektedir. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar meme kanseri hastalarının %3-8'inde görülmektedir [17].

Meme dokusunun yapısı çok sayıda lob ve kanaldan oluşmaktadır. Her bir memede birçok lopçuğun bir araya gelmesiyle oluşan loblardan 10-15 adet bulunur. Lopçuklar memede süt üretiminin gerçekleştiği yapılar olmakla birlikte tüm bu loblar küçük tübüler yapılardan oluşan kanallarla birbirlerine bağlanır. Meme kanserinin iki tipi bulunmaktadır. Bunlardan en sık görüleni lobular karsinoma *in situ* (LCIS) olarak adlandırılır ve lopçuklarda kanser hücrelerinin oluşumu ile meydana gelmektedir. Bir diğeri ise duktal karsinoma *in situ* (DCIS) olarak adlandırılır ve kanal yapılarında kanser hücrelerinin oluşumu ile meydana gelir (Şekil 1) [18].



Şekil 1. Meme yapısı, LCIS ve DCIS oluşumu.

Meme kanserinde gen ekspresyon profilinin belirlenmesi tümör ve lenf nodu derecelendirilmesi, çeşitli belirteçlerin bulunup bulunmama durumuna göre önem teşkil etmektedir. Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2) anlatımına bağlı olarak beş alt grup oluşturulmaktadır. Bunlar Tablo 1’de görüldüğü gibi luminal A, luminal B, HER2, bazal ve normal meme kanseridir. Bazal meme kanseri grubunda ER α , PR ve HER2 anlatımı eksik olmakta ve bu durum kötü hastalık seyri ile ilişkilendirilmektedir [19].

Tablo 1. Meme kanserinin gen anlatımı açısından sınıflandırılması.

Sınıflandırma	İmmünoprofil	Örnek Hücre Hattı
Luminal A	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁻	MCF-7, T47D
Luminal B	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁺	BT474, ZR-75
Bazal	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	MDA-MB-468
Normal	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	MDA-MB-231
HER2	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺	SKBR3, MDA-MB-453

3.1.1. Epidemiyoloji

Meme kanseri ölüm oranı kadınlarda akciğer kanserinden sonra ikinci sırada bulunmakla birlikte son on yıl içerisinde meme kanseri kaynaklı ölüm sayısının 249.000 olduğu belirlenmiştir. Dünya’da genellikle 40-54 yaşlar arası bayanlarda meme kanseri teşhisi koyulmaktadır. 2016 yılında ise 246.660 kadına ve 2.600 erkeğe meme kanseri teşhisi konulduğu gösterilmiştir [20]. Meme kanseri üzerine yapılan birçok çalışmada elde edilen verilerden anlaşılacağı gibi oluşum ve gelişim sürecinin ve buna bağlı olarak da teşhis ve ölüm sayılarının farklılığı söz konusudur. Bu değişkenlik günümüzde bilinen birçok risk faktörü nedeniyle oluşmaktadır. Risk faktörlerinin içerisinde en önemlileri ise yaş ve üreme ile ilgili faktörler, ailesel geçmiş, yaşam tarzı ve çevresel faktörlerdir [21].

3.1.1.1. Yaş ve üreme ile ilgili faktörler

Meme kanseri görülme sıklığının genç bireylere oranla daha ileri yaştaki kadınlarda daha fazla olduğu belirlenmiştir. Kadınlarda hamilelik yaşı meme kanseri oluşumunu etkilemektedir. 30 yaşından önce gerçekleşen hamilelikler bireyde koruyucu etki yaratırken 30 yaşından sonra gerçekleşen hamileliklerde bireyin meme kanserine yakalanma oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [22]. Bunun yanı sıra kadınlarda menarş ve menapoz yaşları da önem teşkil etmektedir. Erken yaşta menarş veya ileri yaşta menapoz görülmesi durumunda meme kanseri riskinin arttığı görülmekle birlikte özellikle 55 ve daha büyük yaşta menopoza giren kadınlarda, 45 yaşında menapoza giren kadınlara oranla meme kanserine yakalanma olasılığının daha yüksek olduğu görülmüştür [23].

3.1.1.2. Ailesel geçmiş

Meme kanserinin risk faktörlerinden bir diğeri ailesel geçmiştir. Genç yaşta annede veya kız kardeşte meme kanseri görülen bireylerde bu durum önem teşkil etmektedir. Yapılan çalışmalarla meme kanseri olan birinci dereceden bayan akrabaya sahip premenapoz dönemindeki bireylerde postmenapoz dönemdeki bireylere oranla meme kanseri görülme riski artış göstermektedir [24]. Meme kanseri oluşumu birçok gende meydana gelen mutasyonlarla ilişkili olmakla birlikte özellikle BRCA1 ve BRCA2 genlerinde gerçekleşen mutasyonlar önemli role sahiptir. Bu genler sırasıyla 17. ve 13. kromozomlarda lokalize olmaktadır [25]. Aile içerisinde bu genlerde mutasyona sahip olunması durumunda meme kanserine yatkınlık artış göstermektedir. Kadınlarda görülen meme kanserlerinin %80-85'inde bu iki gende mutasyon varlığının söz konusu olduğu görülmektedir. Bu mutasyonlara sahip 50 yaşındaki kadınların %51'inde, 70 yaşındaki kadınların ise %85'inde meme kanseri görülme riski yüksektir [26].

3.1.1.3. Yaşam tarzı

Meme kanseri ile yakından ilişkili olan bir diğeri risk faktörü ise yaşam tarzıdır, bunun içerisinde en önemlileri sigara ve alkol kullanımınıdır. Yapılan çalışmalar sonucu alkol kullanımındaki artış meme kanseri oluşum riski ile doğru orantılı olup artış göstermekle birlikte meme kanseri riskini %30 arttırdığı görülmüştür. Bunun yanısıra sigara kullanımı da meme kanseri riskini arttırmaktadır. Günümüzde sigara kullanan bireylerin mutasyonlara daha yatkın olduğu belirlenmiş olup buna bağlı olarak sigara kullanmayan bireylere oranla meme kanseri riskinin daha fazla olduğu saptanmıştır. Beslenme şekli de meme kanseri gelişim sürecinde hormon sentezinde ve metabolizmada rol almaktadır. Özellikle besin yoluyla yüksek miktarda alınan yağ bileşenleri vücutta östrojen ve progesterona çevrilmektedir. Bu durum meme kanseri gelişim sürecini etkilemektedir [27].

3.1.1.4. Çevresel faktörler

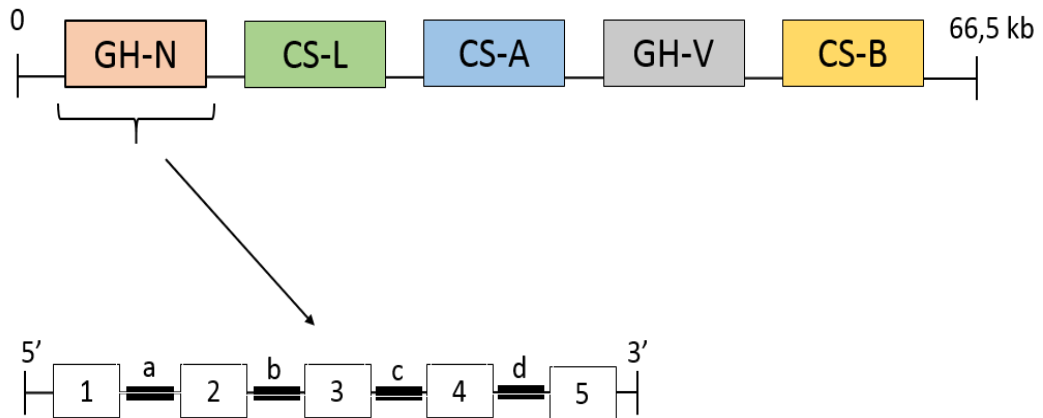
Meme kanseri oluşum ve gelişiminde çevresel faktörlerin de etkisi büyüktür. Bunlardan en önemlisi iyonize radyasyon olup özellikle genç yaştaki bireylerde etkili olmaktadır. Genç yaştaki bireylerin DNA replikasyon hızı ileri yaştaki bireylere oranla daha yüksektir. Bu nedenle mutasyonlara daha yakın olup meme kanseri görülme oranı da artış göstermektedir. Yapılan çalışmalarda İkinci Dünya Savaşı

sırasında atılan atom bombası sonucu radyasyona maruz kalan 10-19 yaşları arasındaki kadınlarda, maruz kalınan radyasyon miktarıyla doğru orantılı olacak şekilde meme kanseri görülme riski artış göstermektedir. İyonize radyasyonun yanısıra elektromanyetik radyasyon ve kullanılan çeşitli kimyasallar da mutasyon oluşumunu tetikleyeceğinden meme kanseri riskini de arttırmaktadır [26].

3.2.BÜYÜME HORMONU (GH)

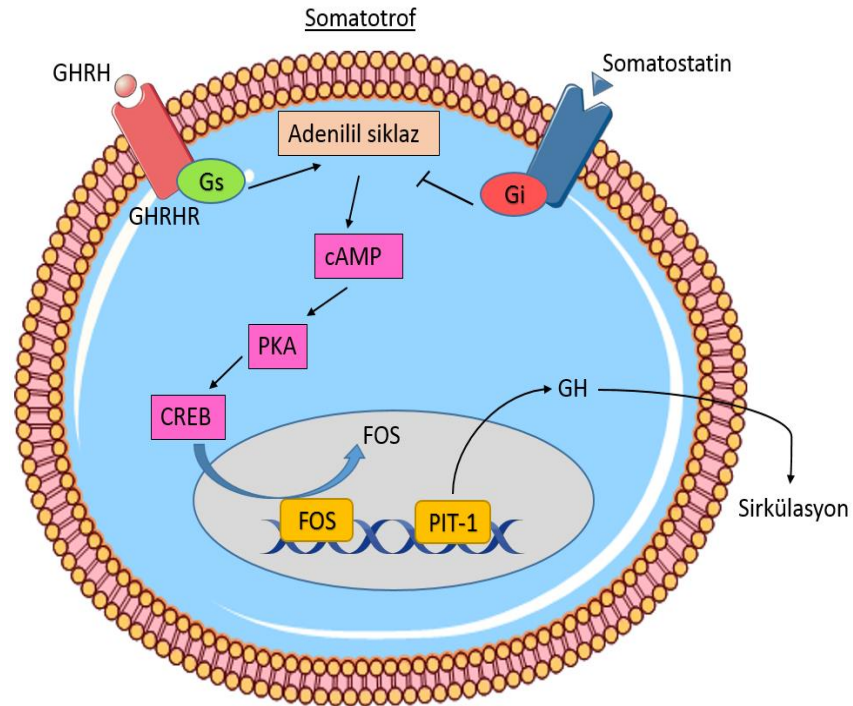
3.2.1. Sentezi, salınımı ve fonksiyonu

Büyüme hormonu (GH), plasental laktojenler (PL) ve prolaktinin (PRL) de yer aldığı büyük protein homonları sınıfı üyesi olup hipofiz bezi kökenli bir hormondur. GH geni insanda 17. kromozomun uzun kolunda lokalize olmakta ve 2600 nükleotid uzunluğundadır. Beş ekzon ve 4 introndan oluşmakta olan ve homolojisi yakın olan ilişkili beş genin de bulunduğu bir gen ailesinde yer almaktadır. GH gen ailesi 66.500 baz uzunluğunda olmakla birlikte GH-N (growth hormone-normal gene), CS-L (korionik somatomammotropin-benzeri gen), CS-A (korionik somatomammotropin-A), GH-V (büyüme hormonu-variant) ve CS-B (korionik somatomammotropin-B)'den oluşmaktadır. Yalnızca GH-N'nin hipofiz bezinde ve yine yalnızca GH-V'nin plasentada anlatımı gerçekleşmektedir (Şekil 2) [28].



Şekil 2. GH'nin bulunduğu gen kümesi ve GH geni.

Hipofiz bezinden GH salınımında görevli hücreler somatotrof olarak adlandırılır. Büyüme hormonu serbestleyici hormon (GHRH) ve somatostatin adı verilen hipotalamik peptid yapıları tarafından GH sentezi ve salınımının regülasyonu sağlanmaktadır. GHRH hormonu GH'nin transkripsiyonunu tetiklerken somatostatin GH salınımını inhibe etmektedir. Ayrıca GH somatotroflarda serbestleyici granüller içerisinde depolanabilmektedir. GHRH'nin büyüme hormonu serbestleyici hormon reseptörüne (GHRHR) bağlanması ile G-protein bağımlı reseptör üzerinden intrasellular c-AMP düzeyi artış göstermektedir. c-AMP artışı ise hipofiz spesifik transkripsiyon faktörü pit-1 konsantrasyonunu arttırmaktadır. Pit-1, POU homeodomain transkripsiyon faktörü ailesi üyesidir. GH geninin kodlandığı bölgeye spesifik olarak bağlanmakta ve transkripsiyonunu gerçekleştirmektedir [29]. GH amino terminalinde bir sinyal peptidi ile öncül protein olarak sentezlenir ve salındığında bu peptid kısmı uzaklaştırılır. GH-N 22 kDa olup 191 aminoasitler oluşmaktadır. Sentezlenen GH proteini somatotroflardan dolaşım sistemine salınır. Sirkülasyon sürecinde GH karaciğer, kas, yağ, kemik ve meme dokularında IGF-I (insülin benzeri büyüme faktörü-I) salınımını tetikleyerek büyüme ve gelişmeyi teşvik etmektedir. IGF-I salınımı hücrelerin farklılaşması üzerine mitojenik etki oluşturup hücre sayısının klonal artışına neden olmaktadır (Şekil 3) [30].



Şekil 3. Somatotrof hücresinde GH sentezi ve salınımı.

3.2.2. Büyüme Hormonunun meme kanseri gelişimi üzerine etkisi

GH meme dokularında kanalların uzamasını ve farklılaşmasını tetiklemektedir. Normal lobular epitel hücrelerin proliferasyonunu ve salgı fonksiyonlarını gerçekleştirmelerinde rol oynamaktadır. GH bu etkisini direkt olarak veya IGF-I salınımını tetikleyerek gerçekleştirebilmektedir. Hipofiz bezinden salınan GH, meme gelişim sürecinde meme de IGF-I'in lokal stimülasyonunu sağlamaktadır. Bu durum parakrin veya otokrin olarak gerçekleşebilmektedir. GH ve IGF-I eksikliğinde meme kanserinin önlenebileceği bilinmektedir [31].

GH, meme ve hipofiz bezinde aynı DNA dizisi üzerinden sentezlenmektedir [32]. Temel farklılık ise transkripsiyonel düzeyde gerçekleştirilen regülasyondur. İnsan meme dokusunda artan GH anlatımı epitel hücrelerin proliferasyonundaki artışla ve metastatik meme kanseri hücrelerinin yüksek düzeyde GH anlatımına sahip olmasıyla ilişkilidir [17].

Meme kanseri hücrelerinde GH, kemoterapötik ilaçlarla tetiklenen apoptotik hücre ölümüne karşı direnç oluşumuna neden olmaktadır. Aşırı GH anlatımına sahip bireylerde örneğin akromegali hastalarında, normal bireylere oranla meme kanserine yakalanma oranının daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle GH sinyalini en baştan kesmek amacıyla GHR'yi bloke edici ajanların kullanılmasının meme kanserinde terapötik potansiyeli arttıracakı düşünölmektedir [33].

3.3.TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Meme kanseri tedavisinde birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Tedavi yöntemleri; cerrahi yöntem, radyoterapi, kemoterapi ve hormonal terapidir.

3.3.1. Cerrahi yöntem

Meme kanserinde tedavi amaçlı kullanılan en yaygın yöntemdir. Mastektomi, memedeki tümörlü bölgenin cerrahi operasyon ile çıkarılması ile gerçekleştirilir. Çoğu zaman tümörlü bölge ile birlikte bir kısım sağlıklı meme dokusu da çıkarılır. Total mastektomi ise meme dokusunun tamamen alınması ile gerçekleştirilir. Basit mastektomi yönteminde koltuk altında bulunan lenf nodülleri çıkarılmamaktadır. Tümörlü yapı bulunan meme dokusunun tamamı ile birlikte koltuk altındaki lenf nodüllerinin de alındığı yöntem ise modifiye radikal mastektomi olarak adlandırılmaktadır [27].

3.3.2. Radyoterapi

Meme kanseri tedavisinde kullanılan diğeri bir yöntem ise radyoterapidir ve X-ışınlarının varlığında kanserli hücrelerin öldürülmesi ile gerçekleştirilir. Genellikle mastektomiden sonra tümörün alındığı bölgede bir miktar kanserli hücre kalması ihtimaline karşı radyoterapi yapılmaktadır. Böylece mastektomiden sonra meme kanserinin tekrar nüksetme olasılığı düşürülmektedir. Genellikle X-ışınları meme ve koltuk altı bölgesine uygulanmaktadır. Radyoterapinin en sık kullanılan tipi ise harici ışınlama yöntemidir ve metastatik tümörleride yaygın olarak kullanılmaktadır [34].

3.3.3. Kemoterapi

Mikrometastatik meme tümörlerinin elimine edilmesinde ve tümör büyüklüğünün küçültülmesinde kemoterapötik yöntemler kullanılır. Kemoterapötik ajanlar hastalara genellikle damar yolundan veya hap şeklinde uygulanır ve böylece damar yoluyla vücuda yayılmaktadır [35].

3.3.4. Hormonal terapi

Meme epitel hücrelerinde steroid yapıda hormonlar ve reseptörlerinin anlatımı bulunmaktadır, bunlardan başlıcaları östrojen, östrojen reseptörü (ER) ve progesteron, progesteron reseptörü (PR)'dür. Östrojen reseptörünün ER α ve ER β olmak üzere iki alt grubu bulunmaktadır. Doku içerisindeki anlatım düzeyleri farklı olmakla birlikte ER α 'nın anlatımı ER β 'dan daha fazla düzeyde gerçekleşmektedir. Primer östrojen hormonlarından biri olan östradiolün östrojen reseptörlerine bağlanmasıyla birlikte mitogenik sinyalin aktivasyonu sağlanır. Normal hücrelerde büyüme, gelişme ve farklılaşma gibi hücreyel olaylar bu sinyal yolağının aktivasyonu ile gerçekleşir. Yapılan çalışmalar ile meme kanserinde tedavi amaçlı çeşitli terapötik hedefler belirlenmiştir. Meme kanseri oluşumu ve gelişiminde görevli çeşitli reseptörlerin varlığı veya bu reseptörleri kodlayan genlerde var olan mutasyonlar, hastalığın başlangıcı ve gelişim süreçlerinde etkili olmaktadır. Bu amaçla meme kanseri hücreleri, doğru kemoterapötik yöntemlerin uygulanabilmesi için dört farklı sınıfa ayrılmıştır. ER+/HER-2-, ER+/HER-2+, ER-/HER-2+ ve ER-/HER-2-'dir. Kemoterapik tedaviye başlamadan önce hastada bu gibi moleküler belirteçlerin belirlenmesi gerekmektedir [36].

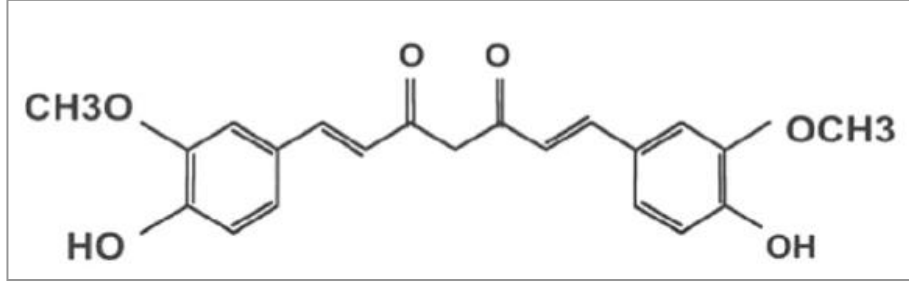
Hormonal tedavi yöntemi genellikle ER- hastalara uygulanmakta olup en eski tedavi yöntemlerinden birisidir. Tedaviye başlamadan önce hastanın östrojen ve östrojen reseptör düzeyleri belirlenir. Bunu takiben anti-östrojenler (tamoxifen) veya aromataz inhibitörleri uygulanabilmektedir.

Anti-östrojenlerin moleküler mekanizması, östrojenin membranda lokalize olan östrojen reseptörüne bağlanıp sitozolden nukleusa doğru büyüme sinyalinin iletilmesini ve östrojenin sitozoldeki östrojen reseptörüne bağlanarak büyüme ve farklılaşma ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin aktive etmesini önlemektir. Bunlar selektif östrojen reseptör modülatörleri (SERM) olarak adlandırılırlar. Östrojenin reseptörüne bağlanmasını engellediğinden anlaşılacağı gibi tamoxifen gibi ajanlar yapısal olarak östrojene benzemekte ve östrojen analogu olarak da bilinmektedir. Östrojen reseptörünün yanısıra progesteron reseptörü ile de yarışçıl olarak tasarlanmış ajanlar mevcuttur. Bunlar selektif progesterone reseptör modülatörleri (SPRM) olarak adlandırılmaktadır. Mifepristone SPRM'den biri olup PR aktivasyonu sonrası büyüme sinyalinin nukleusa iletilmesini engellemektedir.

Aromataz inhibitörleri, kolesterolden östrojen dönüşümünü katalizleyen aromataz enzimini inhibe ederek östrojen seviyesini indirgemekte ve östrojen sinyal yolağının aktivitesini düşürmektedir [37].

3.3.5. Curcumin

Zerdeçal, *Curcuma longa linn* bitkisinin rizomu olup eski Hint hekimlik ev uzun yaşam sanatında ve Çin'e özgü tıpta çok çeşitli hastalıkların önlenmesi veya tedavisinde kullanılmıştır. Kurutulmuş zerdeçal tozu yemeklerde, özellikle köri hazırlanışında kullanılmaktadır. Zerdeçal tozu sarı renkli olup çeşitli curcuminoidleri içermektedir. Bunlar %77 oranında curcumin, %17 oranında demetoksicurcumin ve %3 oranında ise bisdemetoksicurcumin'dir. Curcumin bir polifenol olup (1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptaiden-3,5-dion) ve moleküler yapısı Şekil 4'de gösterilmektedir. Eski hindu hekimliğinde curcumin astım, bronşiyal hiperaktivite, alerji, anoreksiya, nezle, öksürük, sinüzit ve hepatik rahatsızlıklarda kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarla curcuminin anti-enfeksiyöz, anti-oksidan, anti-inflamatuar, hepatik koruyucu, kardiyo koruyucu, eklemlerde iltihaplanmayı önleyici, kimyasal koruyucu ve anti-kanserojenik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir [38].



Şekil 4. Curcuminin moleküler yapısı (42).

3.3.6. Curcumin ve meme kanseri

Curcuminin çoğu tümörlerde başlangıç, gelişim ve metastaz süreçlerini baskılayıcı etkiye sahip olduğu bilinmektedir [39]. Bu anti-kanser etkinliğini çeşitli transkripsiyon faktörlerini, büyüme hormonlarını, inflamatuvar sitokinleri, protein kinazları ve diğer onkojenik molekülleri negatif regüle ederek sağlamaktadır. Anormal proliferasyonu ise hücre döngüsünü farklı fazlarda durdurarak ve apoptozu indükleyerek engellemektedir [40].

Meme kanseri hücre hatları ile yapılan çalışmalara bakıldığında curcuminin zamana ve doza bağlı olarak proliferasyonu inhibe ettiği görülmüştür. Hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu ve özellikle hormon negatif hücrelerde p53 anlatımını artırarak p21 ve Bax/Bcl-2 oranını tetiklediği ve böylece hücreyi apoptoza götürdüğü belirlenmiştir [41]. Çoğu anti-kanser ajan NF-κB'yi aktive etmektedir, buna bağlı olarak hücre sağkalımı, proliferasyon ve metastaz da aktive olmaktadır. Yapılan çalışmalarla curcuminin proliferasyonu, migrasyonu, adezyonu ve invazyonu NF-κB üzerinden baskıladığı görülmüştür [42]. NF-κB ile ilişkili olarak meme kanseri gelişiminde MMP'lerin düzeyinin fazla olduğu bilinmektedir. Bu aşamada curcumin özellikle MMP-3 ve MMP-9 salınımını azalttığı belirlenmiştir. proliferasyonda rol alan MAPK, ERK, c-Jun ve p38 sinyalleri üzerinde curcuminin inhibe edici etkisinin olduğu gösterilmiştir [41, 42]. Böylece curcuminin çoğu meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu ve sağkalımı baskıladığı; hücre döngüsünü G2/M fazında durdurup apoptotik belirteçleri tetikleyerek hücreyi apoptoza götürdüğü belirlenmiştir.

3.3.7. Curcumin ve büyüme hormonu

Curcuminin çeşitli kanser tipleri üzerindeki anti-kanser etkisi bilinmekle birlikte hipofiz bezi tümörleri üzerindeki etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır. 2008 yılında sıçanlarda yapılan bir çalışmada curcuminin epitel kökenli tümörlerde hücre proliferasyonu, apoptoz ve hormo düzeyi üzerine etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak hipofiz bezi tümör hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği, apoptozu indüklediği ve koloni oluşumunu engellediği görülmüştür. Bunun yanısıra siklin D3 anlatımını azalttığı ve retinoblastoma proteininin fosforilasyonunu indüklediği belirlenmiştir. Ayrıca curcuminin bu hücrelerde GH ve prolaktin seviyelerini önemli derecede baskılaması anti-hormonal etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir [43].



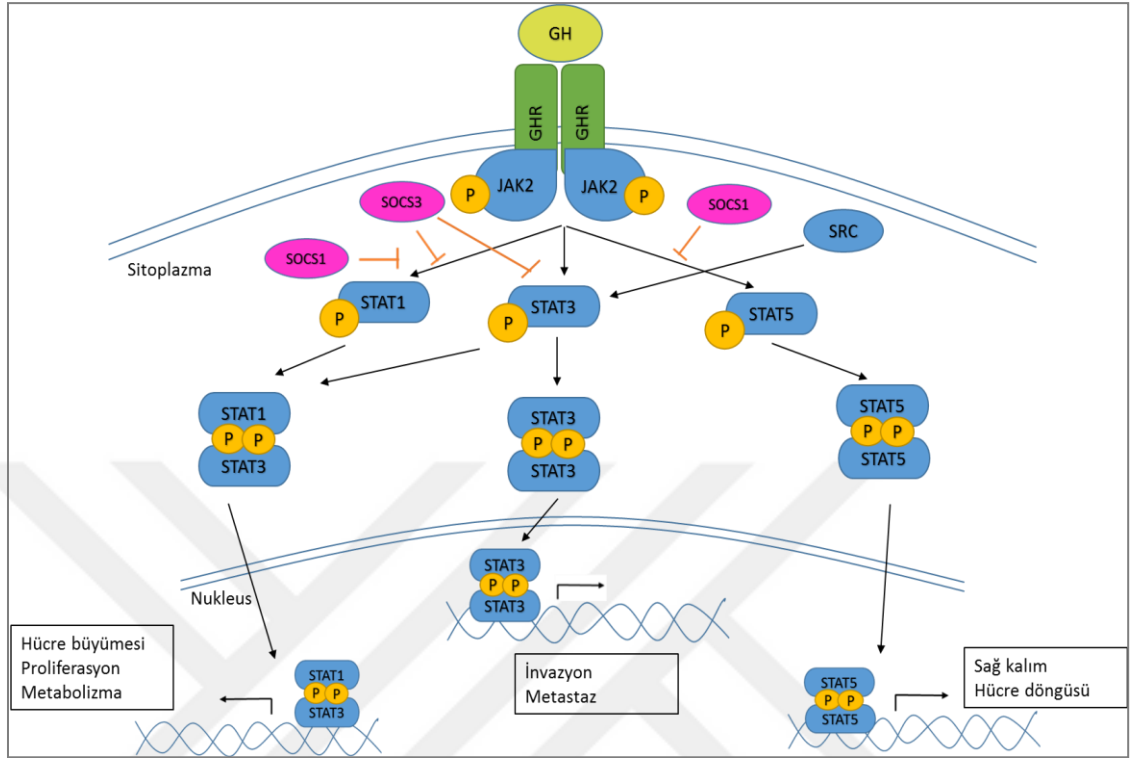
3.4.HÜCRE SAĞKALIM YOLAKLARI

Meme dokusunun gelişim sürecinin regülasyonunu sağlayan GH aynı zamanda meme kanseri gelişiminde de önemli rol oynamaktadır [33]. Bu açıdan incelendiğinde GH sinyal yolağı sağkalım ve proliferasyonda rol alan birçok sinyal yolağı ile iletişim halindedir. Bunlardan bazıları JAK/STAT (Janus kinaz/sinyal aktarıcı ve transkripsiyon aktivatörü), PI3K (Fosfotidilinositol 3-kinaz), MAPK (Mitojen aktive edici protein kinaz) ve onkogenlerdir [31].

3.4.1. JAK/STAT Sinyal Yolağı

Meme bezlerinin büyüme ve farklılaşma sürecinde, meme epitel hücrelerinin salgılama fonksiyonunda JAK/STAT sinyal yolağı önem teşkil etmektedir. Ekstrasellular alanda bulunan GH, hücre memebanında lokalize olan GHR'ye bağlanarak reseptörle ilişkili JAK2 aktivasyonunu sağlar [44]. JAK2, kendisi ve GHR tarafından tirozin bölgelerinden fosforile edilmektedir. Bu tirozin bölgeleri STAT proteinlerinin SH-2 domainleri ile interaksiyona geçmekle birlikte bu süreç STAT proteinlerinin fosforilasyonu ile sonuçlanmaktadır. STAT protein ailesinin 6 üyesi bulunmaktadır. Bunlar; STAT1, 2, 3, 4, 5 (5a ve 5b) ve 6 olarak tespit edilmiştir. JAK2 üzerinden aktive olan STAT'lar ise STAT1, STAT3 ve STAT5'tir. Fosforilasyon ile active olan STAT protenleri homodimer veya heterodimerler oluşturarak nukleusa göç ederler ve burada transkripsiyon faktörü olarak görev almaktadırlar. STAT1/STAT3 heterodimeri hücre büyümesi, proliferasyon ve metabolizmada rol oynayan genlerin, STAT3/STAT3 homodimeri invazyon ve metastazda fonksiyonel, STAT5/STAT5 homodimeri ise sağkalım ve hücre döngüsü üzerinde görevli genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirmektedir [45]. JAK/STAT sinyal yolağının regülasyonu SOCS (sitokin sinyalini baskılayıcı) proteinler tarafından sağlanmaktadır. SOCS proteinleri SOCS1, 2 ve 3 olmak üzere 3 gruba ayrılır. JAK/STAT sinyal yolağında aktif rol alanlar SOCS1 proteini STAT1/STAT3 heterodimeri veya STAT1/STAT1 homodimeri üzerinde inhibe edici etkiye sahip iken SOCS3 proteini STAT3/STAT3 homodimerini inhibe etmektedir. Çoğu SOCS protein, sitokinler tarafından indüklenmekle birlikte negative feedback mekanizması ile STAT proteinlerini inhibe etmektedir (Şekil 5). PIAS (aktive olan STAT inhibitor

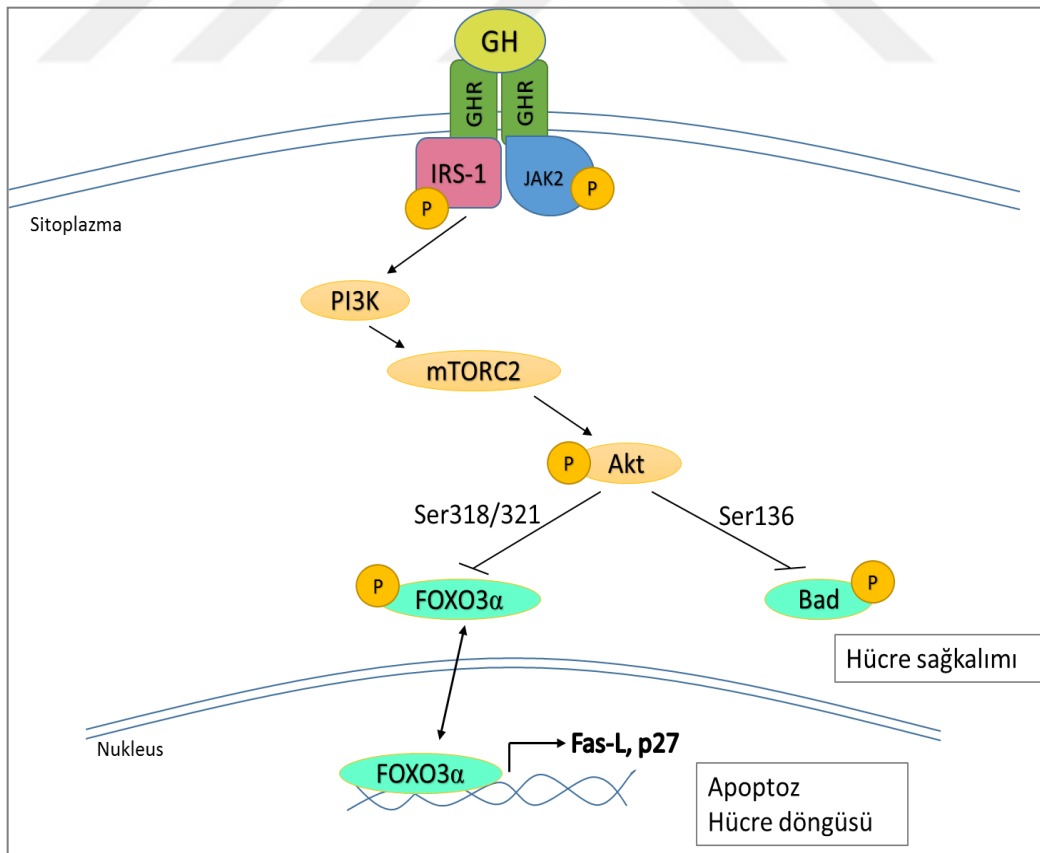
protein) proteinleri de bir diğerk STAT inhibitörleri olup PIAS-1 ve PIAS-3 sırasıyla pSTAT1 ve pSTAT3 inhibitörleridir. [46].



Şekil 5. GH/GHR/JAK/STAT sinyal yolağı.

3.4.2. PI3K/Akt Sinyal Yolağı

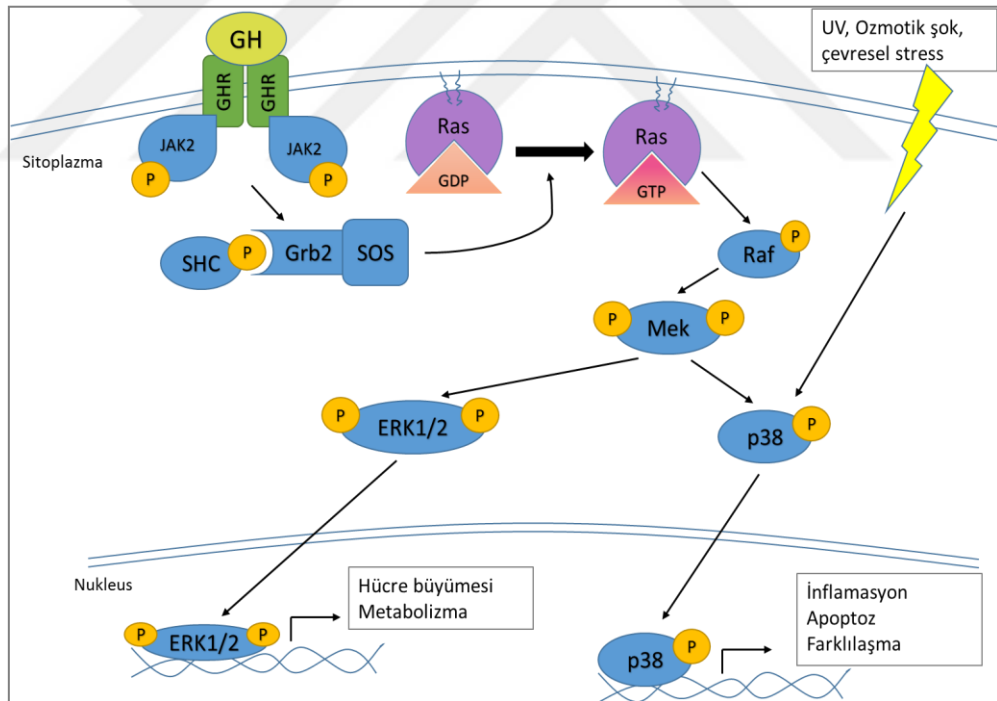
PI3K/Akt sinyal yolağı proliferasyon, hücre büyümesi ve sağkalımı gibi çeşitli hücrel süreçlerde önemli rollere sahip olmakla birlikte büyüme faktörü reseptör tirozin kinazlar tarafından aktive olmaktadır [8]. Genellikle IGF-1'in reseptörüne bağlanması ile aktive olan IRS-1 PI3K'in aktivasyonunu sağlamaktadır. IRS-1'in GH sinyal yolağı üzerinden de aktive olduğu düşünölmektedir. GHR tarafından fosforilasyon ile aktive olan JAK'ın IRS-1'in fosforile ederek aktive ettiği ve böyle PI3K/Akt sinyal yolağının tetiklendiği görölmektedir. PI3K mTOR2 kompleksi üzerinden Akt proteinini serin 473 bölgesinden fosforile ederek aktivasyonunu sağlamaktadır. Aktive olan Akt proteini pro-apoptotik olan Bad'ı serin 136 bölgesinden fosforile ederek inhibisyonunu gerçekleştirir. Ayrıca hücre döngüsü inhibitörlerinden p21 ve p27 anlatımını transkripsiyonel düzeyde regöle eden FOXO3 α proteinini de serin 318 ve 321 bölgelerinden fosforile ederek inhibe etmektedir. Böylece hem apoptotik hücre ölümlü baskılanarak hem de hücre döngüsünün devamlılığı sağlanarak proliferasyon ve sağkalım tetiklenmektedir (Şekil 6) [47].



Şekil 6. PI3K/Akt sinyal yolağı.

3.4.3. MAPK Sinyal Yolağı

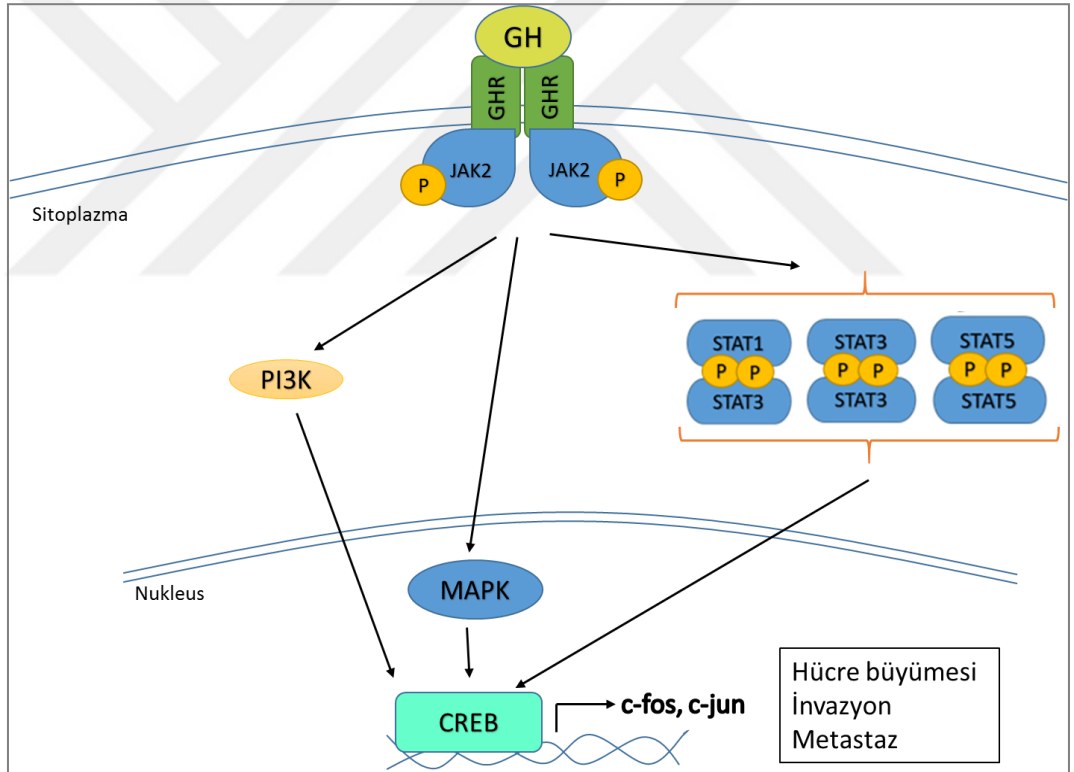
MAPK sinyal yolağı çeşitli ekstrasellular uyarılara karşı hücrenin vereceği cevabın regülasyonu sağlamakla birlikte GH siyali tarafından aktive olan JAK2 proteini aracılığıyla tetiklenmektedir. JAK2 kinazı SHC-Grb2-SOS kompleksini aktive eder. Bu kompleks farnesilasyonu gerçekleşmiş olan Ras proteininin GTP'ye bağımlı aktivasyonunu indüklemektedir ve böylece Ras, Raf, MEK ve son olarak da ERK1/2 fosforilasyonu ile devam eden kaskadın aktivasyonu gerçekleşir. Kaskatta yer alan bu moleküller kinaz aktivitesine sahip olup birbirlerini fosforile ederek aktivasyonu sağlamaktadırlar. Fosforile olan son molekül ERK1/2 nukleusa geçerek hücre büyümesi ve metabolizmasıyla ilişkili genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirir. Aktive olan MEK aynı zamanda p38 proteinini de tetiklemektedir. Ayrıca p38 aktivasyonu, ekstrasellular alandan gelen çeşitli stres faktörleri, UV gibi DNA hasarı oluşumunu indükleyen faktörler tarafından da gerçekleşmektedir (Şekil 7) [48].



Şekil 7. MAPK sinyal yolağı.

3.4.4. Onkogenler

GH sinyali hücrenin büyüme, sağ kalım ve farklılaşma gibi biyolojik süreçlerde rol oynayan çeşitli genlerin transkripsiyonel regülasyonunu da sağlamaktadır. Bu aşamada görevli proto-onkogenlerden bazıları c-fos ve c-jun'dur. GH/GHR/JAK2 sinyali ile aktive olan MAPK, PI3K ve STAT sinyal yollarında fonksiyonel transkripsiyon faktörleri nukleusa göç ettiklerinde c-fos ve c-jun onkogenlerinin transkripsiyonunu da tetiklemektedir. Bu proteinlerin de varlığında oluşan aktivatör protein-1 (AP-1) kompleksi oluşmaktadır. AP-1 kompleksi transkripsiyon faktörü olup sitokinler, büyüme faktörleri veya stres gibi uyarılara karşı verilen cevapta fonksiyonel genlerin anlatım düzeyini regüle etmektedir. Bununla özellikle kanser hücrelerinde invazyon ve metastazı tetiklemektedir (Şekil 8) [49].



Şekil 8. Proto-onkogenlerin transkripsiyonel regülasyonu

3.5. İNVAZYON ve METASTAZ

3.5.1. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)

Meme kanseri tedavi yöntemlerinin kısa vadede etki göstermesinin sebeplerinden biri kanseri hücrelerinin yüksek invazyon ve metastaz ektivitesine sahip olmasıdır. Kötü huylu kanser hücrelerinin çoğu ekstrasellular matriks (ECM) degradasyonunu gerçekleştirir, dolaşıma katılır ve vücutta meme kanseri için özellikle kemik gibi farklı bölgelere trasnlokasyon gerçekleştirerek sekonder tümör yapılarını oluşturmaktadır.

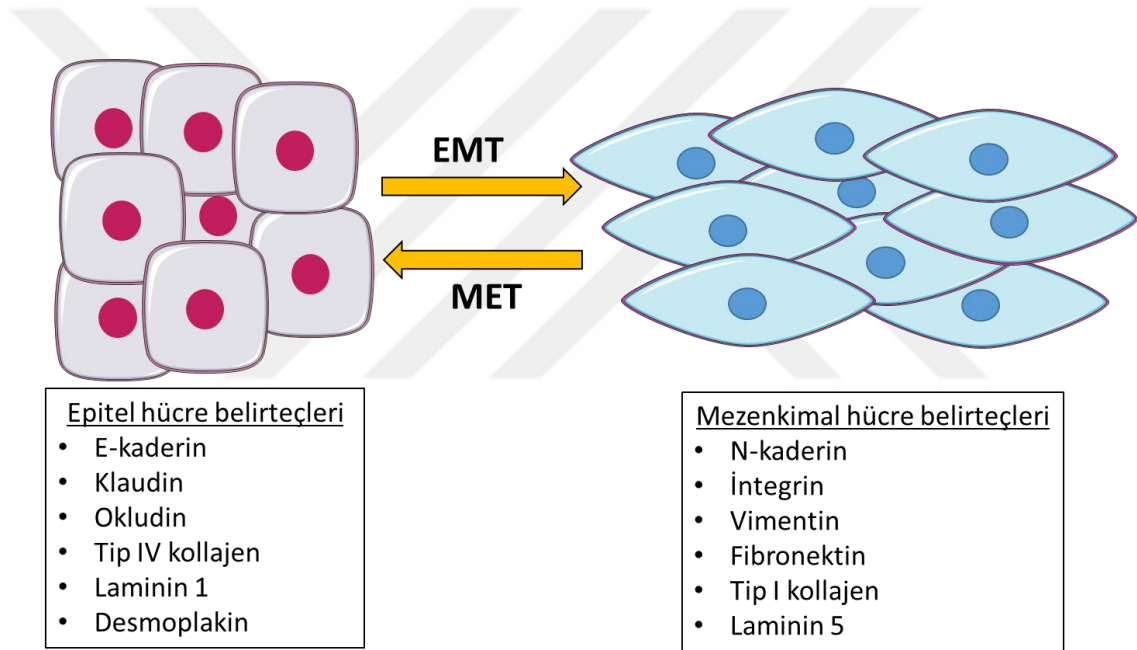
ECM degradasyonunu gerçekleştiren enzimler kanseri hücreleri tarafından inaktif olarak sentezlenir, aktive formunda hücreden salınırlar. Bu enzimler matriks metalloproteinazlar olarak adlandırılır. MMP ailesi yirmi üyeyi içeren dört gruptan oluşmaktadır. Birinci grup doku içi kollojenazlar olup MMP1, 8 ve 13'ten oluşur. İkinci grup tip 4 kollojenazlar olup MMP2 ve 9'dan oluşur. Üçüncü grup stromelysin olup MMP3, 7, 10, 11, ve 18'den oluşur. Dördüncü grup ise membran tipi MMP'ler olup MMP14, 15, 16, 17, 24 ve 25'ten oluşur [50]. Membran bileşenlerinin en önemlisi olan kollajen 4'ün kesilimini gerçekleştiren MMP9 anlatımının meme kanseri gelişimi sürecinde artış gösterdiği saptamıştır. MMP2 aşırı anlatımı da birçok kanser çeşidinde görülmektedir. MMP'lerin dört adet endojen spesifik inhibitörü (TIMP) bulunmaktadır. Bunlar TIMP-1, -2, -3 ve -4'tür. TIMP'lar MMP'lerin latent formlarına bağlanarak proteaz aktivitesini engellemektedir. Böylece ECM degradasyonunu inhibe edilmektedir. TIMP-1 MMP9'a TIMP-2 ise MMP2'ye spesifik olarak bağlanıp inhibisyonlarını gerçekleştirmektedir [51].

3.5.2. Epitel Mezenkimal Geçiş (EMT)

Meme kanseri gelişiminde epitel hücre profiline sahip kanser hücreleri polarite ve şekillerini kaybederek primer tümör yapısından ayrılabilir. İntravazyon ile ECM degradasyonuna sebep olmakla birlikte ve kan damarlarına girmektedir [52]. Eksravazyon ile sekonder tümör yapısını oluşturmaktadırlar. Bu süreçte yüksek invazyon ve metastaz aktivitesine sahip olan kanser hücreleri epitel hücre belirteçlerinin anlatımının azalması ile birlikte epitel hücre profilini kaybederler, mezenkimal hücre belirteçlerinin anlatımının artışı ile ise mezenkimal hücre profili kazanmaktadırlar, bu dönüşüm EMT olarak adlandırılır [53]. Mezenkimal hücre profiline sahip olan kanser hücreleri sekonder tümör yapısını oluştururken ise epitel

hücre profiline dönüşmektedirlerdir. Epitel hücre belirteçleri E-kaderin, klaudin, okludin, tip IV kollajen, laminin 1 ve desmoplakin iken mezenkimal hücre belirteçleri N-kaderin, integrin, vimentin, fibronektin, tip I kollajen ve laminin 5'tir [54]. (Şekil 9).

EMT geçişinin regülasyonu Slug, Snail, Zeb1, Zeb2 ve Twist gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu transkripsiyon faktörleri ise büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından tetiklenmektedir. Yapılan çalışmalarla meme epitel hücrelerine büyüme faktörü veya kimyasal uyanlarla EMT sürecinin tetiklendiği ve bu durumun meme kanseri tedavisini zorlaştırdığı belirlenmiştir. EMT sürecinde fonksiyonel çeşitli belirteçler üzerine geliştirilen tedavi yöntemlerinin ise bu aşamada gelecek vaad etmektedir [55].



Şekil 9. Epitel ve mezenkimal hücre belirteçleri.

3.6.NF-κB SİNYAL YOLAĞI

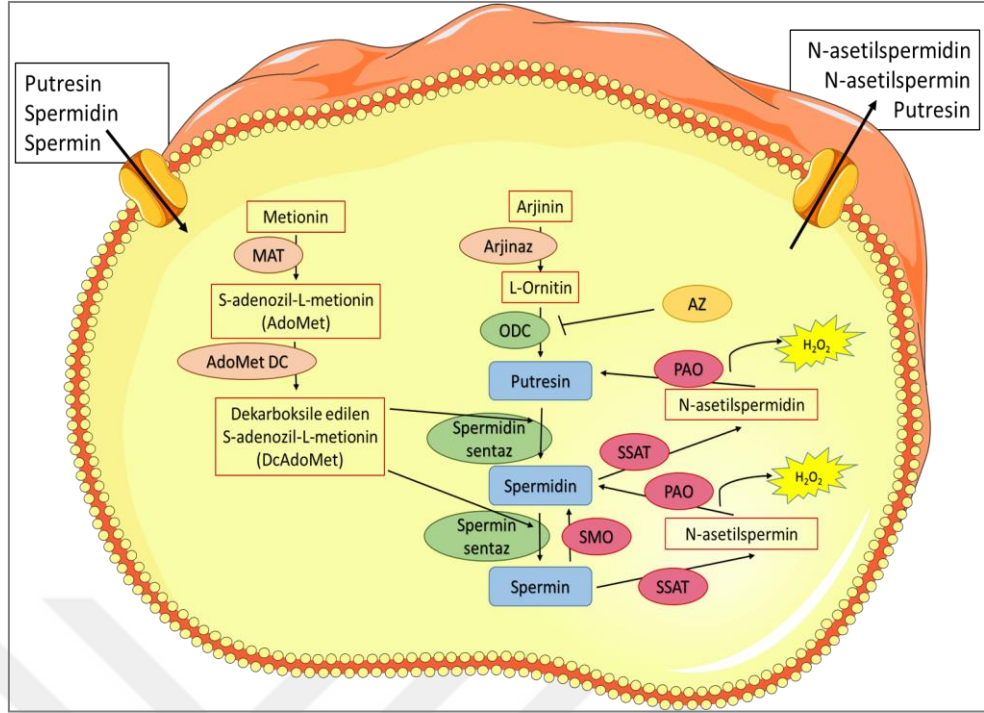
NF-κB transkripsiyon faktörü ailesi olup immun cevap, inflamasyon, hücre büyümesi, sağkalımı, gelişimi, metastaz ve invazyon gibi süreçlere dahil olmaktadır. Memelilerde NF-κB ailesi RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 p50 ve NF-κB2 p52 olmak üzere beş üyeden oluşmaktadır. Bu üyeler kendi aralarında homodimer veya heterodimer yapıları oluşturarak nukleusa göç ederler ve transkripsiyon faktörü olarak işlev görmektelerdir. NF-κB sinyal yolağı iki alt yolağı ayrılmaktadır, bunlar klasik ve alternatif sinyal yolaklarıdır [56].

Klasik yolak pro-inflamatuar sitokinler tarafından tetiklenmektedir. Sinyal tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörüne bağlı olarak iletilmektedir. Bu noktada önem teşkil eden moleküllerden biri IκB kinaz kompleksi (IKK)'dir. Bu kompleks IKKα, IKKβ ve NEMO proteinlerinden oluşmaktadır. Aktive olan IKK molekülü IκBα proteinini serin32 ve 36 bölgelerinden fosforile ederek ubikuitinasyona bağımlı proteozomal degradasyonunu gerçekleştirmektedir [57]. Normal şartlarda p65 proteinini sitoplazmada p105 ve IκBα ile birlikte kompleks halinde inaktif şekilde bulunmaktadır. IKK tarafından IκBα'nın fosforilasyonu ile aktive olan p65 molekülü p50 ile birlikte heterodimer oluşturarak nukleusa göç etmektedir. Nukleusa göç eden p65/p50 kompleksi hücrede proliferasyon, sağklım, hücre döngüsü, sitokin sentezi ve apoptoz ile ilişkili genlerin transkripsiyonel regülasyonunu gerçekleştirmektedir [58].

Alternatif yolak ise sitokinler veya virüsler tarafından tetiklenmektedir. Sinyal TRAF proteinleri üzerinden NF-κB indükleyici kinaza (NIK) iletilir. Aktive olan NIK proteini IKKα'dan oluşan homodimer kompleksini fosforile ederek aktivasyonunu sağlamaktadır. IKKα kompleksi p100 alt ünitesini fosforile ederek ubikuitinasyon ile degradasyonunu tetikler. Degrede olan p100 proteininden p52 alt ünitesi oluşur ve RelB alt ünitesi ile birlikte heterodimer oluşturarak nukleusa göç etmektelerdir. Nukleusa göç eden p52/RelB kompleksi hücrede doğal bağışıklık, B hücre olgunlaşması ve sağkalımı ve kemokin sentezinde görevli genlerin transkripsiyonel düzeyde regülasyonunu gerçekleştirmektedir (Şekil 10) [59].

Poliamin biyosentezinde görevli iki önemli enzim bulunmaktadır. Bunlar ornitin dekarboksilasyonu ile Put sentezinde görevli pridoksal fosfata bağımlı ornitin dekarboksilaz (ODC) ve S-adenozil-L-metionin (AdoMet) dekarboksilasyonu ile dekarboksile S-adenozil-L-metionin (DcAdoMet) sentezinde görevli S-adenozil-L-metionin dekarboksilaz (AdoMetDc) enzimidir. ODC enziminin regülasyonu antizim (AZ) olarak adlandırılan enzim tarafından gerçekleştirilmektedir. AZ ODC ile direkt interaksiyona girerek inhibisyonunu sağlamaktadır. Bunun yanısıra AZ enzimi de antizim inhibitörü (AZI) tarafından regüle edilmektedir [63]. Bunlara ek olarak spesifik aminopropil transferaz enzimlerinden spermidin sentezinde görevli spermidin sentaz (SPDS) ve spermin sentezinde görevli spermin sentaz (SMS) enzimleri de bulunmaktadır. Bu sentez reaksiyonları putresine aminopropil gruplarının eklenmesi ile gerçekleşmektedir. Hücre içerisindeki bu biyosentez reaksiyonlarının yanısıra Put, Spd ve Spm transport sistemleri ile de hücre içerisine alınabilmektedir [64].

Poliamin katabolizmasında görevli önemli enzimler ise spermidin/spermin N-asetil transferaz (SSAT), poliamin oksidaz (PAO) ve spermin oksidaz (SMO)'dır. SSAT spermine asetil grubu transfer ederek N-asetilspermini oluşturmaktadır. N-asetilsperminin PAO enzimi tarafından oksidasyonu gerçekleştirilir ve spermidin oluşturulur. Sperminden spermidin oluşumu SMO enzimi tarafından direkt olarak katalizlenebilmektedir. Spermidin SSAT enzimi tarafından asetil grubu transfer edilir ve N-asetispermidin meydana gelir. PAO enzimi tarafından oksidasyonu gerçekleştirilerek putresin oluşturulur. N-asetilspermin ve N-asetilspermidin ile putresin direkt olarak membran transportırlar aracılığı ile hücreden atılabilmektedir. Tüm bu reaksiyonlar süresince PAO enziminin aktivite gösterdiği her oksidasyon basamağında ortaya hidrojen peroksit (H_2O_2) çıkışı gerçekleşir (Şekil 7). Aşırı H_2O_2 çıkışı reaktif oksijen türlerini (ROS) arttırmakta ve kanser oluşumunu tetiklemektedir. Meme kanseri hastalarında yapılan çalışmalarda SMO, SSAT ve PAO enzim aktivitelerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Özellikle kanser hücrelerinde kaabolik enzimler tetiklenerek H_2O_2 düzeyinin artışı ile apoptotik hücre ölümünün indüklenmesi hedeflenmektedir (Şekil 11) [65].



Şekil 11. Poliamin metabolizması substratları ve görevli enzimler.

3.8.APOPTOZ

Programlı hücre ölümü olarak adlandırılan apoptoz, çeşitli biyolojik süreçlerin hayati bileşenlerini içermekle birlikte immün sistemin işleyiş ve gelişim sürecinde, embriyonik gelişimde ve kimyasal indükleyici hücre ölümünde görülmektedir [66].

3.8.1. İçsel Apoptotik Sinyal Yolağı

İçsel apoptotik yolak reseptörlerden bağımsız olarak gerçekleşir, hücrenin kendi intrasellular alanından kaynaklanan uyarının mitokondri üzerinden başlayarak iletilen sinyalin yine aynı hücrenin ölümüne neden olarak sonlanmaktadır. Apoptotik hücre ölümünde görevli iki ana protein grubu bulunmaktadır. Bunlar pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler olup özellikle BH3 domaini içeren protein ailesini içerirler. Pro-apoptotik proteinler Bak, Bax, Bid, Bim, Noxa ve Puma; anti-apoptotik proteinler ise Bcl-xL ve Bcl-2'dir. Apoptotik hücre ölümünün başlangıç ve sonlanma süreçlerinde görevli bir diğer protein ailesi ise sistein aspartat proteaz (Kaspaz) ailesidir. Başlangıç sürecinde rol oynayan kaspazlar-2, -8, -9 ve -10'dur. Sonlanma sürecinde rol oynayanlar ise kaspaz-3, -6 ve -7'dir [67].

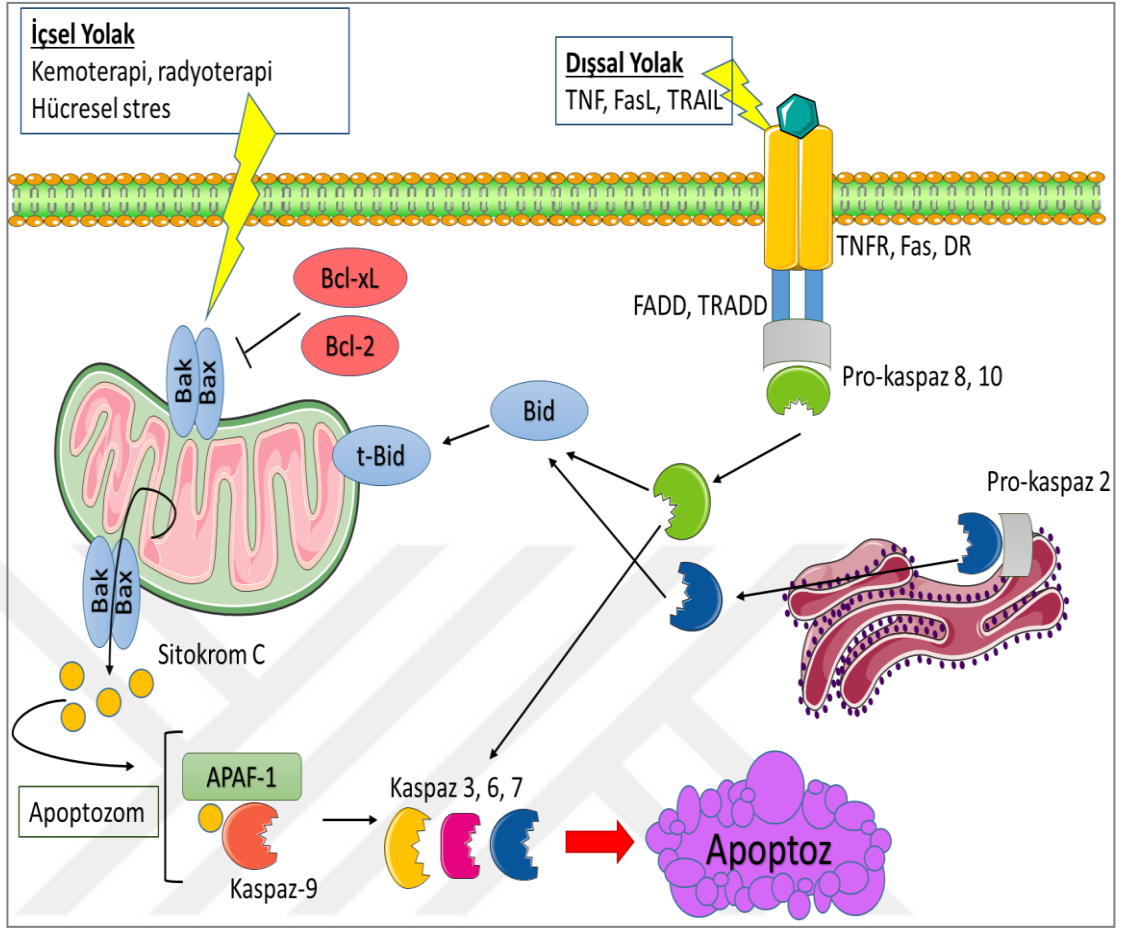
Kemoterapi, radyoterapi veya çeşitli hücresel stres varlığında pro-apoptotik proteinlerin aktivasyonu gerçekleşir. Bak ve Bax hem homodimer hem de

heterodimer yapıları oluşturarak mitokondri membranında kanal görevi görerek sitokrom C'nin sitoplazmaya salınmasını sağlarlar. Sitokrom C'nin salınması ile Apaf-1 ve pro-kaspaz-9'u içeren apoptozom kompleksi oluşur. Bu kompleksin oluşması ile kaspaz-9 aktive olur ve kaspaz-3, -6, ve -7'nin aktivasyonunu sağlayarak apoptotik hücre ölümü gerçekleşir (Şekil 12) [68].

3.8.2. Dışsal Apoptotik Sinyal Yolağı

Dışsal yolda apoptoz transmembran reseptörler aracılığı ile interaksiyona dayanmaktadır. Tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör geni süper ailesi üyeleri olan FasR, TNFR, DR3, DR4 ve DR5 reseptörlerine sırasıyla FasL, TNF- α , Apo3L ve Apo2L ligandlarının bağlanmasıyla sinyal aktivasyonu gerçekleşir. Sinyal adaptör proteinler olan FADD ve TRADD üzerinden hücre içerisine aktarılır. Pro-kaspaz-8 kesilir ve aktif formu oluşur. Kaspaz-8 aktivasyonu ile Bid kesilimi gerçekleşir ve mitokondriye geç eder. Bu aşama içsel ve dışsal yolağın kesişiminin gerçekleştiği bölümdür. Aktive olan kaspaz-8 aynı zamanda kaspaz-3, -6 ve -7'nin aktivasyonunu da gerçekleştirebilmektedir. Bunun yanı sıra hem endoplazmik retikulumun hem de Golgi aygıtının membranında lokalize olan pro-kaspaz-2'nin de aktivasyonu gerçekleşir. Kaspaz-2 de kaspaz-8 gibi Bid kesilimini tetikleyebilmektedir [69].

Hem içsel hem de dışsal apoptotik yolağın sonucunda aktive olan kaspaz-3, -6 ve -7 hücre iskeleti materyallerinin kesilimini ve DNA fragmentasyonunu gerçekleştirerek hücrede apoptotik cisimlerin oluşumu tetikler. Böylece hücrenin programlı ve kontrollü bir şekilde ölümü gerçekleşir (Şekil 12) .



Şekil 12. İçsel ve dışsal apoptotik yolak.

BÖLÜM III

4. MATERYAL ve METOT

4.1.KULLANILAN MATERYALLER

4.1.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde Tablo 1’de sunulmuştur.

4.1.2. Hücre Kültürü Donanımları

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Ekler bölümünde Tablo 2’de sunulmuştur.

4.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Çalışma sürecinde kullanılan kimyasal maddeler Ekler bölümünde Tablo 3’te sunulmuştur.

4.1.4. Kullanılan Tamponlar

4.1.4.1. 10X TBS

86,6 gr NaCl, 12,11gr Tris-Baz konulur pH: 8 e ayarlandıktan sonra distile su ile 1000ml ‘e tamamlanır. Hazırlanan 10X TBS kullanılmak için 1X TBS’e dönüştürülür.

4.1.4.2. 1X TBS-Tween

1X TBS içine 500µl Tween 20 konularak hazırlanır.

4.1.4.3. Yürütme tamponunun

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

4.1.4.4. Transfer Tamponunun

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

4.1.4.5. Yürütme Jelinin Hazırlanması

Proteinler ağırlıklarına göre ayrılmaları için %12' lik SDS poliakrilamid jelde yürütülürler. Jel içeriği Ekler bölümünde Tablo.4'te sunulmuştur.

4.1.4.6. 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.

5. YÖNTEMLER

5.1. Hücre Kültürü

MCF-7 (östrojen reseptörü pozitif, ER+) ve MDA-MB-231 (östrojen reseptörü negatif, ER-) büyüme hormonu anlatımı bulunmayan meme kanseri hücre hatları American Type Tissue Culture Collection' dan temin edilmiştir. Hücreler %10 sığır fetus serumu ve 10U/ml penisilin/streptomisin antibiyotiği içeren DMEM besiyeri 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 60 ve 100 mm'lik, poliamin izolasyonu için 60 mm'lik, RNA izolasyonu ve akış sitometresi için 6 kuyucuklu, floresan mikoskobu çalışmaları için 12 kuyucuklu hücre kültürü petrilerine ekimler gerçekleştirilmiştir. Hücreler bir gece boyunca hücre kültürü petrilerine yapıştıktan sonra kullanılan ilaç belirlenen sürelerde uygulanmıştır 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 ortamdan 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 2 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 1ml taze 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 10^4 ile çarpılmıştır. $1,5 \times 10^6$ hücre, 75 cm²'lik petri kaplarına ekilerek hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

5.1.1. Transfeksiyon

Hücreler 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisi içerisine 10×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin bir gece boyunca hücre kültürü petrisine yapışmaları beklenmiştir. İki ayrı mikrofüj tüpü içerisine 100 µl hacimde negatif DMEM (FBS içermeyen) koyulmuştur. Transfeksiyon oranı 1:3 ve 1:6 olacak şekilde GH-PC3.1 plazmiti lipozomal ajan olan FuGENE transfeksiyon ajanı kullanılmıştır. İki ayrı mikrofüj tüpüne hazırlanan plazmit ve transfeksiyon ajanı 5 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında iki mikrofüj tüpü birleştirilerek 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bir gece önceden ekimi gerçekleştirilmiş olan hücreler üzerine hazırlanan süspansiyon damla damla olacak şekilde verilmiştir. Transfeksiyondan sonraki inkübasyon süresi 24 ve 48 saat olarak gerçekleştirilmiştir. Optimum transfeksiyon işleminin gerçekleştirildiği koşul 1:3 oranda 24 saat olarak belirlenmiştir.

5.1.2. Stabil Hücre Hattı Eldesi

Transfeksiyon gerçekleştirilen hücelere artan dozlarda G418 (Neomisin) uygulaması 15 gün boyunca gerçekleştirilmiş ve 1200 ng G418 içerisinde 5 gün boyunca inkübe edilen hücrelerden stabil hücre hattı oluşturmak amacıyla tek tek koloniler seçilip büyütülmüştür. Seçilen kolonilerin her birindeki bazal GH anlatımı immunoblotlama ile belirlenmiştir ve en fazla GH anlatımına sahip olan koloni seçilerek erken pasajlarından dondurma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

5.2. GH ELISA Tekniği

MCF-7 ve MDA-MB-231 GH+ meme kanseri hücre hatlarında GH salınımını belirlemek amacıyla ELISA tekniği (ab190811-Growth Hormone (GH) Human SimpleStep ELISA Kit, Abcam) kullanılmıştır. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücresi 7×10^5 hücre olacak şekilde 60 mm'lik hücre kültürü

petrisine ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklenmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra besiyerleri alınarak ultrasantrifüj tüpünden (Amicon 10K Ultra-15 Centrifugal Filter Units) geçirildikten sonra elde edilen 200 µl hacminde örnek kullanılmıştır.

- GH antikoru 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 topmonu 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.

5.3. 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 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücresi 1×10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine ekim gerçekleştirilmiştir. Bir gece inkübasyonu takiben hücrelere (0-100 µM) curcumin 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İlaç uygulamasını 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 mikropilaka okuyucusunda ölçüm yapılmıştır.

5.4. Hücre Sağkalım Analizi

MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin sitostatik etkisini belirlemek amacıyla hücre sağkalım analizi

gerçekleştirilmiştir. 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 50×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat boyunca hücrelerin yapışması beklenmiştir. yapışan hücrelere $20 \mu\text{M}$ (MCF-7) ve $25 \mu\text{M}$ (MDA-MB-231) curcumin 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyonlar sonunda her bir kuyucuktaki hücreler tripsin ile kaldırılarak 2000 rpm ' de 5 dakika boyunca santrifüj yardımıyla çöktürülmüştür. Hücre pelleti $50 \mu\text{l}$ PBS ile homojenize edildikten sonra $50 \mu\text{l}$ Tripan mavisi boyası eklenerek hücre sayıcı alet yardımıyla sayım yapılmıştır.

5.5. Floresans Boyama

5.5.1. 3,3' Diheksiloksakarboşyanin İyodür (DiOC₆) Boyama

Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemek amacıyla DiOC₆ boyama gerçekleştirilmiştir. 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 50×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere $20 \mu\text{M}$ (MCF-7) ve $25 \mu\text{M}$ (MDA-MB-231) curcumin 24 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 1 nM DiOC₆ (ana stok: 4 mM) 30 dakika boyunca uygulanarak fluoresan mikroskobunda mavi filtre ile canlı hücreler belirlenmiştir.

5.5.2. Propidyum iyodür (PI) boyama

Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla PI boyama gerçekleştirilmiştir. 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 50×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere $20 \mu\text{M}$ (MCF-7) ve $25 \mu\text{M}$ (MDA-MB-231) curcumin 24 saat boyunca uygulanmıştır. 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.

5.5.3. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama

Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla DAPI boyama gerçekleştirilmiştir. 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 5×10^4 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 uygulanmıştır. İnkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 1µl/ml DAPI boyası 30 dakika uygulanmıştır.

5.5.4. Diklorofloresin diasetat (DCFH-DA) Boyama

Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) birikimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla DCFH-DA boyaması sonrasında akış sitometresi gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrilere 2×10^5 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 uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda hücrelere 1 µl DCFH-DA (10 µM) boyası uygulanarak 15 dakika etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler floresan mikroskopunda görüntülenmiştir. Sonrasında hücreler tripsin yardımıyla kaldırılarak 1X PBS içerisinde homojenize edilmiştir ve akış sitometresinde okutulmuştur.

5.6. Hücre Akış Sitometresinde PI Analiz

Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkisini belirlemek amacıyla PI boyaması sonrasında akış sitometresi gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrilere 2×10^5 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 uygulanmıştır. 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. İnkübasyon sonunda etanol uzaklaştırılarak 1ml 1X PBS içerisinde 1µl PI (1 mg/ml) boyası olacak şekilde boyama yapılmıştır. Hücreler karanlıkta 30 dakika boyunca bekletildikten sonra akış sitometresi aletinde okutma yapılmıştır.

5.7. Annexin V/PI Boyama

MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla FITC annexin V apoptoz belirleyici kit kullanılmıştır. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 2×10^5 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 uygulanmıştır. Hücreler tripsin yardımıyla kaldırılarak annexin V ve PI floresan boya ile boyandıktan sonra 15 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. inkübasyon sonunda akış sitometresi aletinde okutma yapılmıştır.

5.8. Koloni Oluşum Analizi

Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkisini belirlemek amacıyla koloni formasyon tekniği kullanılmıştır. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 5×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece yapışması beklenen hücrelere 20 μM (MCF-7) ve 25 μM (MDA-MB-231) curcumin 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda her bir kuyucukta bulunan besiyeri normal besiyeri ile değiştirilmiştir. Hücreler 10-15 gün boyunca büyümeye bırakıldıktan sonra hücreler soğuk %100 metanol ile fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrasında kristal viyole ile boyama yapılmıştır.

5.9. Yarı Akışkan Agar Yöntemi

Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde 3 boyutlu ortam içerisinde koloni oluşumu üzerine etkisini belirlemek amacıyla soft agar tekniği kullanılmıştır. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine %0,5'lik agar ve %20 FBS içeren besiyeri 1:1 oranda hazırlanarak dökülmüştür. Agar donduktan sonra 3×10^4 hücre, %0,3'lük agar ve ilaçlı örneklerde ek olarak 20 μM (MCF-7) ve 25 μM (MDA-MB-231) curcumin eklenecek alt agarın üzerine ekim yapılmıştır. 10-15 gün inkübasyon sonrasında koloni çapları ışık mikroskobu ve DiOC₆ boyama ile belirlenmiştir.

5.10. Yara İyileşmesi Yöntemi

Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde yara iyileşme potansiyeli üzerine etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrilere 3×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra steril

200 µl'lik pipet ucu ile petri kapında bir yara oluşturulur. 0, 24 ve 48 saat boyunca yara uzunluğunun değişimi ölçülmüştür.

5.11.İnvazyon ve Metastaz Tayini

Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde invazyon ve metastaz üzerine etkisini belirlemek amacıyla BD BioCoat matrijel invazyon odacıkları kullanılmıştır. Odacıklar içersine 25×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Odacıklar 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisi içerisinde bulunmaktadır. 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisi içerisinde %5 FBS içeren besiyeri bulunur iken odacıklar içerisinde %0,5 FBS içeren besiyeri bulunmaktadır. Hücre ekimi gerçekleştirilirken ilaçlı örneklerle curcumin eklenerek ekim gerçekleştirilmiştir. 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasında hem odacıkların içerisi hem de 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisinin içerisi ışık mikroskobu yardımıyla görüntülenmiştir.

5.12.Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Analizleri

MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin Matriks Metalloproteazların (MMP) mRNA düzeyi üzerine etkisi belirlenmiştir. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 3×10^5 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 uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler kazıyıcı yardımıyla kaldırılarak Trizol ajanı ile RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'lar %2'lik agaroz jelde yürütülerek görüntüledikten sonra iScript cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir. cDNA'ların spektral analizleri yapıldıktan sonra MMP-2, MMP-9, TIMP-1, VEGF-a ve 18S RNA PCR primerleri ile ExPrime Taq Polimeraz kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primerlerin optimum bağlanma sıcaklıkları Tablo 1'de belirtilmiştir. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra transluminatörde görüntülenmiştir.

**Tablo 2. RT-PCR’da kullanılan primerlerin optimum bağlanma sıcaklıkları.
Forward: F, Reverse: R**

Primer	Primer Dizileri	Bağlanma Sıcaklığı (°C)
MMP-2	F:GGCTGGTCAGTGGCTTGGGGTA R:AGATCTTCTTCTTCAAGGACCGGTT	51
MMP-9	F:GCGGAGATTGGGAACCAGCTGTA R:GACGCGCCTGTGTACACCCACA	65
TIMP-1	F:ACCATGGCCCCCTTTGAGCCCCTG R:TCAGGCTATCTGGGACCGCAGGGA	65
VEGF- α	F:ATTGGAGCCTTGCCTTGCTG R:CACGTCTGCGGATCTTGAC	65

5.13.Total Protein İzolasyonu

60 mm’lik hücre kültürü petrilere 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca yapışmaları beklendikten sonra hücrelere 20 μ M (MCF-7) ve 25 μ M (MDA-MB-231) curcumin 24 saat boyunca uygulanmıştır. 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.

5.14.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 çözültisi eklenerek 595 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüş, elde edilen proteinlerden 1 μ g/ μ l alınarak aynı dalga boylarında absorbansları belirlenmiştir. Standartların absorbans/konsantrasyon grafiği elde edildikten sonra, bu grafiğin eğim

eşitliliği kullanılarak absorbans değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

5.15.İmmunoblotlama Yöntemi

5.15.1. Proteinlerin Hazırlanması ve SDS-PAGE’de Yürütülmesi

İmmunoblotlama yöntemi için 30 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.

5.15.2. 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 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilerek bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir.

5.15.3. Primer ve Sekonder Antikor İşaretlemeleri 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 Tween20 içeren 1X TBS) içinde aşağıda belirlenen dilusyonlarda uygulanmışlardır:

β-aktin, β-tubulin, GAPDH, GH, JAK2, pJAK2 (Tyr1007/1008) (Santa Cruz, poliklonal anti keçi ve fare), STAT5, pSTAT5 (Try694), STAT1, pSTAT1 (Try701), STAT3, pSTAT3 (Try705), Ras, c-Raf, c-Fos, c-Jun, c-Myc, Src, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, Snail, β-catenin, NF-κB p65, p-NF-κB p65 (Ser536), IKBa, pIKBa (Ser32/36), pIKKα/β (Ser 176/180), PPARγ (CST, poliklonal anti tavşan), ODC, AZ, AZI, SSAT, PAO, PI3K, Akt, pAkt (Ser473), pBad (Ser136), p38 MAPK,

p-p38 MAPK, p44/42, PARP, kaspaz-9, kaspaz-7, kaspaz-2, kaspaz-8, Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Puma (CST, poliklonal anti tavşan). Her bir antikor super block T-20 çözeltisi ile (Pierce) 1:250-1:1000 aralığında çalışılmıştır. HRP-konjuge sekonder antikorlar 1:3000 aralığında çalışılmıştır (CST).

Primer antikorların uygulanmasını takiben membranlar 5'şer dakika boyunca oda sıcaklığında 3 kez TBS-Tween ile yıkanmıştır. Yıkama sonunda, membranlar anti-tavşan ve anti-fare ikincil antikorlar (1:3000) ile gece boyu +4°C sıcaklıkta bekletilmiştir. İkincil antikor uygulamasının ardından, 8'ar dakikalık 2 TBS-Tween ve 8 dakikalık TBS yıkaması sonrasında, örnekler kemiluminisans tampon (A ve B çözeltilerinin 1:1 karışımı) ile 1 dakika muamele edilmiştir. Membranlar kemiluminisans tamponu ile bekletildikten sonra, transluminatör aletinde görüntülenmiştir.

5.16. Poliamin Miktarlarının Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Tayini

1×10^6 sayıda hücre 60 mm'lik petri kaplarına ekilerek, bir gece boyunca yapışmaları beklenir. Hücrelere daha sonra 20 μM (MCF-7) ve 25 μM (MDA-MB-231) curcumin uygulanmıştır. PA içeriklerinin belirlenebilmesi için öncelikle hücreler 1X PBS ile yıkanmış, daha sonra kazıyıcı yardımı ile kazınarak kaldırılmış ve santrifüj tüplerinde toplanmışlardır. Tüpler daha sonra 13200 rpm'de bir dakika boyunca çöktürülmüş ve benzoilasyon işlemine geçilmiştir.

Hücre pelleti 1 ml 1X PBS içerisinde homojenize edildikten sonra 100 μl TCA (Trikloro asetik asit) eklenmiştir. Hücrede bulunan polimer maddeler çöktürülerek hücredeki monomerik bileşikler ortaya çıkartılmıştır. Çözeltinin pH'ı 2M NaOH ile yükseltilerek 10 μl Benzil klorür ile muamele edilip poliaminlere benzil halkası bağlanması sağlanmıştır. Daha sonra doymuş 5M'lık NaCl çözeltisi ile muamele edilerek diğer monomerlerin ve artıkların çökmesi sağlanmıştır. Dietileter içerisinde poliaminler çözündürüldükten sonra dietileter ile sağlanan faz ayrımı vasıtasıyla poliaminler ayrılır. Konsantratör ile uçurma yapılarak uzaklaştırılan dietileter, poliaminlerin dipte çökmesini sağlamaktadır. Kristal formda bulunan poliaminler %60'lık metanol içerisinde çözündürüldükten sonra Applied Biosciences HPLC (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) sistemi kullanılarak poliamin seviyeleri ölçülmüştür. Alınan sonuçlar, belirli poliamin seviyelerine göre elde edilen standart grafiğinin formülüne göre hesaplanarak poliamin konsantrasyonları belirlenmiştir. Daha sonra aynı miktarda hücreyle yapılan Bradford tekniği ile belirlenen protein konsantrasyonlarına kullanılarak hücrelerdeki protein başına düşen poliamin miktarı cinsinden poliamin seviyeleri bulunur.

BÖLÜM IV

6. SONUÇLAR

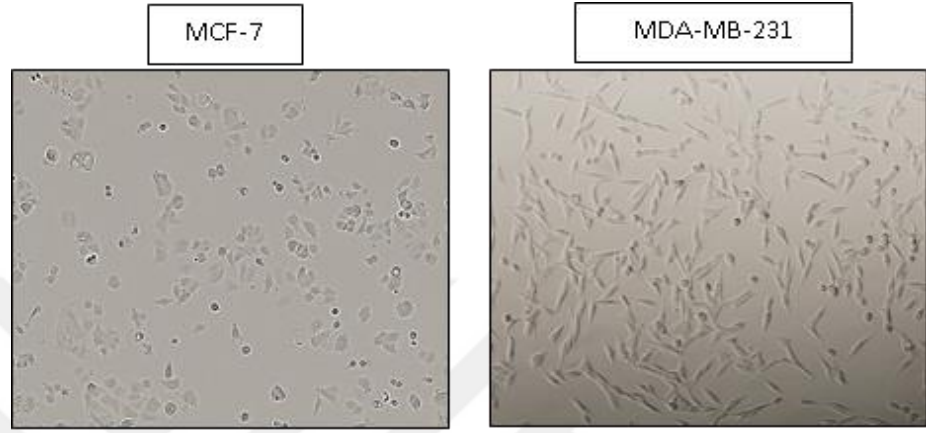
6.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında GH,GHR, GHRH, GHRHR, Prolaktin ve IGF-1 anlatımı

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında çalışma kapsamında seçilmiş olan GH, GHR, GHRH, GHRHR, Prolaktin ve IGF-1 genlerinin anlatım durumları RT-PCR ve immunoblotlama teknikleri kullanılarak tespit edilmiştir. Genotipik sınıflandırılması Tablo 3'te yapılmıştır. Her iki meme kanseri hücre hattında da GH anlatımı bulunmamakla birlikte çalışma kapsamında her iki meme kanseri hücre hattına da PC3.1-GH plazmiti kullanılarak GH geninin transfeksiyonu yapılmış ve stabil hücre hatları oluşturulmuştur.

Tablo 3. Çalışma kapsamında kullanılan meme kanseri hücre hatlarında GH, GHR, GHRH, GHRHR, Prolaktin ve IGF-1 anlatım durumlarının gösterilmesi.

Hücre Hattı	Gen Anlatım Durumu			
	GH	GHR	GHRH	GHRHR
MCF-7	-	+	-	+
MDA-MB-231	-	+	+	+

Çalışma kapsamında ER+ MCF-7 ve ER- MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları kullanılmıştır. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ER- profile sahip olmasından kaynaklı MCF-7 hücre hattına oranla daha agresif bir fenotipe göstermektedir. Işık mikroskobu görüntüleri incelendiğinde ise MCF-7 hücre hattı yuvarlak hücre morfolojisine sahip iken MDA-MB-231 hücre hattı mekiksi hücre morfolojisine sahip olduğu görülmektedir (Şekil 13).



Şekil 13. Çalışma kapsamında kullanılan MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının ışık mikroskobu görüntüleri.

6.2. PC3.1-GH plazmiti aracılığı ile MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde otokrin GH anlatımının gösterilmesi

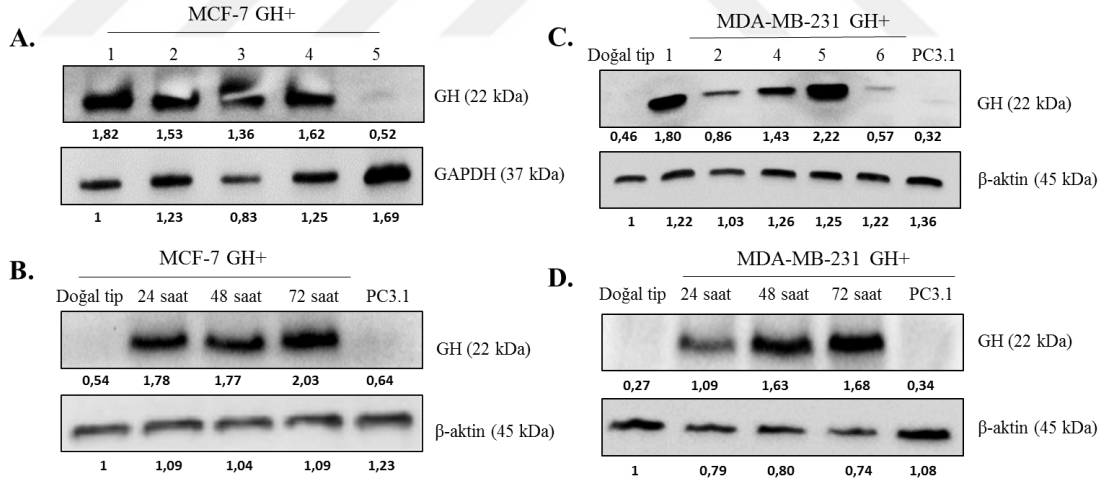
MCF-7 ve MDA-MB-231 GH+ hücre hatlarında GH anlatımının belirlenmesi için immüno blotlama tekniği kullanılmıştır. MCF-7 ve MDA-MB-231 GH+ hücre hattındaki klonlar arasından seçim yapmak amacıyla en fazla GH anlatımı olan klonlar tercih edilerek çalışmalara devam edilmiştir (Şekil 14A).

MCF-7 GH+ hücre hattındaki 5 numaralı klonda GH anlatımı olmadığından elenmiştir. Kontrol grubu olan GAPDH ile karşılaştırmalı bakıldığında 1, 2 ve 4 klonlarında GH anlatımı orantılı olduğundan bu klonlar tercih edilmiştir. Otokrin GH anlatımı kazandırılan bu klonlarda zamana bağlı olarak GH anlatımını belirlemek amacıyla 24, 48 ve 72 saatlerde 3. klonlarından protein izolasyonu yapılmış ve SDS-PAGE jelde yürütülerek GH anlatımına bakılmıştır. Seçilen 3. kolonide ise özellikle 48 saatte GH anlatımının arttığı görülmüştür (Şekil 14B).

Çalışmada kullanılan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında GH anlatımı bulunmaması ile birlikte GH-PC3.1 plazmiti kullanılarak hücrelerde otokrin GH anlatımı kazandırılmıştır. Transfeksiyon sonrası plazmit içerisinde bulunan neomisin direnç geni vasıtasıyla seçim gerçekleştirilmiştir. Seçim sonrası 5 farklı koloni

seçilip protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Proteinler SDS-PAGE jelde yürütülüp PVDF membrana transfer edildikten sonra GH antikoru kullanılarak GH anlatım düzeyleri belirlenmiştir (Şekil 51). İmmunoblotlama sonucuna göre 1. ve 5. klonlardaki transfeksiyon etkinliğinin yüksek olduğu görülmüştür. 2., 4. ve 6. klonlarda ise bu etkinliğin düşük olduğu belirlenmiştir. 1. ve 5. klonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise 5. klondaki GH anlatımının daha fazla olması nedeniyle bu klon seçilmiş ve stabil hücre hatları oluşturulmuştur. Bunun yanı sıra doğal tip MDA-MB-231 hücrelerinde ve boş vektör olarak kullanılan PC3.1 plazmiti transfekte edilmiş hücrelerde GH anlatımının bulunmadığı görülmüştür (Şekil 14C).

Otokrin GH anlatımı gerçekleştirilen MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde zamana bağlı olarak GH anlatımındaki değişimi belirlemek amacıyla hücreler 60 mm'lik petrilere ekildikten 24, 48 ve 72 saat sonrasında protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Proteinler SDS-PAGE jelde yürütülüp PVDF membrana transfer edildikten sonra GH primer antikoru kullanılarak GH anlatım düzeyleri belirlenmiştir. İmmunoblotlama sonucuna bakıldığında, otokrin GH anlatımı gerçekleştirilen MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca GH anlatımının arttığı görülmüştür (Şekil 14D).

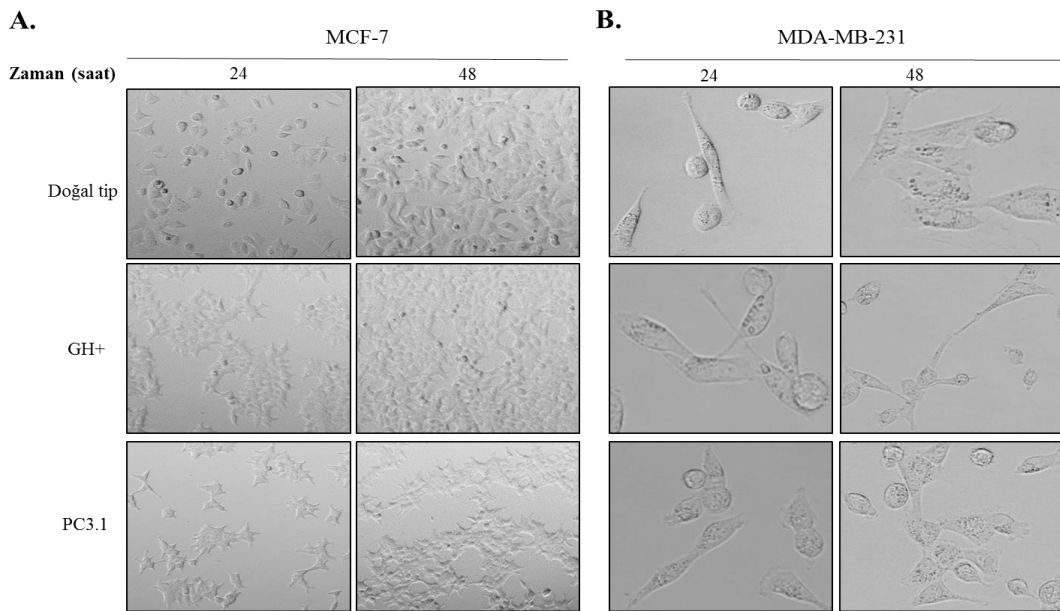


Şekil 14. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde PC3.1-GH plazmiti aracılığı ile otokrin GH anlatımı arttırılması.

6.3. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında GH'nin biyolojik aktivitesi ve salınımının gösterilmesi

Otokrin GH anlatımı gerçekleştirilen MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin morfolojik özellikleri ışık mikroskobu ile belirlenmiştir. Doğal tip ve otokrin GH anlatımı kazandırılan MCF-7 hücrelerinde zamana bağlı olarak gerçekleşen hücre büyümesi ve hücre morfolojisindeki değişiklikler 24 ve 48 saat boyunca görüntülenmiştir. Otokrin GH anlatımı kazandırılan MCF-7 hücrelerinin doğal tip MCF-7 meme kanseri hücrelerine göre daha hızlı büyüdüğü ve hücre morfolojisi olarak doğal tip hücrelere göre daha büyük olduğu gözlenmiştir (Şekil 15A).

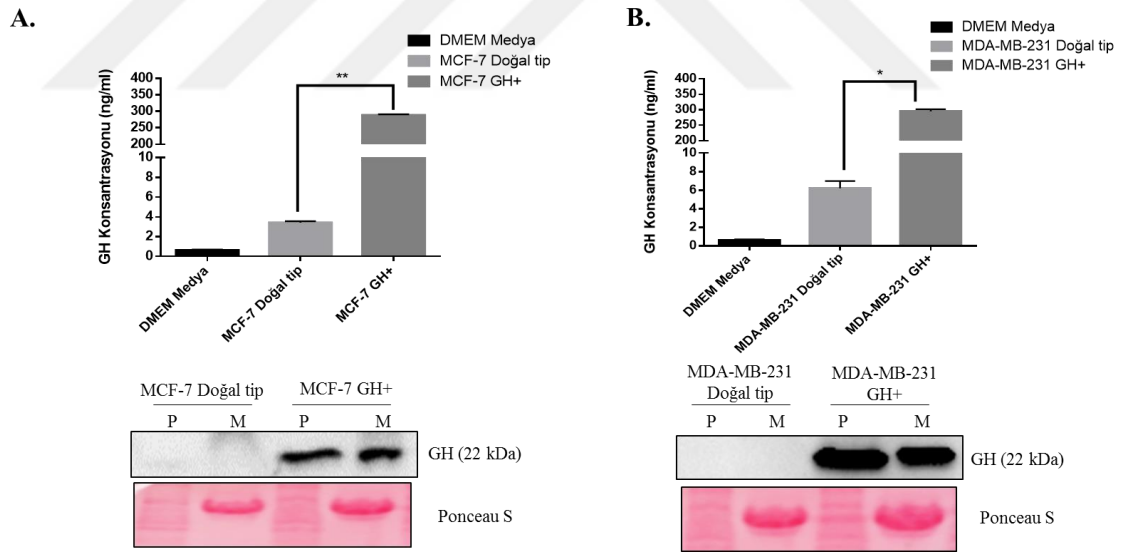
Doğal tip, otokrin GH anlatımı gerçekleştirilen ve yalnızca PC3.1 plazmiti transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerindeki morfolojik farklılıklar ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonundaki değişimler 24 ve 48 saat boyunca görüntülenmiştir. Işık mikroskobu görüntüleri incelendiğinde MDA-MB-231 GH+ meme kanseri hücrelerinde doğal tip ve PC3.1 plazmiti transfekte edilen MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyon hızının daha yüksek olduğu görülmektedir. Morfolojik açıdan incelendiğinde ise MDA-MB-231 GH+ meme kanseri hücrelerinde yabancı tip ve PC3.1 plazmiti transfekte edilen hücreler ile karşılaştırıldığında daha uzun hücresel çıkıntılarının varlığı tespit edilmiştir (Şekil 15B).



Şekil 15. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde GH'nin biyolojik aktivitesinin belirlenmesi.

MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında medyaya salınan GH seviyesini belirlemek amacıyla ELİZA ve immunoblotlama teknikleri kullanılmıştır. ELİZA sonuçlarına bakıldığında MCF-7 GH+ hücre hattının medya örneğinde yaklaşık 300 ng/ml GH salınımı mevcut iken doğal tip hücre hattında bu değer 3 ng/ml olarak belirlenmiştir. İmmunoblotlama sonucuna göre ise MCF-7 doğal tip hücre hattında hem pellet hem de medya örneğinde GH bulunmamaktadır. MCF-7 GH+ hücre hattında ise hem pellet hem de medya örneğinde GH bulunmakla birlikte medyada bulunan GH miktarının daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 16A).

MDA-MB-231 GH+ hücre hattının medya örneğinde ELİZA sonuçlarına göre yaklaşık 300 ng/ml GH bulunmaktadır. Doğal tip hücre hattının medya örneğinde ise bu değer 6 ng/ml olarak belirlenmiştir. İmmunoblotlama sonuçlarına göre doğal tip hücre hattının medya ve pellet örneğinde GH bulunmamakla birlikte GH+ hücre hattının medya ve pellet örneğinde ise yüksek miktarda GH anlatımı tespit edilmiştir (Şekil 16B).

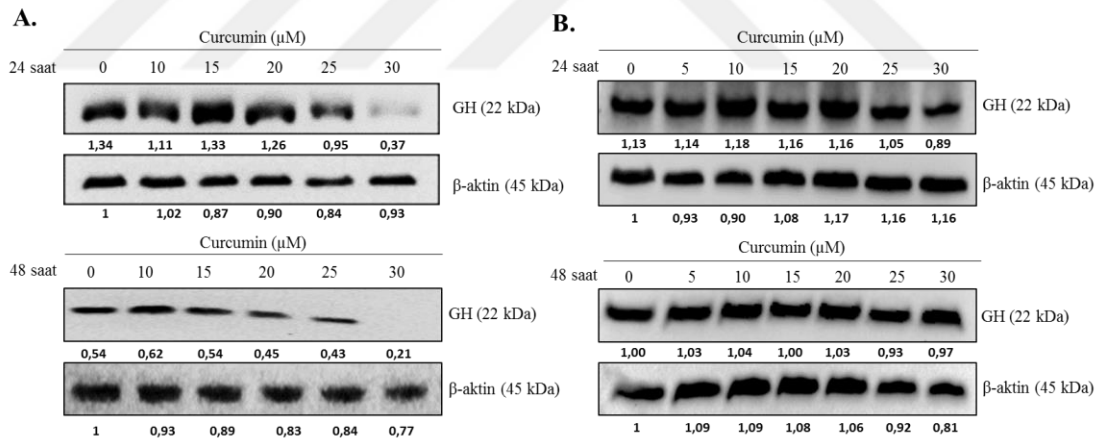


Şekil 16. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde GH'nin biyolojik aktivitesi ve medyaya salınan GH miktarının belirlenmesi. P: Pellet, M: Medya

6.4. Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında GH anlatımı üzerine etkisi

MCF-7 GH+ hücre hattında curcumin uygulamasına bağlı olarak GH anlatımındaki etkinin belirlenebilmesi amacıyla immunablottlama tekniği kullanılmıştır. GH anlatımı arttırılmış olan hücrelerde artan curcumin dozuyla beraber GH anlatımının baskılandığı görülmüştür. Özellikle 48 saat boyunca uygulanan 30 µM curcuminin GH anlatımının tamamen baskılandığı tespit edilmiştir (Şekil 17A).

Artan dozlarda (5, 10, 15, 20, 25 ve 30 µM) 24 ve 48 saat boyunca curcumin uygulaması sonrası izole edilen proteinler SDS-PAGE jelde yürütüldükten sonra PVDF membrana transfer edilerek GH ve β-actin antikoları kullanılarak anlatım düzeyleri belirlenmiştir. İmunoblottlama sonuçları incelendiğinde, MDA-MB-231 GH+ meme kanseri hücre hattında GH anlatımında kontrol grubuna oranla 5, 10, 15, 20 µM curcumin uygulanan gruplarında önemli bir değişim görülmemiştir. Ancak 25 ve 30 µM curcumin uygulanan gruplarda kontrol grubuna oranla GH anlatımında azalma görülmektedir (Şekil 17B).

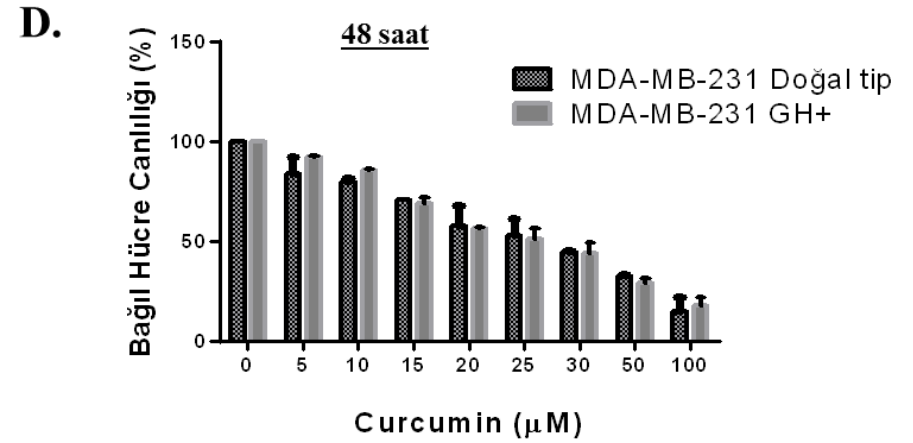
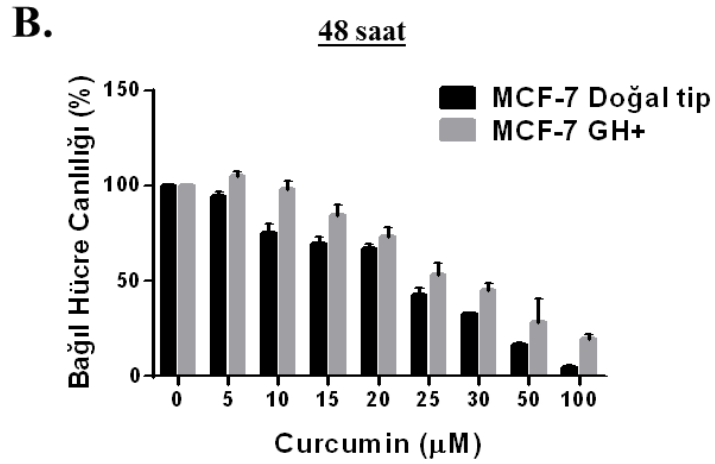
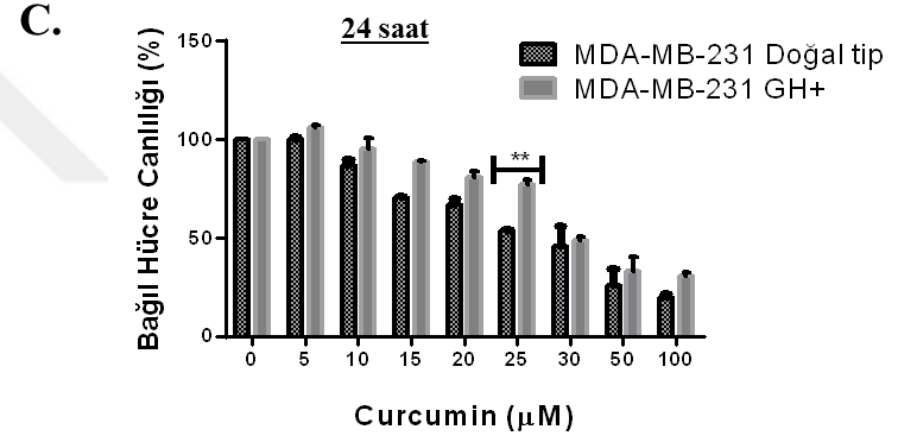
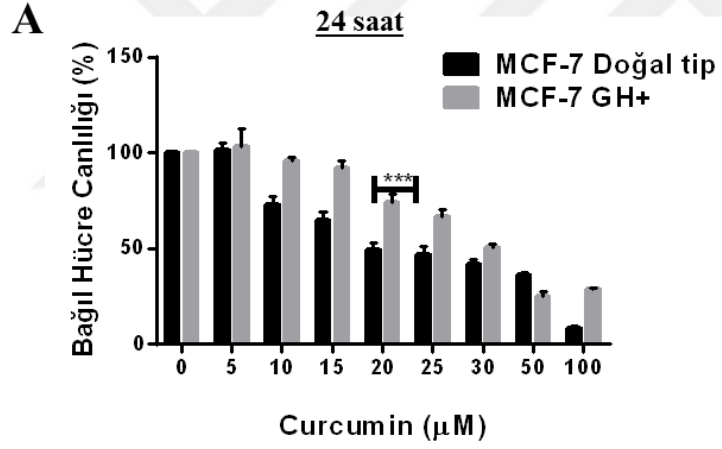


Şekil 17. MCF-7 GH+ ve MDA-MB-231 GH+ meme kanseri hücrelerinde artan dozlarda uygulanan curcuminin GH anlatımı üzerine etkisinin belirlenmesi.

6.5. Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkisi

MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarına artan dozlarda zamana bağlı olarak curcumin uygulaması ile birlikte hücre canlılığı MTT tekniği kullanılarak belirlenmiştir. 24 ve 48 saat boyunca uygulanan curcumin sonucunda hücre canlılığı artan doza bağlı olarak her iki hücre hattında da düşüş göstermektedir. MCF-7 GH+ hücre hattında doğal tip ile karşılaştırıldığında hücre canlılığında GH anlatımına bağlı olarak daha az bir düşüş belirlenmektedir. Ayrıca curcumine karşı bir direnç varlığı tespit edilmiştir. Özellikle 20 µM curcumin uygulaması ile her iki hücre hattında da % 50 hücre canlılığı tespit edilmiştir ve sonraki çalışmalarda uygulamak üzere MCF-7 hücre hattında uygun doz olarak seçilmiştir (Şekil 18A ve 18B).

MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında artan dozlarda 24 saat boyunca uygulanan curcumin ile gerçekleştirilen MTT tekniği sonucuna bakıldığında 15 µM konsantrasyona kadar uygulanan curcumin hücre canlılığında önemli derecede bir değişime neden olmaz iken, 20 µM curcumin dozundan sonraki uygulamalarda her iki hücre hattında da hücre canlılığının önemli derecede azaldığı görülmektedir. Ayrıca 20 µM ve sonraki curcumin dozlarında MDA-MB-231 GH+ hücrelerinde otokrin GH anlatımına bağlı olarak bir direnç oluşumu söz konusudur. 25 µM curcumin konsantrasyonuna bakıldığında her iki hücre hattında da yaklaşık olarak %50 canlılığın varlığı tespit edilmiştir ve curcumin ile gerçekleştirilen sonraki çalışmalarda uygun doz olarak belirlenmiştir. 48 saatlik curcumin uygulaması ile gerçekleştirilen MTT tekniği sonucuna bakıldığında ise artan dozlarda uygulanan curcuminin her iki hücre hattında da hücre canlılığını önemli derecede azalattığı görülmüştür. Bunun yanı sıra MDA-MB-231 GH+ hücre hattında 24 saatlik curcumin uygulamasında gözlemlenen direncin 48 saatlik curcumin uygulaması ile kırıldığı gözlemlenmiştir (Şekil 18C ve 18D).

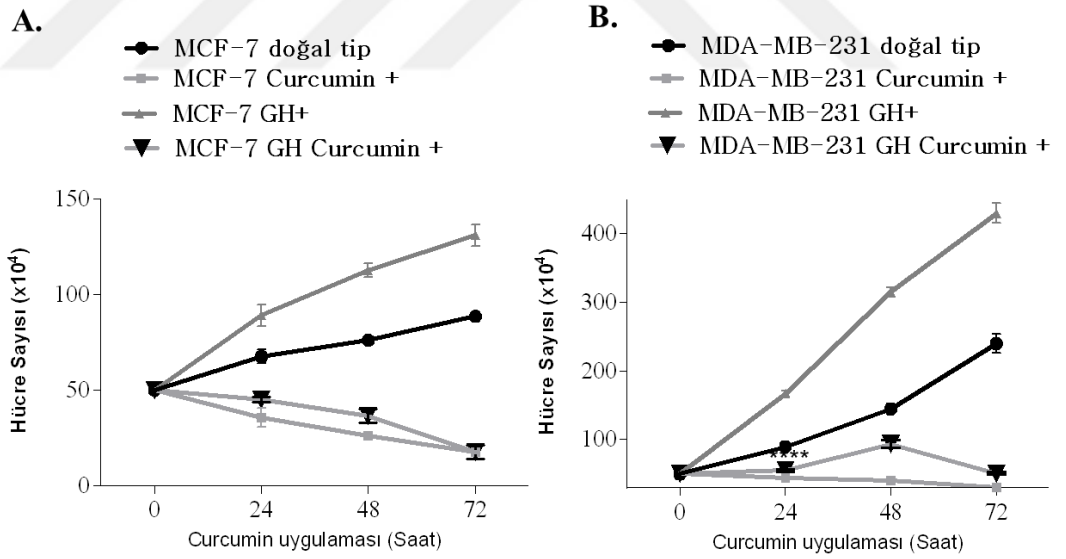


Şekil 18. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi.

6.6. Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre sağkalımı üzerine etkisi

Curcuminin hücre sağkalımı üzerindeki etkisine bakıldığında GH anlatımının MCF-7 hücrelerinde zamana bağlı olarak büyümesini arttırdığı belirlenmiştir. Curcumin uygulanan gruplara bakıldığında ise zamana bağlı olarak MCF-7 GH+ hücrelerinin doğal tip hücrelere göre sağkalım oranını daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 19A).

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında doğal tip ve GH+ hücre hatlarının kontrol grupları karşılaştırılacak olursa GH anlatımı ile birlikte hücre proliferasyonunda zamana bağlı olarak önemli derecede bir artışın varlığı belirlenmiştir. Zamana bağlı olarak uygulanan curcumin ise doğal tip hücrelerde GH anlatımı gerçekleştirilen hücreler ile karşılaştırıldığında hücre sağkalımında bir düşüş olduğu görülmüştür. 48 saatlik curcumin uygulaması sonrasında ise GH anlatımı gerçekleştirilen MDA-MB-231 hücrelerinde de direncin kırıldığı ve hücre canlılığının azaldığı görülmüştür (Şekil 19B).



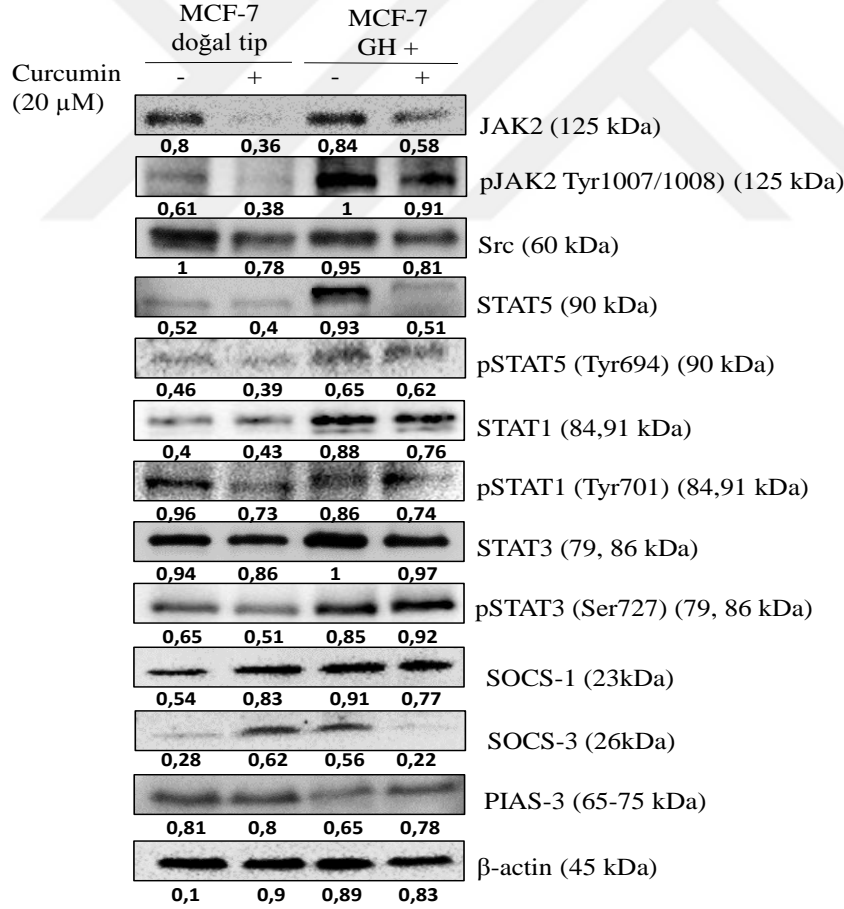
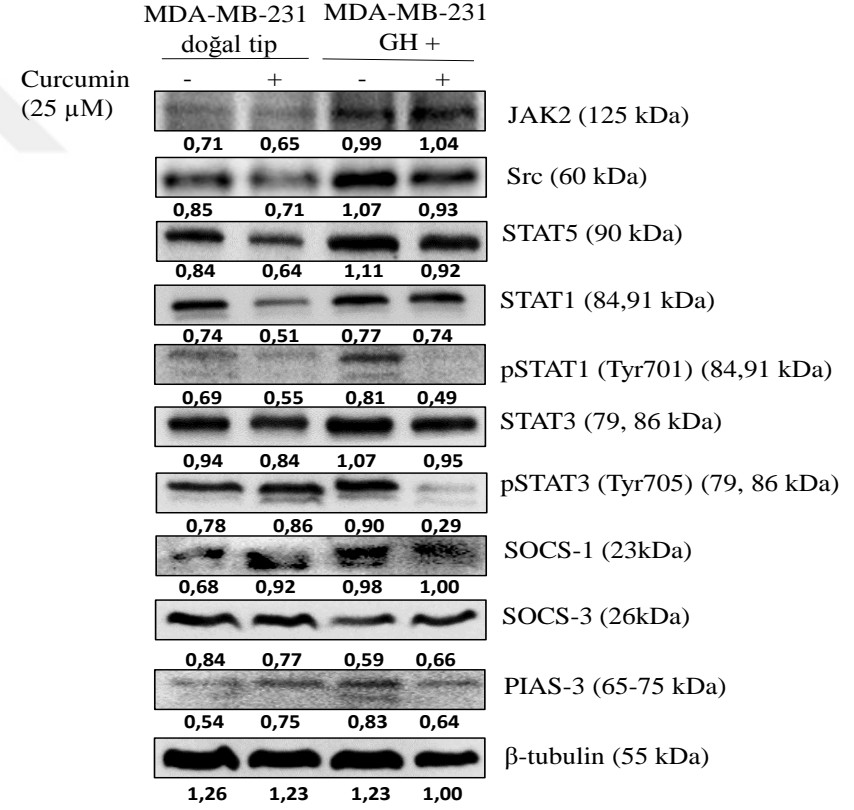
Şekil 19. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin hücre sağkalımı üzerine etkisinin gösterilmesi.

6.7. Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında JAK/STAT sinyal yolağı üzerine etkisi

MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin, GH'nin GHR'ye bağlanmasıyla aktive olan JAK/STAT sinyal yolağı üzerine etkisini belirlemek amacıyla immunoblotlama tekniğı kullanılmıştır.

GH geni aktarılan her iki meme kanseri hücre hattında da doğal tip hücrelere oranla JAK2 ve STAT5 aktivitesinde artış saptanmıştır. 24 saat boyunca uygulanan curcuminin MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında hem JAK2 anlatımını hem de JAK2'nin tirozin 1007/1008 bölgesinden fosforilasyonunu baskıladığı görülmüştür. JAK2 ile benzer göreve sahip olan Src kinazının anlatımı ise curcumin uygulaması ile her iki meme kanseri hücre hattında da baskılanmaktadır. MCF-7 doğal tip hücre hattında curcumin uygulaması sonrası STAT5 fosforilasyonunun baskılandığı görülmüştür ancak GH+ hücre hattında bu etki görülmemektedir. MCF-7 hücre hattında GH geninin kazandırılması ile özellikle STAT3 ve STAT5 fosforilasyonun indüklendiğı, STAT1 anlatımının baskılandığı görülmüştür. STAT inhibitörlerinden SOCS-1 anlatımı curcumin uygulaması ile birlikte doğal tip hücrelerde artarak pSTAT1 üzerinde baskılayıcı etki oluşturmaktadır. GH+ hücre hattında ise önemli derecede değışim tespit edilmemiştir. pSTAT3 inhibitörü olan SOCS-3 anlatımı ise doğal tip hücrelerde artarken GH+ hücrelerde azalmaktadır. Bir diğere pSTAT3 inhibitörü olan PIAS-3 ise doğal tip hücrelerde curcumin uygulaması ile değışim görülmez ike GH+ hücre hattında artış göstermektedir (Şekil 20A).

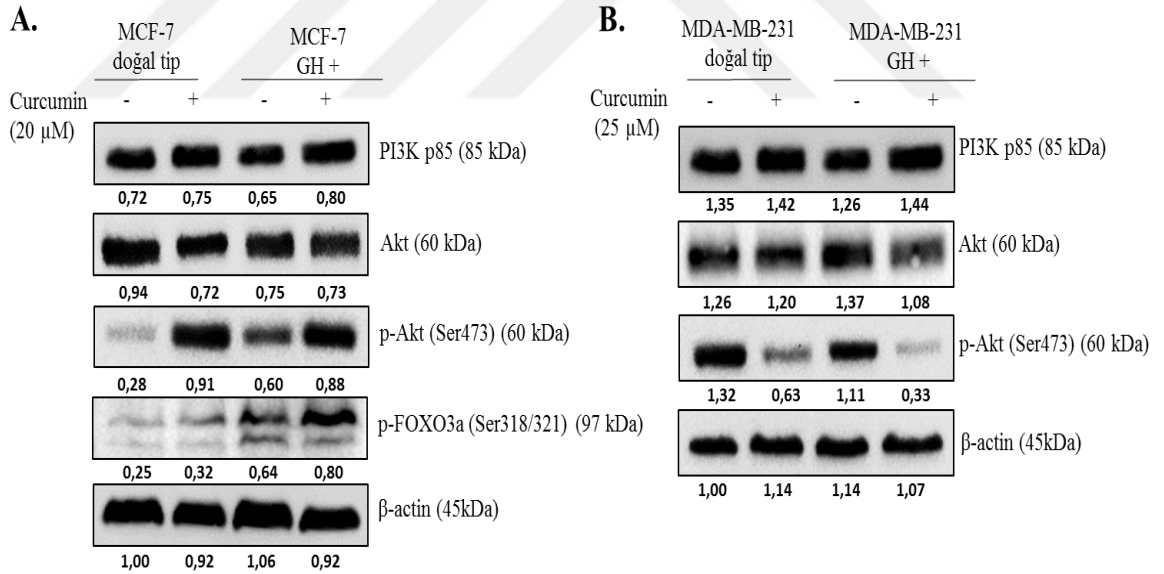
GH anlatımının kazandırılması ile MDA-MB-231 GH+ hücre hatlarında doğal tip hücrelere oranla JAK2 anlatımında artış görülmektedir. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcumin Src, STAT1 ve STAT3 anlatımını baskılamaktadır. STAT1'in 701. tirozin bölgesinden fosforilasyonu curcumin tarafından her iki hücre hattında da inhibe edilmektedir. pSTAT1 inhibitörü olan SOCS-1 anlatımı curcumin uygulaması sonrasında doğal tip hücrelerde artış gösterirken GH+ hücrelerde değışim göstermemektedir. pSTAT3 inhibitörü olan SOCS-3 anlatımı ise her iki hücre hattında da önemli bir değışim göstermemektedir. Ancak PIAS-3 anlatımı doğal tip hücrelerde artarken GH+ hücrelerinde azalmaktadır (Şekil 20B).

A.**B.**

Şekil 20. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin JAK/STAT sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi.

6.8. Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre proliferasyon ve sağ kalım yolları üzerine etkisi

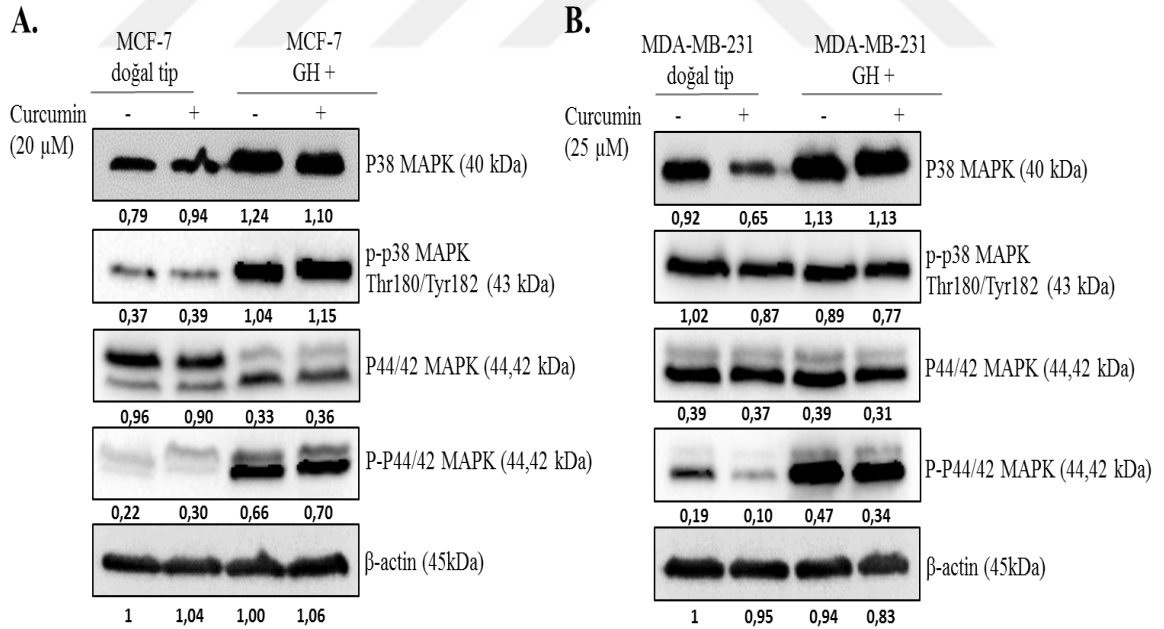
Doğal tip ve GH geni aktarılan meme kanseri hücre hatlarında hem GH'nin hem de curcumin uygulamasının proliferasyon ve sağkalım yolları üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla immunoblotlama tekniği kullanılmıştır. Curcuminin PI3K/Akt sinyal yolağı üzerine etkisine bakıldığında, her iki meme kanseri hücre hattında da PI3K ve Akt anlatımında önemli bir değişime neden olmadığı görülmüştür. MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hattında curcumin Akt'nin serin 473 bölgesinden fosforilasyonunu tetiklemektedir. Aktive olan Akt FOXO3 α 'nın da serin 318/321 bölgelerinden fosforilasyonunu indüklemektedir. Ancak MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında ise curcumin tam tersi yönde etki etmektedir. Akt proteininin serin 473 bölgesinden fosforilasyonunu inhibe etmektedir (Şekil 21A ve 21B).



Şekil 21. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin PI3K/Akt sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi.

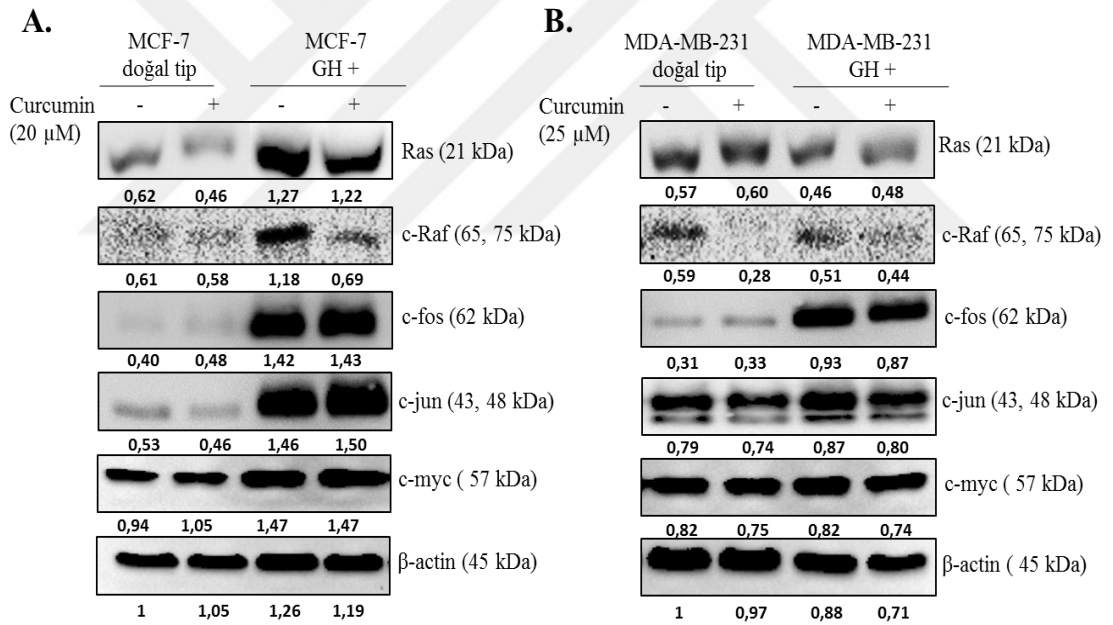
Curcuminin MAPK sinyal yolağı üzerine etkisine bakıldığında, MCF-7 hücre hattında GH geninin aktarılmasıyla birlikte p38 treonin 180 tirozin 182 ve p44/42 treonin 202 tirozin 204 bölgelerinden fosforilasyonunun tetikendiğı görülmüştür. Curcumin uygulaması ile özellikle p-p38 anlatımının MCF-7 GH+ meme kanseri hücre hattında bir miktar artışa sebep olduğı görülmüştür (Şekil 10A). MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında ise GH aktivasyonu ile birlikte p38 anlatımında artış, curcumin uygulaması ile doğal tip hücre hattında p38 anlatımında ise azalma tespit edilmiştir. MDA-MB-231 GH+ hücre hattında doğal tip hücre hattına oranla p44/42 fosforilasyonunun arttığı ancak curcumin uygulaması ile her iki hücre hattında da fosforilasyonun baskılandığı görülmüştür (Şekil 22B).

Onkogenler hücre sağkalımı ve proliferasyonunda rol almaktadır ve çoğı JAK/STAT sinyalinin hedef molekülleri arasındadır. GH anlatımı arttırılan MCF-7, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde onkogenlerin doğal tip hücrelere kıyasla anlatımlarındaki değışiklik ve curcuminin bu sistemdeki etkisini belirlemek amacıyla immunoblotlama tekniğı kullanılmıştır.



Şekil 22. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin MAPK sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi.

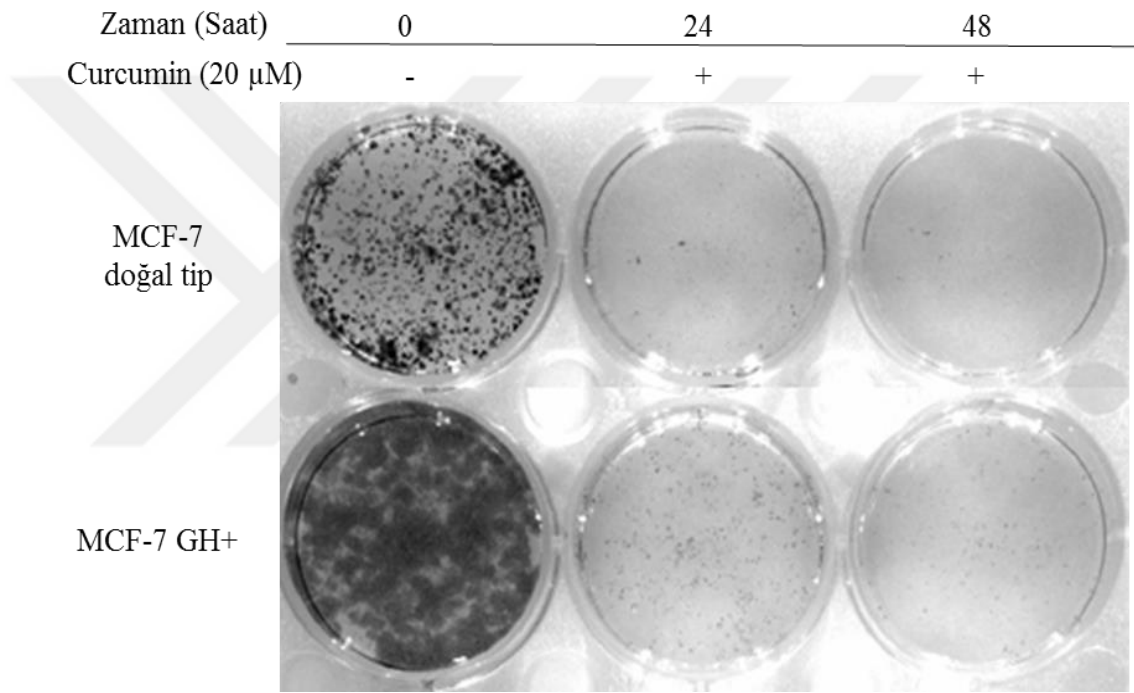
GH tarafından aktive olan JAK/STAT sinyal yolağının hedef molekülleri olmaları sebebiyle, MCF-7 GH+ meme kanseri hücre hattında doğal tip hücelere oranla Ras, c-Raf, c-Fos, c-Jun ve c-myc onkogenlerinin anlatımının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ras ve c-Raf anlatımı curcumin uygulaması ile birlikte azalmaktadır. Ancak c-Fos, c-Jun ve c-myc anlatımlarında curcumin uygulaması sonrasında herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 23A). MDA-MB-231 GH+ meme kanseri hücre hattında da doğal tip hücelere kıyasla özellikle c-Fos ve c-Jun onkogenlerinin anlatım düzeyinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. MAPK sinyal yolağında rol oynayan Ras ve c-Raf anlatımı ise curcumin uygulaması sonrasında baskılanmaktadır. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin c-myc anlatımında bir değişime neden olmamaktadır (Şekil 23B).



Şekil 23. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin onkogenler üzerine etkisinin gösterilmesi.

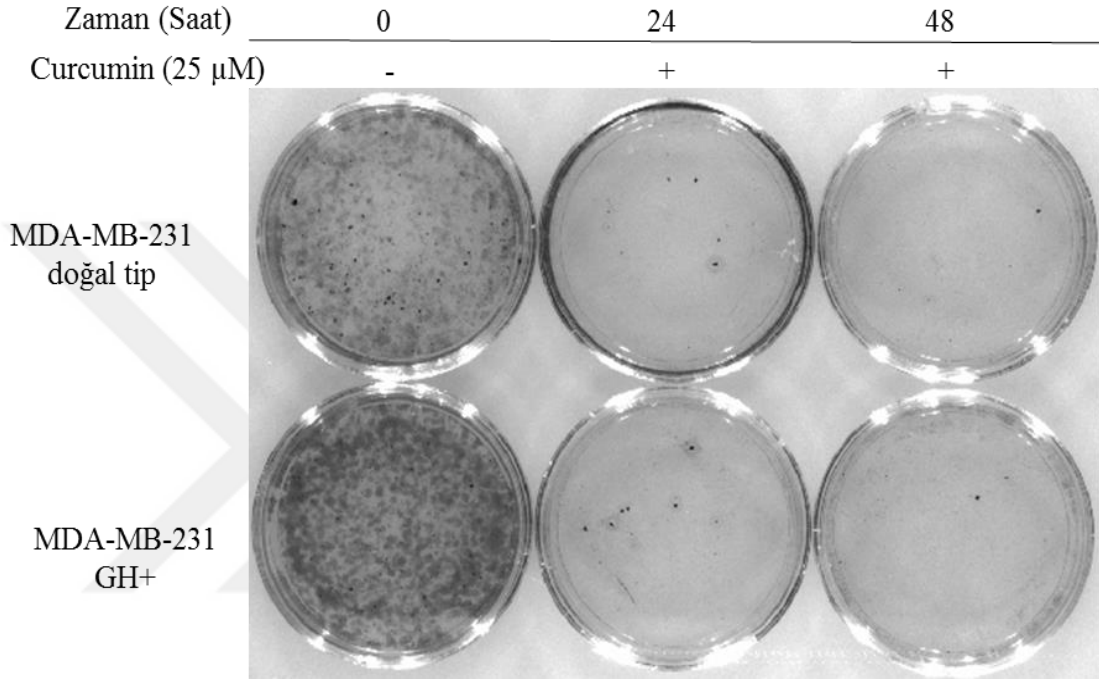
6.9. Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında koloni formasyonu üzerine etkisi

MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin koloni formasyonu üzerine etkisini belirlemek amacıyla koloni formasyon tekniği kullanılmıştır. GH+ anlatımının arttırılması MCF-7 meme kanseri hücrelerinde koloni oluşumu belirgin bir şekilde indüklediği ve zamana bağlı curcumin uygulaması ile koloni oluşumunun hem GH+ hem de doğal tip MCF-7 hücrelerinde baskılandığı belirlenmiştir (Şekil 24).



Şekil 24. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi.

Otokrin GH anlatımının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde doğal tip hücrelere kıyasla koloni oluşumunu tetiklediği saptanmıştır. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde doğal tip hücrelere kıyasla koloni oluşumunda belirgin bir artışa neden olduğu görülürken, curcuminin koloni oluşumu üzerine baskılayıcı etkisi hem doğal tip hem de GH+ MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında tespit edilmiştir (Şekil 25).

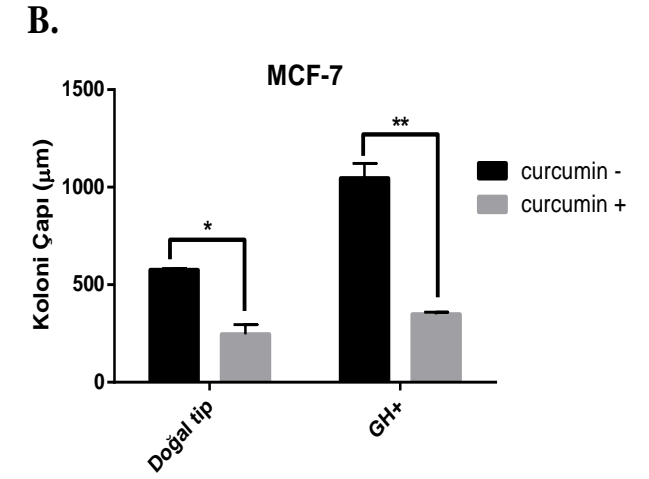
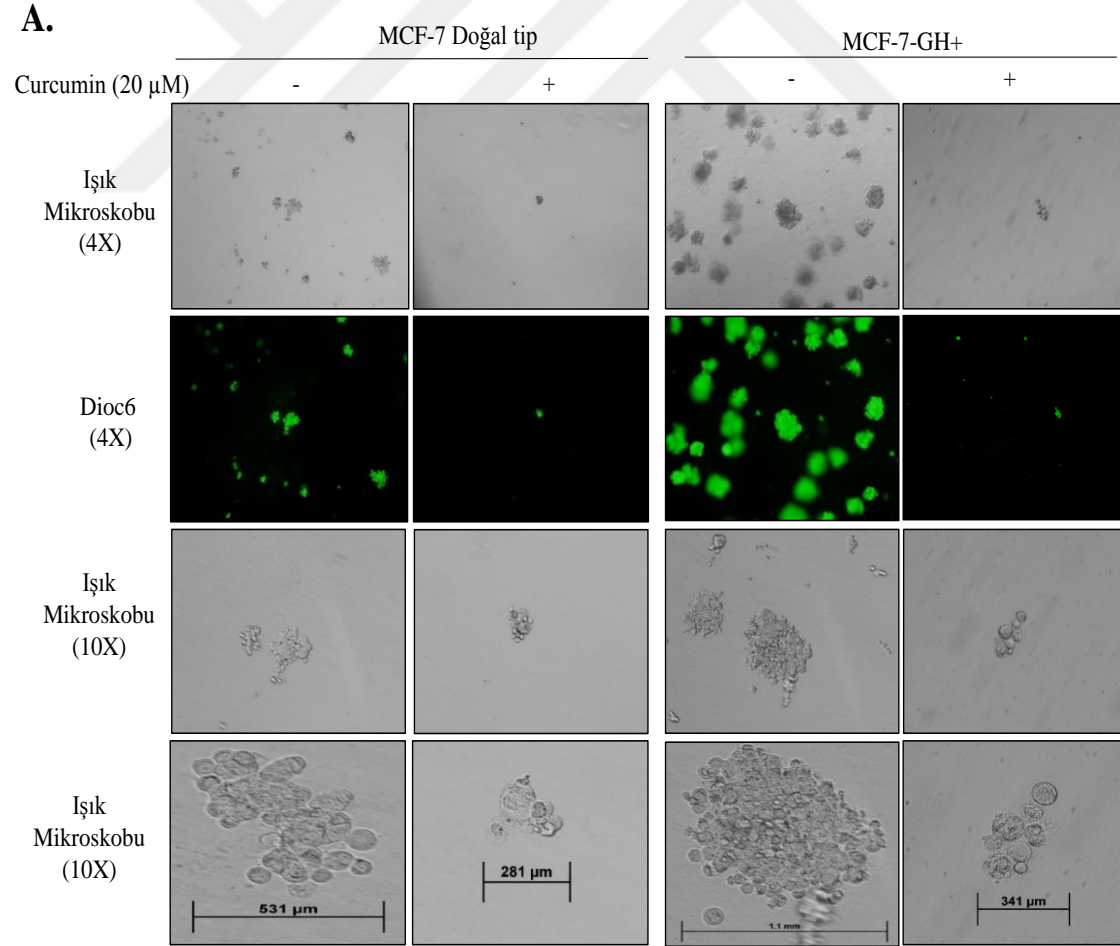


Şekil 25. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi.

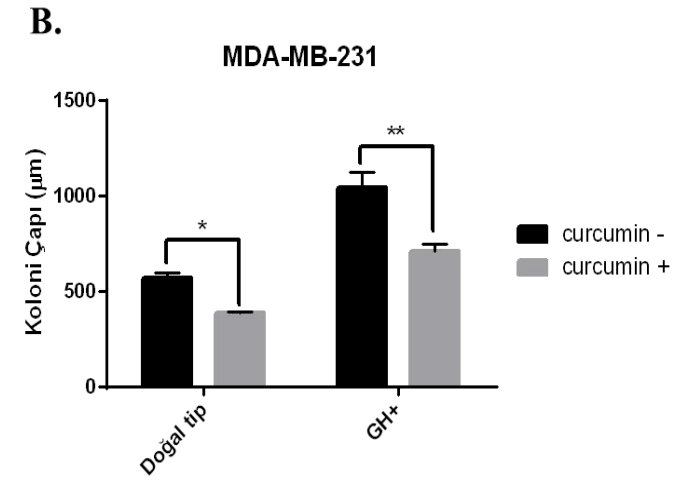
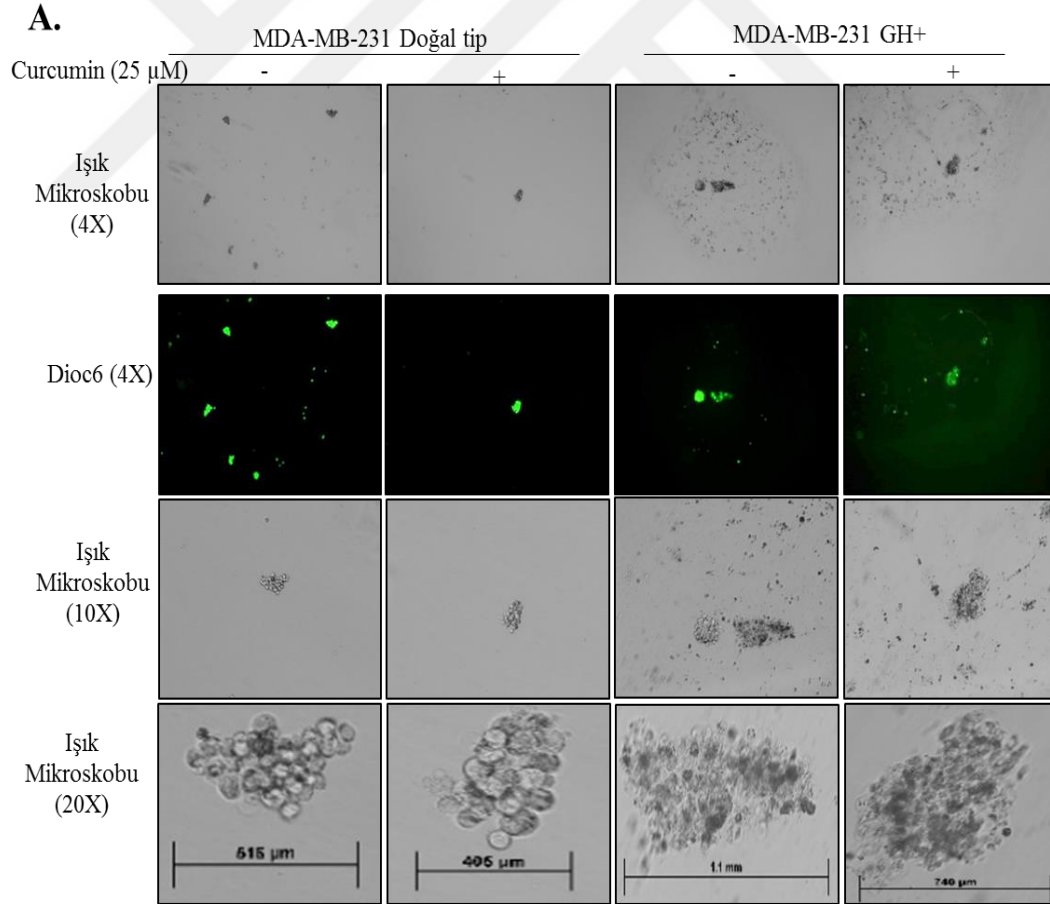
6.10. Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında koloni oluşumu üzerine etkisi

Koloni oluşumunu indüklediği gösterilen MCF-7 GH+ hücrelerinde koloni boyutları ve curcuminin koloni oluşumu üzerine etkisini irdelemek amacı ile yarı akışkan agar tekniği kullanılmıştır. MCF-7 doğal tip, GH+ ve PC3.1 meme kanseri hücrelerinde curcumin ile koloni oluşumunun baskılandığı tespit edilmiştir. Böylece PC3.1 mock vektörün koloni oluşumu üzerinde indükleyici etkisi olmadığı, ancak GH gen anlatımının artışının koloni büyüklüğünü indüklediği belirlenmiştir. Aynı zamanda GH anlatımının MCF-7 hücrelerinde koloni büyüklüğünü doğal tip hücrelere kıyasla 2 kat artırırken, curcuminin hem GH+ hem de doğal tip MCF-7 hücrelerinde koloni büyüklüğüne ket vurucu etkisi gösterilmiştir (Şekil 26).

MDA-MB-231 doğal tip ve PC3.1 hücrelerinde koloni büyüklükleri hemen hemen aynı iken otokrin GH anlatımı ile birlikte MDA-MB-231 hücrelerinde koloni büyüklüğü doğal tip hücrelere kıyasla 2 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir. Böylece PC3.1 vektörünün MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşumu üzerine herhangi bir etkisi olmadığı, otokrin GH sinyalinin MD-MB-231 meme kanseri hücrelerinde koloni oluşumunu indüklediği tespit edilmiştir. Böylece curcuminin hem doğal tip hem de GH+ hücrelerinde koloni oluşumu üzerindeki baskılayıcı etkisi belirlenmiştir (Şekil 27).



Şekil 26. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin yumuşak agarda koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi.
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

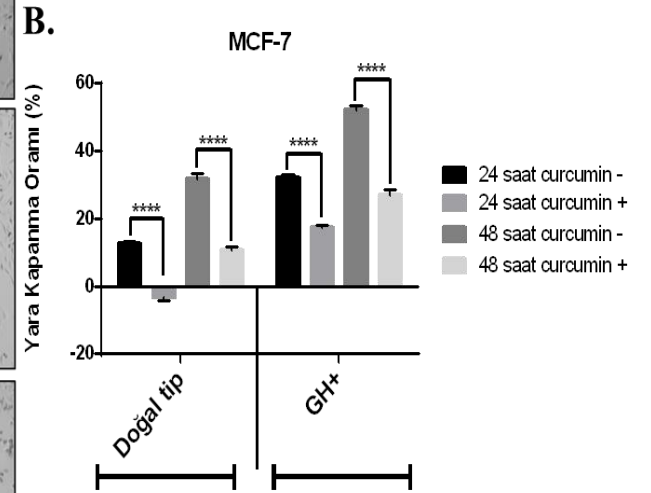
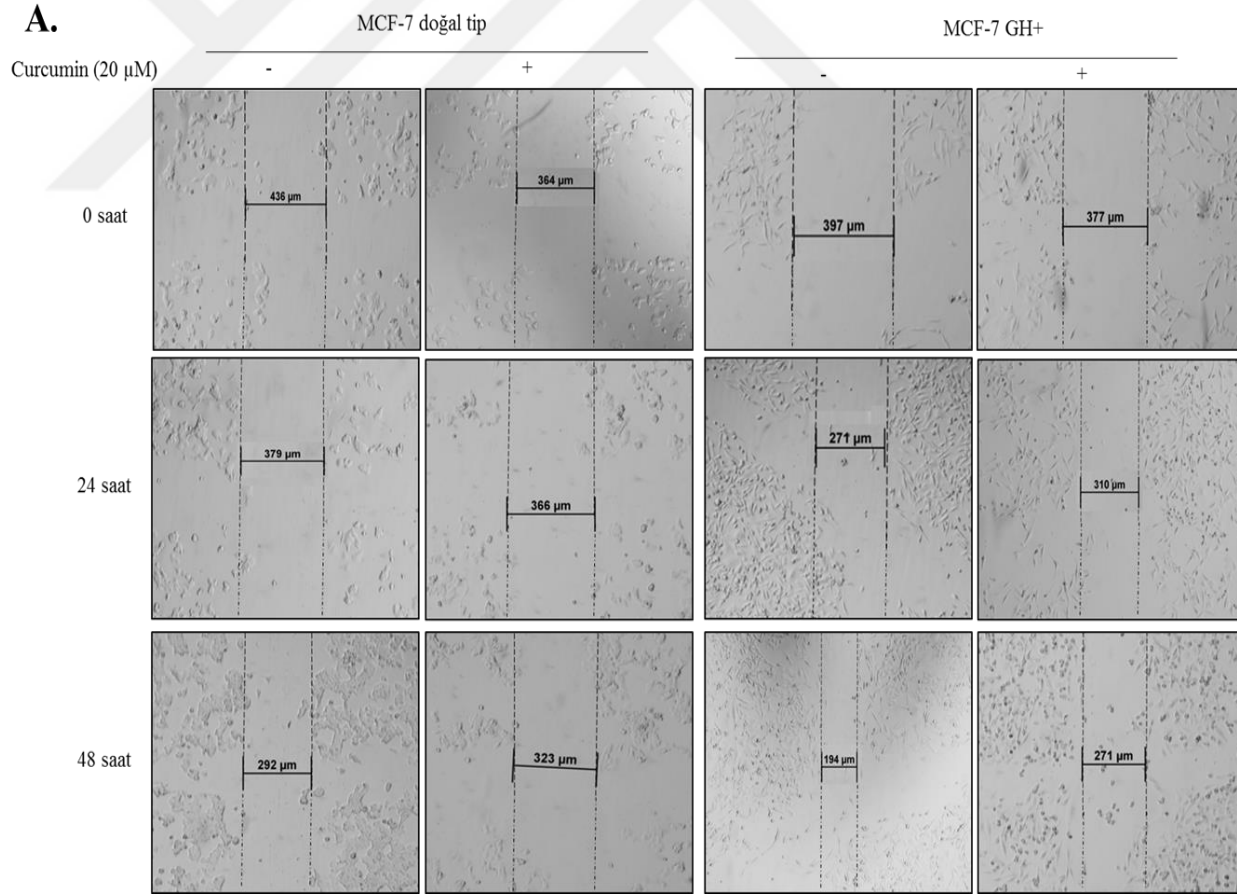


Şekil 27. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin yumuşak agar da koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

6.11. Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında yara kapanma aktivitesi üzerine etkisi

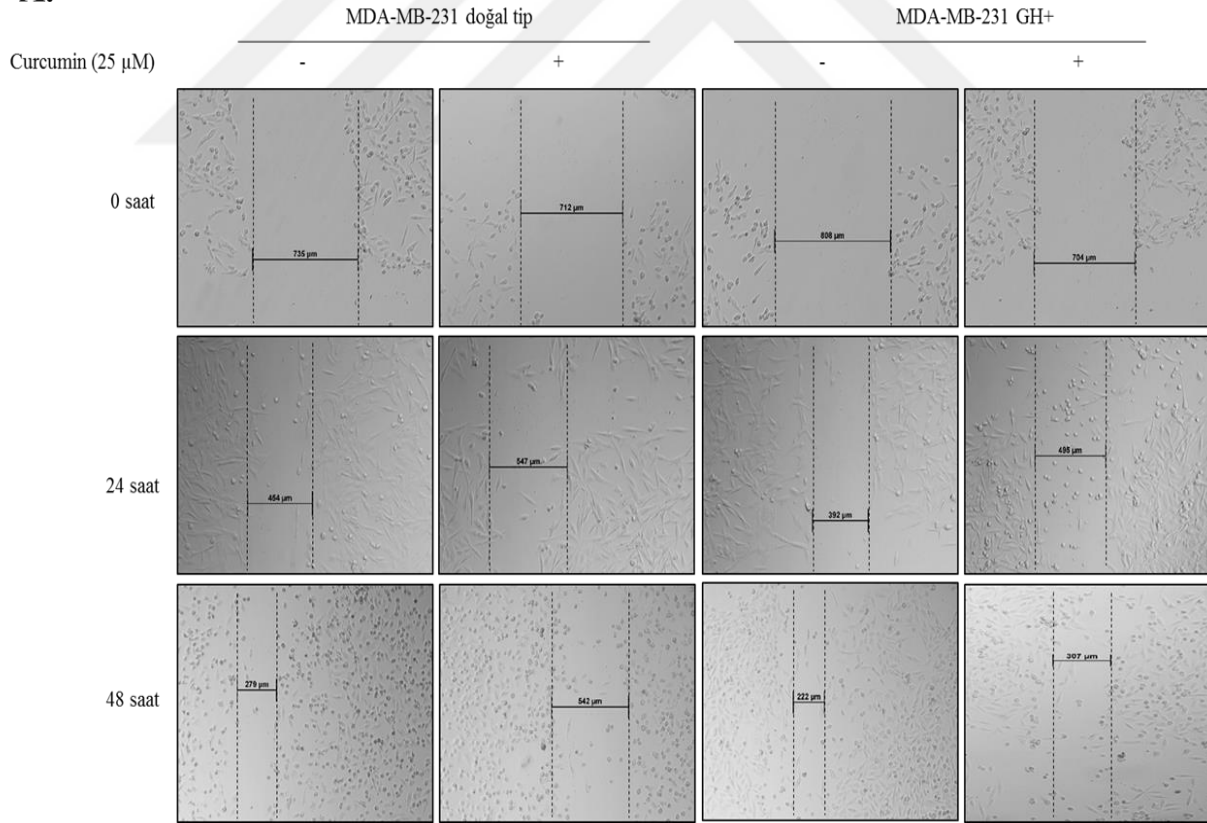
Curcuminin MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında hücre migrasyonu üzerine etkisini incelemek amacıyla yara iyileşmesi modeli ile gösterilmiştir. Hem doğal tip hem de GH+ MCF-7 meme kanseri hücrelerinin zamana bağlı olarak steril 200 µl pipet ucu ile açılan yaranın kapanmasını indüklediği tespit edilmiştir. Ayrıca curcumin uygulaması ile GH+ hücrelerinde doğal tip hücrelere kıyasla daha fazla yara kapanma eğiliminde oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 28).

Hem doğal tip hem de GH+ MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerin zamana bağlı olarak 200 µl pipet ucu ile açılan yaranın kapanmasını indüklediği tespit edilmiştir. Ayrıca curcumin uygulaması ile GH+ hücrelerinde doğal tip hücrelere kıyasla daha fazla yara kapanma eğiliminde oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 29).

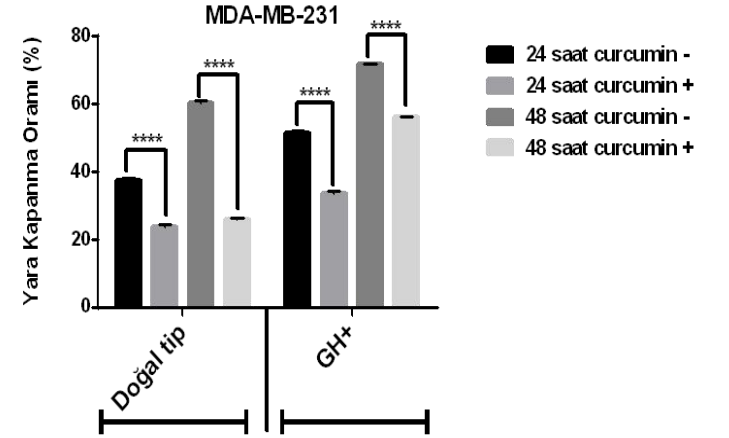


Şekil 28. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin yara kapanma aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi. **** $p < 0,0001$

A.



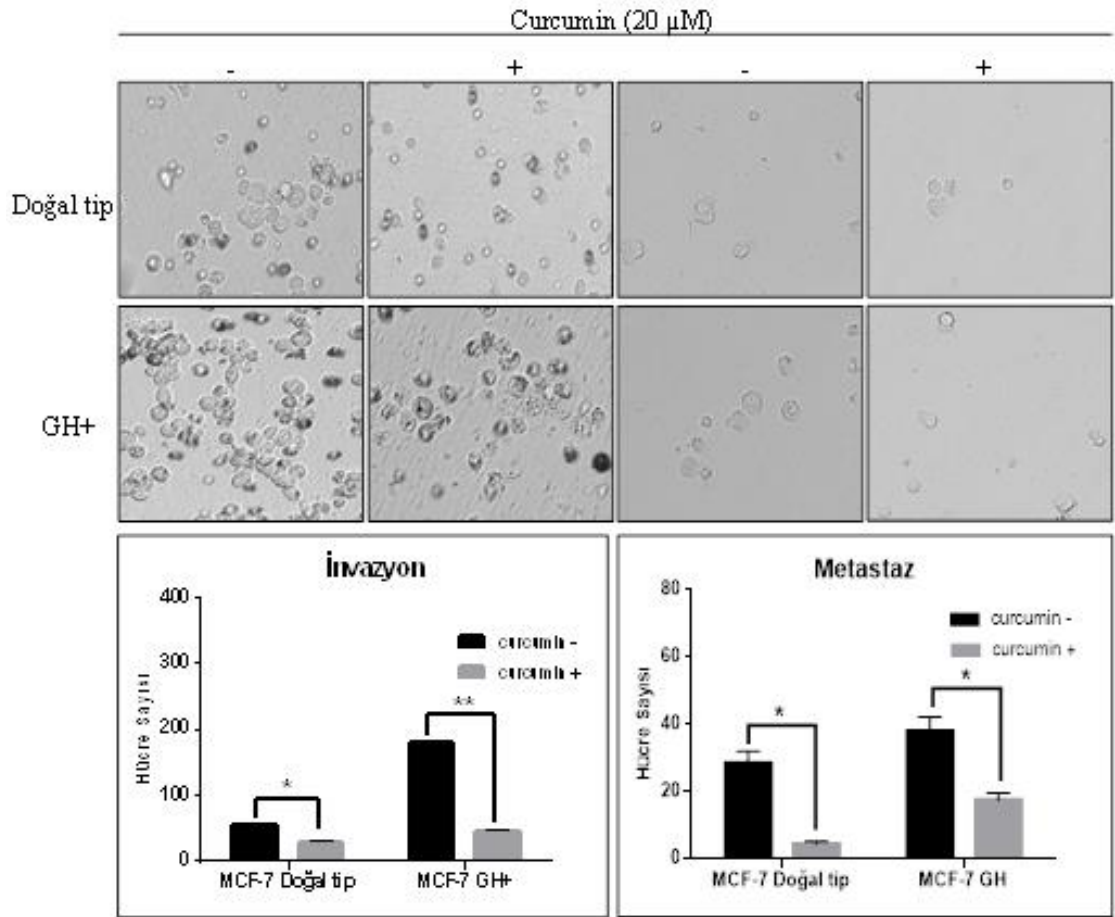
B.



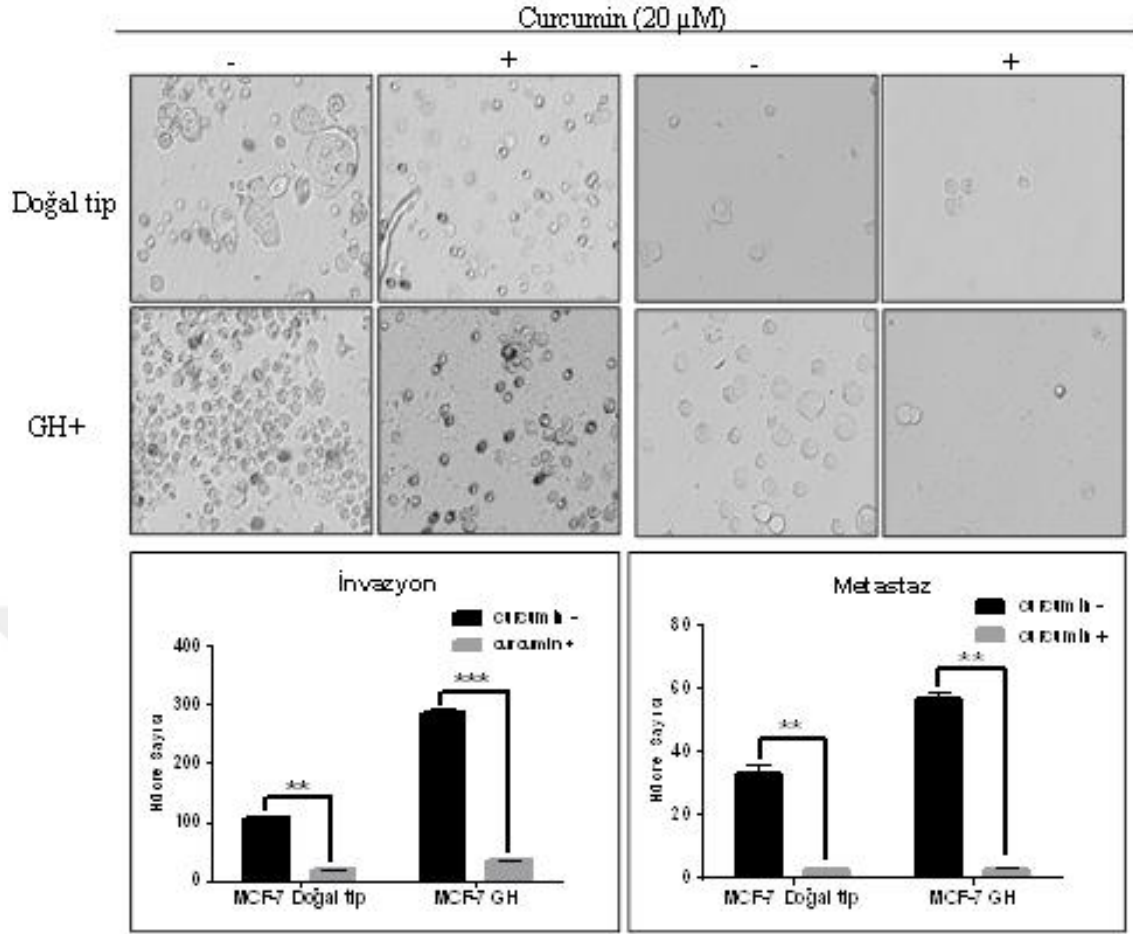
Şekil 29. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin yara kapanma aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi. ****p<0,0001

6.12. Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında invazyon ve metastaz üzerine etkisi

Arttırılmış GH anlatımının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde invazyon tetiklediği ve 24 saat boyunca uygulanan curcuminin invazyonu baskıladığı görülmektedir. Ayrıca zamana bağlı GH anlatımının MCF-7 hücrelerinde invazyonda belirgin bir artışa neden olurken, MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde 48 saat boyunca uygulanan curcuminin invazyonu baskıladığı görülmektedir. GH anlatımının arttırılması MCF-7 hücrelerinde zamana bağlı invazyonu tetiklemesinin yanında metazatik hücre profilinde desteklediği belirlenmiştir. Ayrıca curcuminin hem doğal tip hem de GH+ meme kanseri hücre hatlarında metastazı inhibe edici etkisi gösterilmiştir (Şekil 30,31).



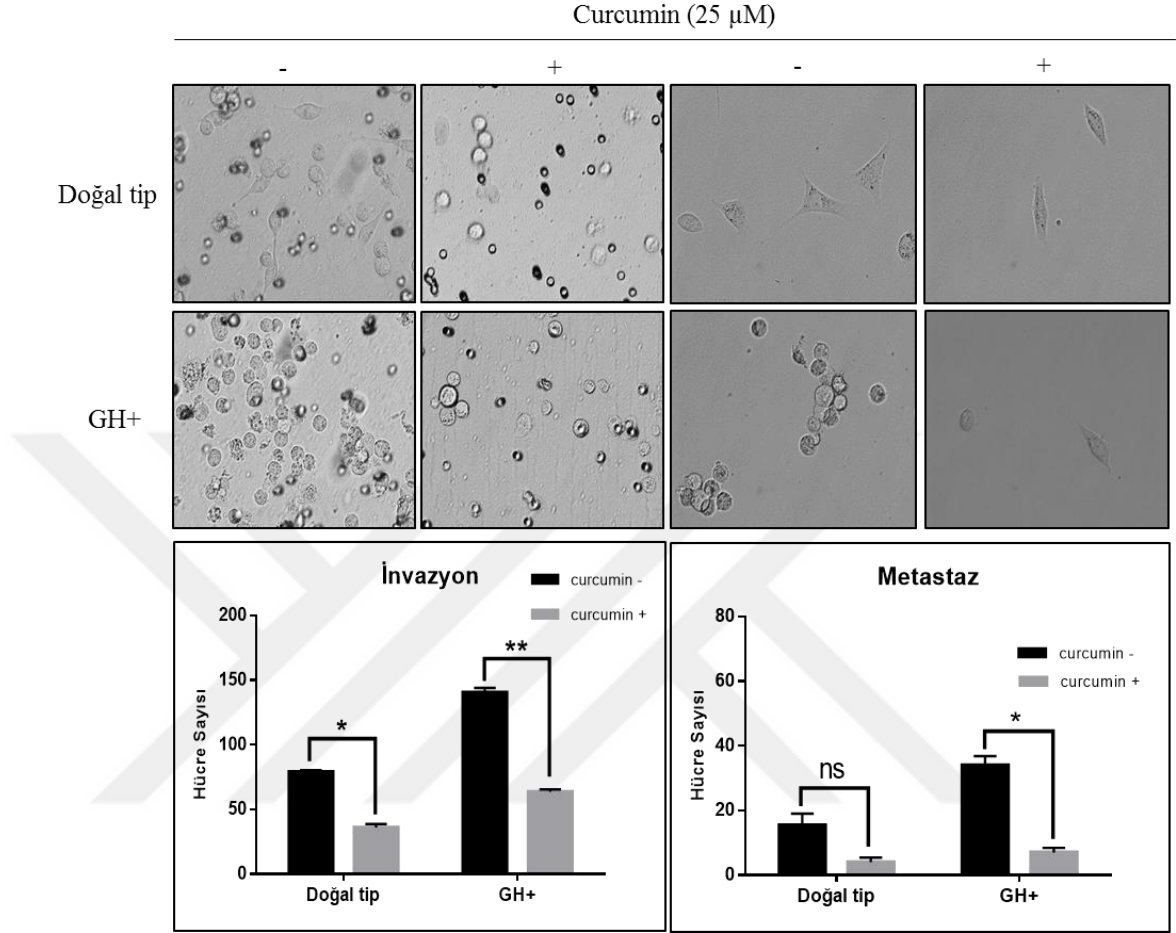
Şekil 30. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde 24 saat boyunca uygulanan curcuminin invazyon ve metastaz üzerine etkisinin belirlenmesi. *p<0,05;**p<0,01



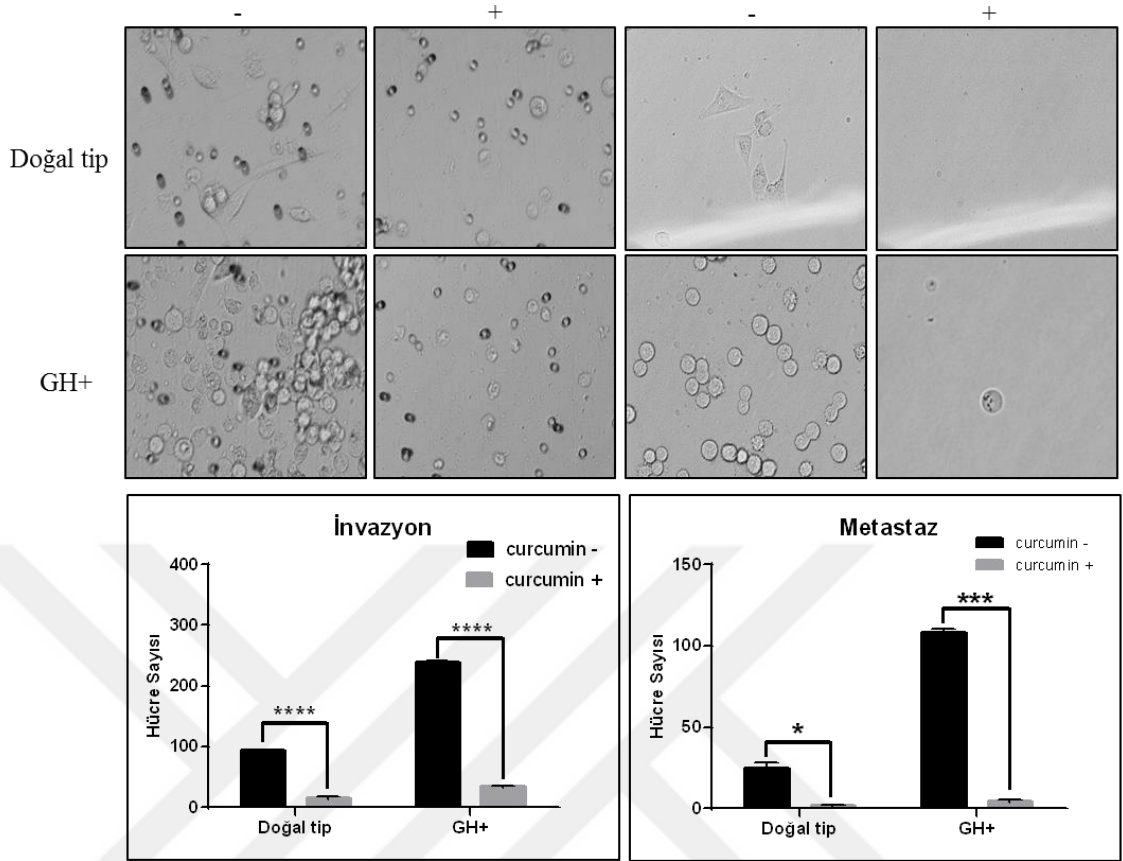
Şekil 31. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde 48 saat boyunca uygulanan curcuminin invazyon ve metastaz üzerine etkisinin belirlenmesi. **p<0,01;*p<0,0001**

GH anlatımı ile MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde invazyon tetiklenmekte olduğu, ve 24 saat curcumin uygulamasının hem MDA-MB-231 doğal tip hem de GH+ meme kanseri hücrelerinde ilaç uygulanmayan kontrol hücrelere kıyasla invazyonu baskıladığı belirlenmiştir. Otokrin GH anlatımının MDA-MB-231 GH+ meme kanseri hücre hattında daha agresif bir profil oluşumuna neden olarak invazyon aktivitesini de indüklediği görülmektedir. Ancak MDA-MB-231 GH+ meme kanserinin MDA-MB-231 doğal tip hücrelerine kıyasla invazif profillerinin daha fazla olsa bile 48 saat curcumin uygulaması ile birlikte bu etkinin belirgin bir şekilde baskılandığı tespit edilmiştir. MDA-MB-231 doğal tip ve MDA-MB-231 GH+ meme kanseri hücre hatlarının kontrol grupları karşılaştırıldığında otokrin GH anlatımı ile birlikte doğal tipe oranla metastatik aktiviteyi arttırdığı görülmektedir. MDA-MB-231 doğal tip ve MDA-MB-231 GH+ meme kanseri hücre hatlarında 24 saat boyunca curcuminin metastaz üzerine etkisine bakıldığında her iki hücre hattında da curcuminin metastazı engellediği görülmektedir. 48 saatlik curcumin

uygulamasý ile birlikte hem MDA-MB-231 dođal tip hem de MDA-MB-231 GH+ meme kanseri metastatik aktivitenin daha da indirgendięi görülmektedir (Őekil 32, 33).



Şekil 32. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde 24 saat boyunca uygulanan curcuminin invazyon ve metastaz üzerine etkisinin belirlenmesi.
***p<0,05; **p<0,01**



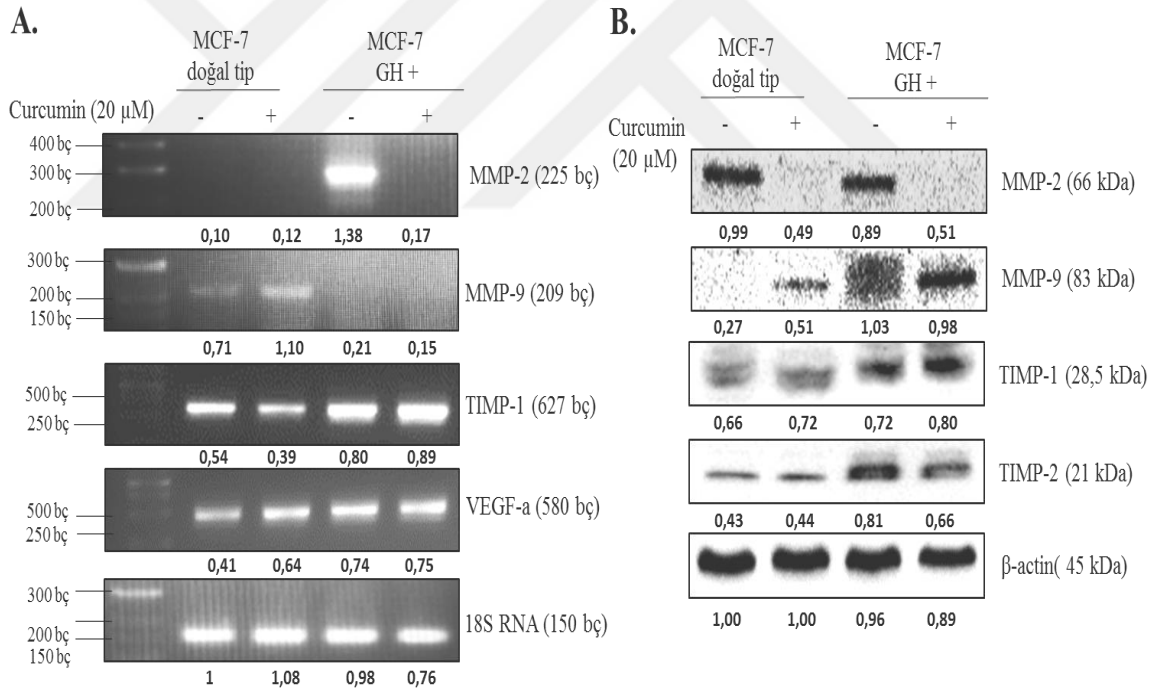
Şekil 33. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde 48 saat boyunca uygulanan curcuminin invazyon ve metastaz üzerine etkisinin belirlenmesi.
*p<0,05;***p<0,0001

6.13. Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında MMP'lerin anlatımı üzerine etkisi

Metastatik süreçte fonksiyonel olan MMP'ler ekstrasellular matriksin degradasyonunda görevli olup kanser hücrelerinde motiliteyi tetiklemektedir. Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında metastaz üzerine etkisi belirlemek amacıyla RT-PCR ve immunoblotlama teknikleri kullanılmıştır.

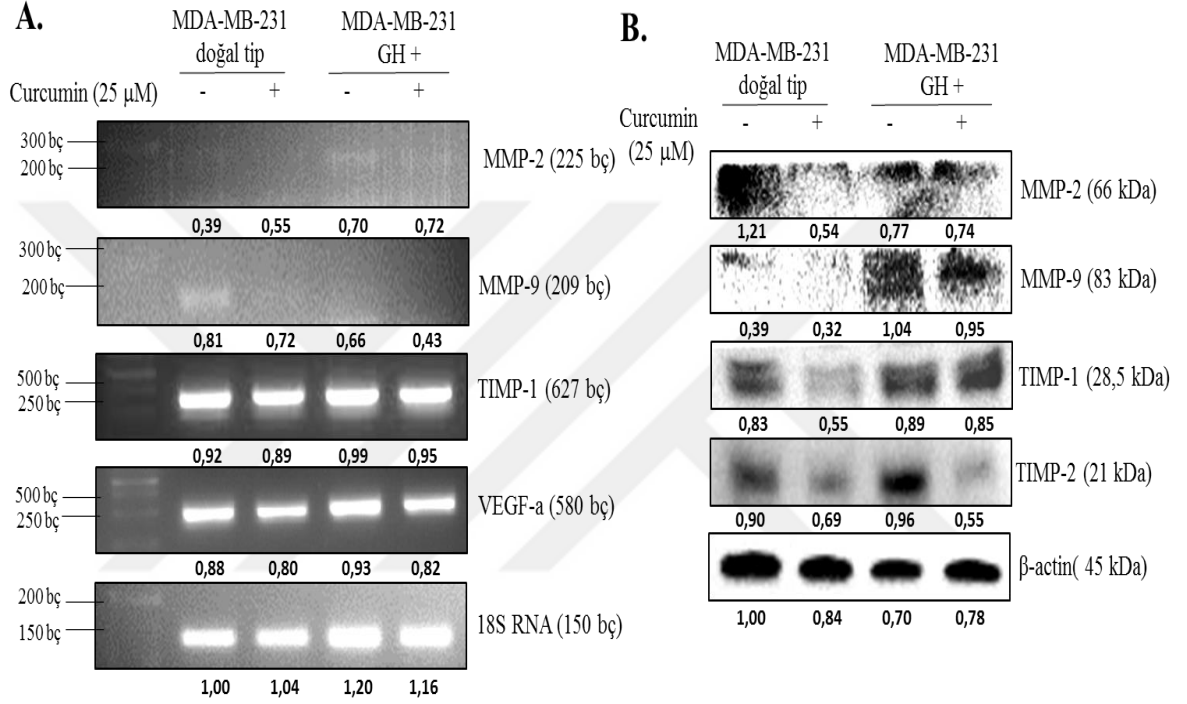
RT-PCR sonuçlarına göre MCF-7 doğal tip hücre hatlarında MMP-2 mRNA düzeyinde belirlenememiştir. Ancak GH+ hücre hattında MCF-7 hücrelerinde yüksek miktarda MMP-2 anlatımı görülmekle birlikte curcumin uygulaması sonrasında MMP-2 anlatımı azalmaktadır. Ancak MMP-2 anlatımına protein düzeyinde bakıldığında ise curcumin uygulaması ile artış göstermektedir. MCF-7 doğal tip hücre hattında curcumin uygulaması ile birlikte MMP-9 mRNA düzeyinde artış

görülmüştür. MCF-7 GH+ hücre hattında ise MMP-9 anlatımı belirlenememiştir. MMP-9 protein düzeyinde anlatımı doğal tip hücelere oranla GH+ hücre hattında daha yüksek olmakla birlikte curcumin uygulaması ile azalmaktadır. MMP inhibitörü olan TIMP-1 mRNA seviyesi MCF-7 doğal tip hücelerde curcumin ile azalırken GH+ hücre hattında bir değişim görülmemektedir. Protein düzeyinde TIMP-1 anlatımına bakıldığında ise doğal tip ve GH+ hücre hatlarında curcumin ile herhangi bir değişim görülmemektedir. MMP-2 inhibitörü olan TIMP-2 protein düzeyinde anlatımında curcumin uygulaması ile önemli bir değişim belirlenmemiştir. VEGF- α anjiyogenezde rol almakla birlikte MMP'lerin aktivasyonunu sağlamaktadır. MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında curcumin uygulaması ile birlikte önemli bir derecede VEGF- α mRNA düzeyinde bir değişim görülmez iken kontrol grupları kıyaslandığında GH anlatımı olan hücre hattında VEGF- α anlatımının daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 34).



Şekil 34. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin MMP cDNA ve protein düzeylerine etkisinin gösterilmesi.

MDA-MB-231 GH+ hücre hattında kontrol grubuna oranla curcumin uygulaması ile MMP-2 mRNA düzeyinde azalma görülmektedir. Protein düzeyinde anlatımı MDA-MB-231 doğal tip hücre hattında ise curcumin uygulaması ile MMP-9 mRNA düzeyinde azalma görülmüştür. GH+ hücre hattında MMP-9 belirlenememiştir MDA-MB-231 doğal tip hücre hattında VEGF- α mRNA düzeyi curcumin ile azalırken GH+ hücre hattında önemli bir değişim belirlenmemiştir (Şekil 35).



Şekil 35. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin MMP cDNA ve protein düzeylerine etkisinin gösterilmesi.

6.14. Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında EMT üzerine etkisi

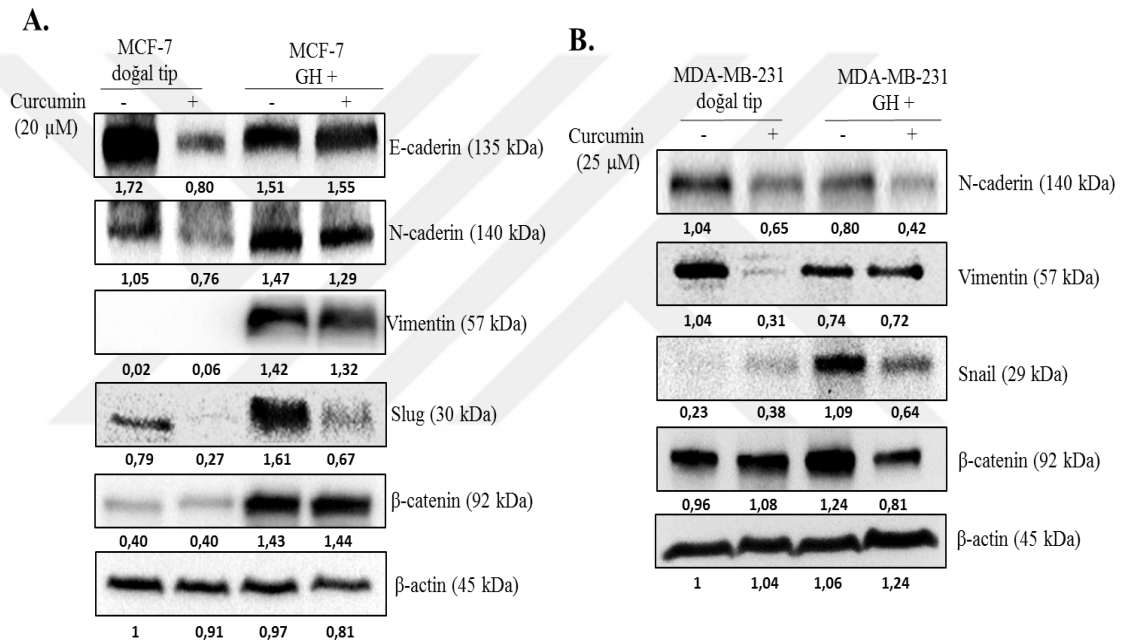
Literatürdeki EMT belirteçleri üzerine yapılan çalışmalara göre Tablo 4'te çalışma kapsamında kullanılan meme kanseri hücrelerinde EMT ile ilişkili belirteçler olan E-kaderin, N-kaderin, Slug, Snail anlatım durumları verilmiştir.

Tablo 4. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında EMT markırlarının anlatım (Graff, J.R. ve 1995, Hajra, K.M. ve 2002).

EMT markırları	MCF-7	MDA-MB-231
• E-kaderin	+	-
• N-kaderin	+	+
• Slug	+	-
• Snail	-	+

Epitel hücre markırı olan E-kaderin, 24 saatlik curcumin uygulaması ile birlikte MCF-7 doğal tip hücrelerde azalırken MCF-7 GH+ hücrelerde önemli bir değişim belirlenmemiştir. Mezenşimal hücre markırı olan vimentinin MCF-7 doğal tip hücrelere kıyasla MCF-7 GH+ hücrelerinde bazal anlatımında artış belirlenmiştir. Curcumin uygulaması sonrasında MCF-7 GH+ hücre hattında vimentin anlatımında azalma görülmektedir. EMT sürecinde görevli transkripsiyon faktörlerinden biri olan Slug anlatımı GH geninin kazandırılması ile MCF-7 hücre hattında doğal tip hücrelere kıyasla artış göstermektedir. Curcumin hem doğal tip hem de GH+ hücre hattında Slug anlatımının baskılanmaktadır (Şekil 36A)kk.

Tablo 4’de verilen bilgiler dahilinde EMT markırlarından Slug ve Snail anlatımı olduğu için E-kaderin anlatımı baskılanan MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında curcumin N-kaderin altımını baskılamaktadır. Doğal tip hücre hattında curcumin uygulaması ile birlikte vimentin anlatımında azalma görülürken GH+ hücre hattında bir değişiklik belirlenmemiştir. GH anlatımı ile birlikte Snail anlatımının MDA-MB-231 GH+ hücre hattında doğal tip hücrelere oranda daha da fazla olduğu saptanmıştır. Curcumin ile MDA-MB-231 GH+ hücre hattında Snail anlatımının baskılandığı görülmektedir. GH geminin kazandırılması ile birlikte β -catenin anlatımının arttığı, curcumin uygulaması sonrasında MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde azaldığı görülmektedir (Şekil 36B).



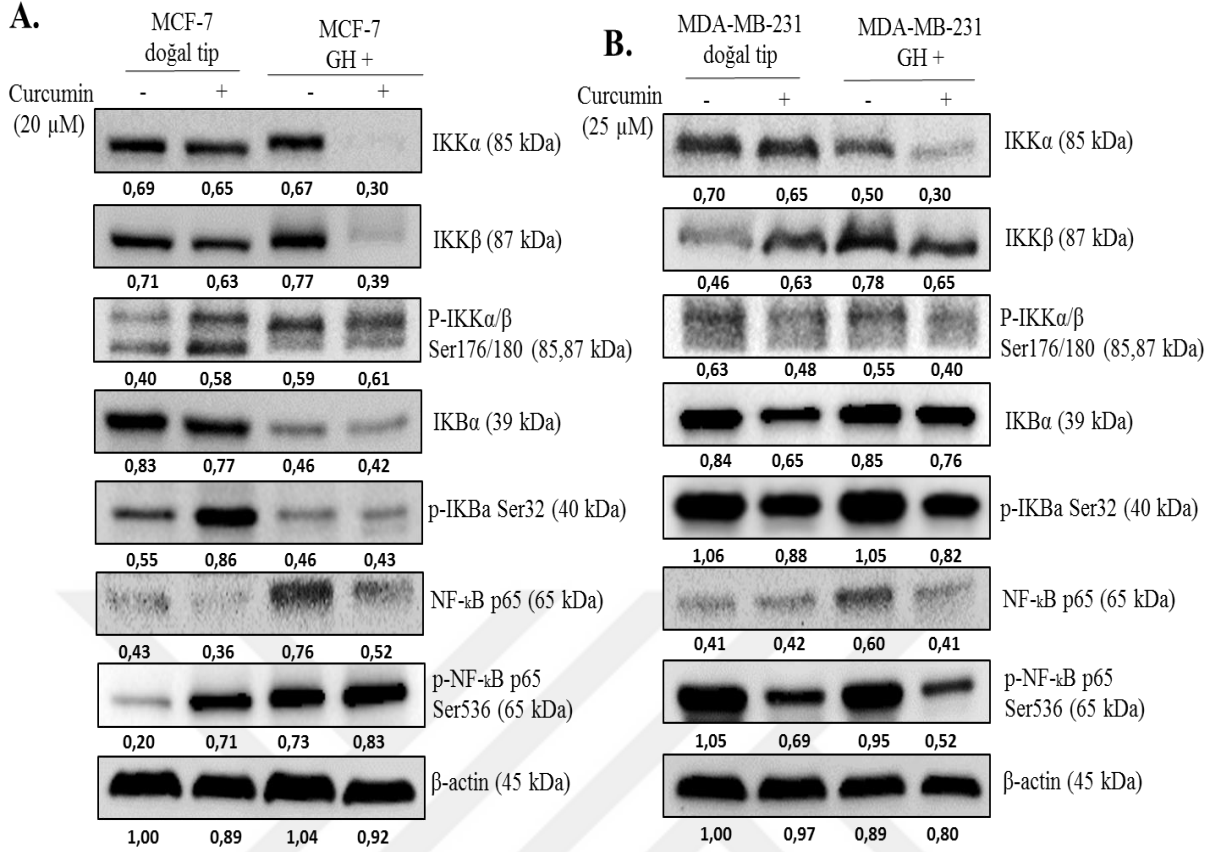
Şekil 36. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin EMT üzerine etkisinin gösterilmesi

6.15. Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde NF-κB sinyal yolağı üzerine etkisi

NF-κB bir transkripsiyon faktörü olup inflamasyon, immün system, hücre proliferasyonu, invazyon, metastaz ve apoptoz gibi süreçlerde rol almaktadır. NF-κB aktivasyonu; klasik, alternatif ve atipik yolak olmak üzere üç ayrı sinyal üzerinden de gerçekleşebilmektedir. Bu yolaklar genellikle pro-inflamatuar ajanlar ve çeşitli sitokinler tarafından tetiklenmektedir. Curcuminin klasik ve alternatif NF-κB sinyali üzerine etkisini belirlemek amacıyla immunoblotlama tekniğı kullanılmıştır.

Curcumin MCF-7 meme kanseri hücre hattında IKK α ve β anlatımını hem doğal tip hem de GH+ hücre hattında baskılamaktadır. GH+ hücre hattında bu baskılama oranı daha yüksektir. doğal tip hücre hattında IKK α / β kompleksinin Ser176/180 fosforilasyon düzeyi ise curcumin uygulamasını takiben artmaktadır. Bu artışa bağlı olarak özellikle doğal tip hücrelerde I κ B α fosforilasyon düzeyi de artmaktadır. GH anlatımının kazandırılmasıyla MCF-7 meme kanseri hücre hattında NF-κB p65 düzeyi artış göstermektedir. Ancak curcumin uygulaması sonrasında hem doğal tip hem de GH+ hücre hattında NF-κB anlatımı baskılanmaktadır. Curcumin MCF-7 doğal tip hücrelerde p-IK β artışını takiben p-NF-κB p65 Ser536 anlatımını artırırken GH+ hücrelerde önemli bir değişime neden olmamaktadır (Şekil 37A).

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında curcumin IKK α / β Ser176/180 fosforilasyonunu baskılamaktadır. Buna rağmen doğal tip hücre hattında curcumin uygulaması sonrası I κ B α Ser32 fosforilasyonu artar iken GH+ hücre hattında azalmaktadır. MCF-7 meme kanseri hücre hattında olduğu gibi GH anlatımının kazandırılması ile birlikte MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında da NF-κB p65 anlatımı artış göstermektedir. Curcumin uygulaması ile NF-κB p65 Ser536 fosforilasyonu hem doğal tip hem de GH+ hücre hattında baskılanmaktadır (Şekil 37B).

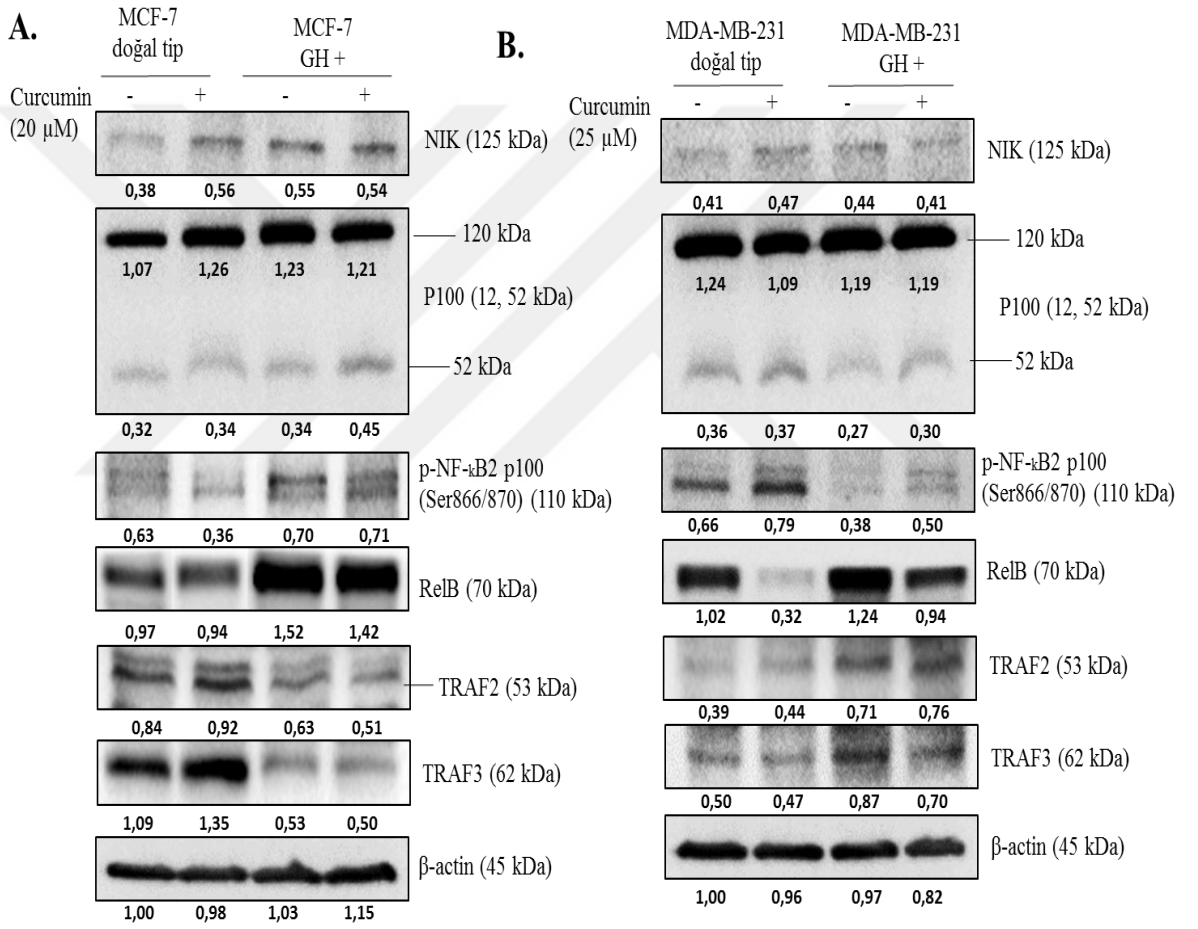


Şekil 37. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin klasik NF-κB sinyal yolu üzerine etkisinin belirlenmesi.

Curcuminin alternatif NF-κB sinyal yolu üzerine etkisine bakıldığında ise MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hattında TRAF2 ve TRAF3 anlatımından bir değişime neden olmamaktadır. NIK anlatımı MCF-7 doğal tip hücre hattında bir miktar artış gösterirken GH+ hücre hattında bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ancak GH+ hücre hattındaki NIK anlatımı doğal tip hücre hattına oranla daha yüksektir. Curcumin MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hattında TRAF2 ve TRAF3 anlatımından bir değişime neden olmamaktadır. p100 Ser866/870 fosforilasyonu doğal tip hücre hattında curcumin ile birlikte baskılanırken GH+ hücre hattında önemli derecede bir değişim göstermemektedir. P100 fosforilasyonuna bağlı olarak oluşan p52 ise curcumin uygulaması ile doğal tip hücre hattında değişmez iken GH+ hücre hattında artış göstermektedir. MCF-7 GH+ hücre hattında RelB anlatımı doğal tip hücrelere oranla daha yüksektir. Curcumin uygulaması sonrası ise her iki hücre hattında da bir değişim göstermemektedir (Şekil 38A).

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına bakıldığında curcumin her iki hücre hattında da TRAF2 anlatımını etkilemezken TRAF3 anlatımını GH+ hücre

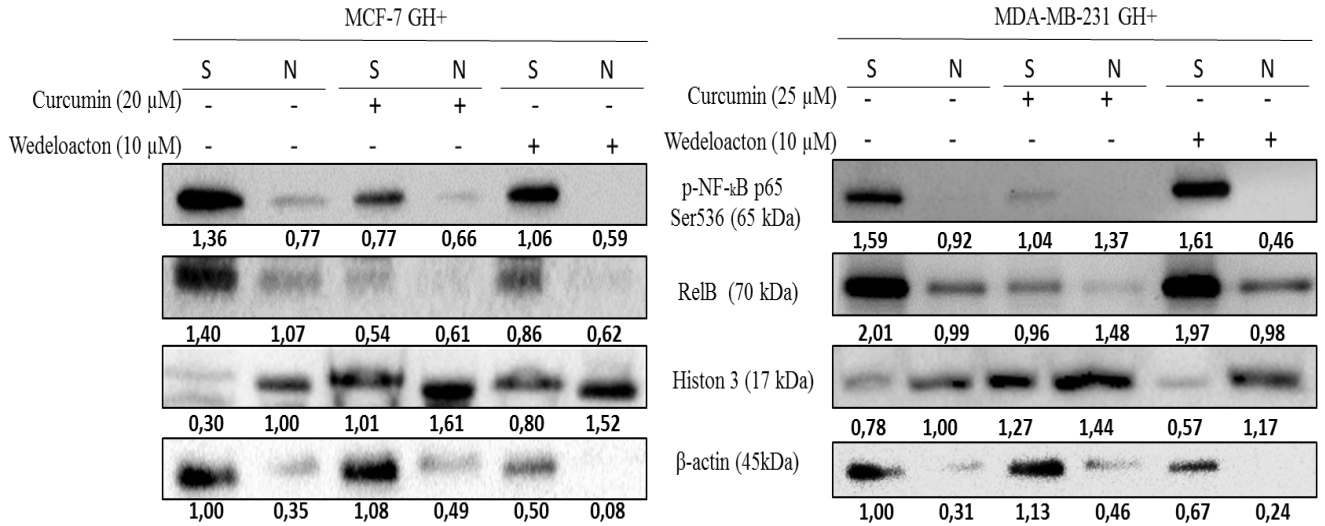
hattında baskılanmaktadır. NIK anlatımını doğal tip hücre hattında bir miktar baskımlarken GH+ hücre hattında önemli derecede bir değışime neden olmamıştır. NIK tarafında fosforile olan p100 curcumin uygulaması ile her iki hücre hattında da artış göstermekte ve buna bağılı olarak proteozomal degradasyon sonrası oluşan p52 curcumin uygulaması ile bir miktar artış göstermektedir. P52 ile kompleks oluşturup nukleusa göç eden RelB anlatımı curcumin uygulaması ile azalmaktadır. Özellikle doğal tip hücre hattında Gh+ hücre hattına oranla daha yüksek düzeyde baskılanma görölmektedir (şekil 38B).



şekil 38. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin alternatif NF-κB sinyalı üzerine etkisinin belirlenmesi.

Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında NF-κB'nin aktivasyonu üzerine etkisini belirlemek amacıyla nuclear ve sitoplazmik protein izolasyonu ardından immunoblotlama tekniğı kullanılmıştır. NF-κB alt üniteleri homodimer veya heterodimer halinde kompleks oluşturarak hücre içerisinde

nukleusa göç etmektedir. Bu kompleks yapıların oluşumunda major rol alan NF- κ B alt ünitelerinden biri p65 olup Ser536 bölgesinden fosforilasyona uğrayarak p50 alt ünitesi ile birlikte heterodimer yapıyı oluşturmaktadır. RelB ise p52 alt ünitesi ile birlikte heterodimer yapıyı oluşturarak nukleusa göç etmektedir. MCF-7 GH+ meme kanseri hücre hattında curcumin p-p65 göçünü baskılamakta ve sitoplazmik p-p65 düzeyinde de azalmaya neden olmaktadır. Wedelolacton ajanı, IKK inhibisyonunu gerçekleştirerek p65 fosforilasyonu bloke etmektedir. Wedelolacton uygulanan örnekte de curcumin ile aynı cevap alınmış olup p-p65'in nukleusa göçünün baskılandığı belirlenmiştir. RelB ise kontrol grubuna oranla curcumin uygulaması sonrasında sitoplazmik düzeyinde azalma gözlenir iken nukleusa göçü de aynı şekilde curcumin uygulaması ile baskılanmaktadır (Şekil 39A). MDA-MB-231 GH+ meme kanseri hücre hattında kontrol grubuna bakıldığında p-p65 göçü belirlenememiştir. Bununla birlikte sitoplazmik p-p65 düzeyi curcumin uygulaması ile birlikte azalmaktadır. Wedelolacton uygulanan örnekler de de nuklear p-p65 belirlenememiştir. Kontrol grubunda RelB sitoplazmadan nukleusa göç etmektedir. Ancak curcumin uygulaması ile hem sitoplazmik RelB düzeyi azalmakta hem de RelB'nin nukleusa göçü baskılanmaktadır. Wedelolacton uygulanan örnekte ise kontrol grubu ile aynı profil elde edilmiştir (Şekil 39B).

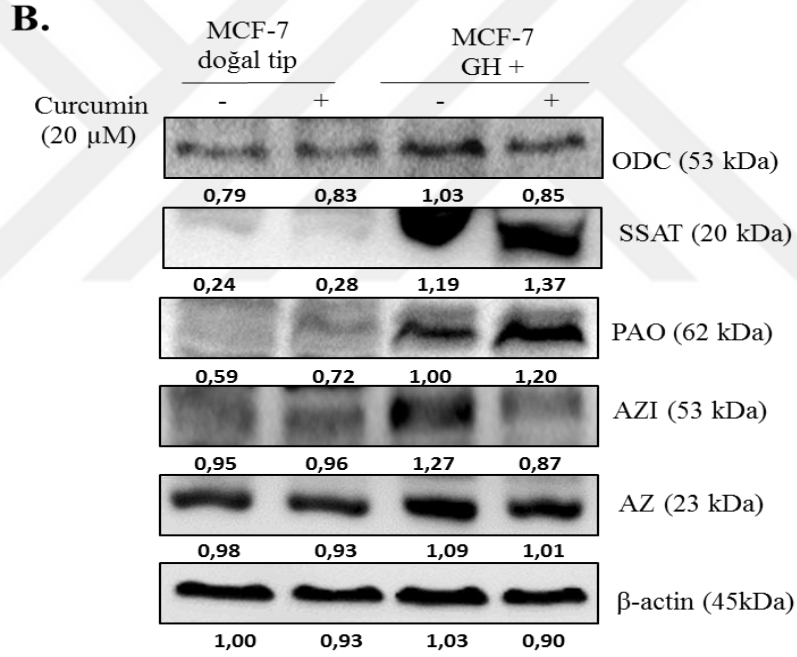
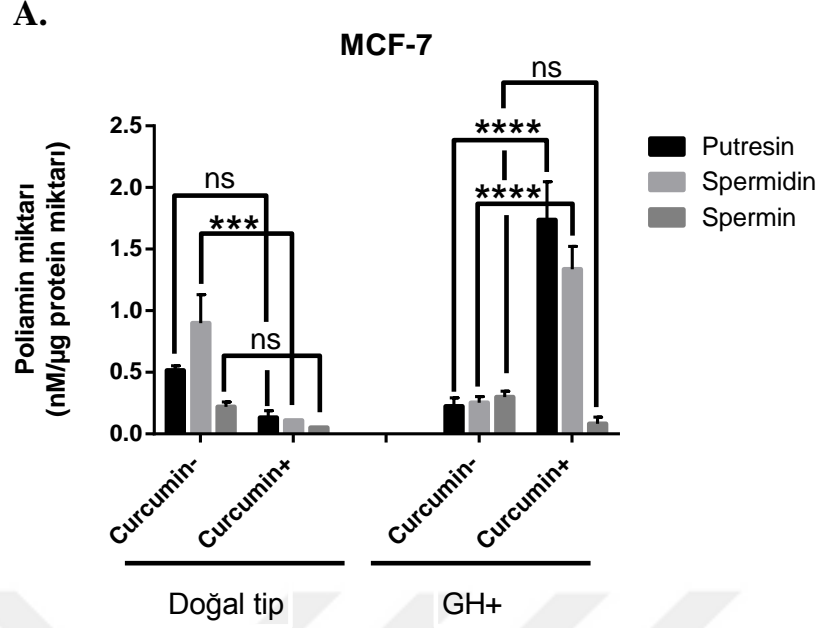


Şekil 39. MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin NF- κ B göçü üzerine etkisinin belirlenmesi.

6.16. Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında poliamin metabolizması üzerine etkisi

Poliaminler; putresin, spermidin ve spermin hücre büyümesi ve farklılaşması açısından fonksiyonel amin türevli moleküllerdir. Hücre içerisine poliamin alımı ve biyosentezinde ODC, AZ ve AZI enzimleri, katabolizmada ise PAO ve SSAT enzimleri görev almaktadır.

MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin poliamin düzeyleri üzerine etkisi HPLC tekniği, poliamin metabolizmasında görevli enzimlerin anlatımı üzerine etkisi ise immunoblotlama tekniği ile belirlenmiştir. Doğal tip hücre hattında putresin, spermidin ve spermin düzeyi curcumin uygulaması sonrası azalmaktadır. GH+ hücre hattında ise putresin ve spermidin düzeyi artarken spermidin seviyesi azalmaktadır. ODC transkripsiyon faktörü olan c-myc anlatımında bir değişim görülmemektedir. Biyosentezden sorunlu ODC enziminin anlatımı GH+ hücre hattında doğal tip hücrelere oranla daha fazla olmakla birlikte curcumin uygulaması sonrası doğal tip hücrelerde önemli derecede değişim göstermez iken GH+ hücrelerde azalmaktadır. GH+ hücre hattında ODC anlatımı azalmasına rağmen putresin ve spermidin düzeyindeki artış AZ'nin ODC den bağımsız olarak hücre içerisine poliamin alınımında görev almasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. ODC aktivitesi kontrol eden AZ enzimi curcumin uygulaması ile bir değişim göstermez iken AZ inhibisyonunu sağlayan AZI enzimi anlatımı baskılanmaktadır. Katabolizmada fonksiyonel olan enzimlerden SSAT anlatımı curcumin uygulaması ile bir değişim göstermemekle birlikte PAO anlatımı özellikle GH+ hücre hattında artış göstermektedir (Şekil 40).

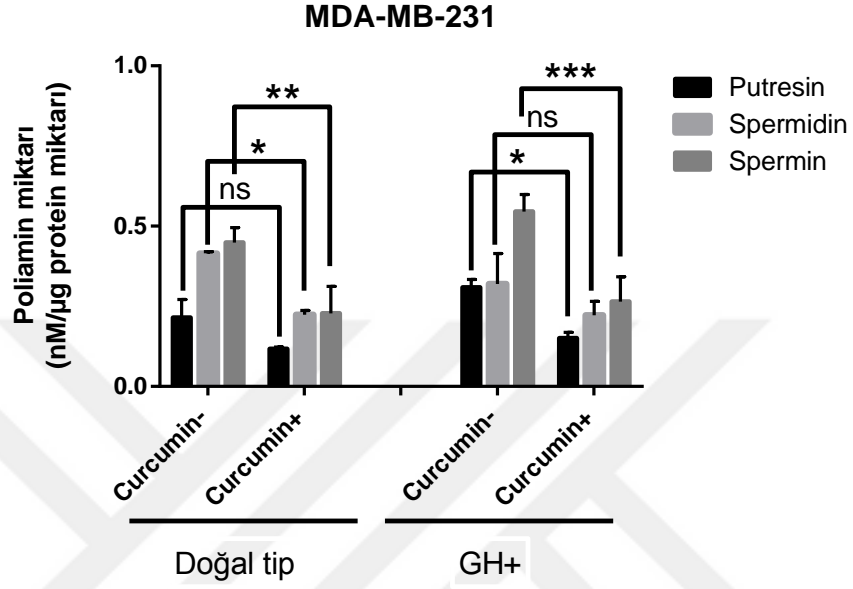


Şekil 40. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcuminin poliamin metabolizması üzerine etkisinin gösterilmesi. *p<0,001;****p<0,0001**

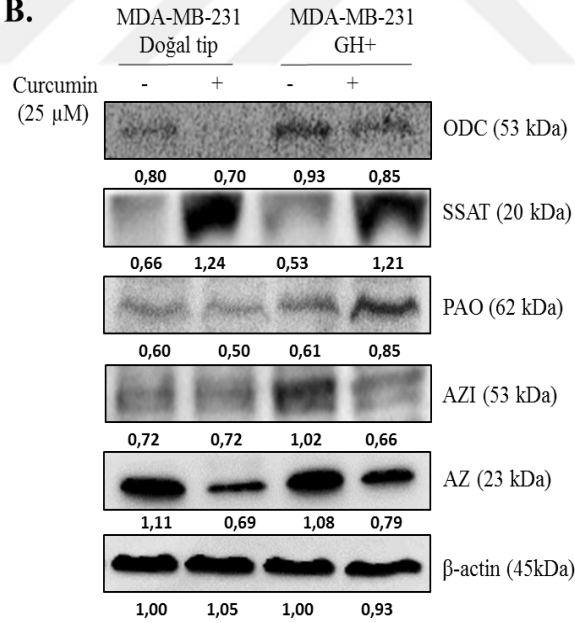
MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcumin uygulaması sonrasında sırasıyla putresin, spermidin, ve spermin düzeyleri azalmaktadır. C-myc anlatımı curcumin ile değişmemektedir. GH anlatımının kazandırılmasıyla poliamin biyosentezinde görevli ODC anlatımı artış göstermekle birlikte hem doğal tip hem GH+ hücre hattında curcumin uygulaması sonrası ODC anlatımı baskılanmaktadır. ODCregülasyonunu soğlayan AZ ve AZI enzimlerinin anlatım düzeyi curcumin uygulaması sonrasında azalmaktadır. Curcumin uygulaması

ile her iki hücre hattında da SSAT anlatımı azalırken PAO anlatımı GH+ hücre hattında artış göstermektedir. poliamin sentezinde görevli ODC enzimi anlatımının baskılanması ve PAO enzimi anlatımının artışı hücre içerisindeki poliamin havuzunun azalması ile sonuçlanır (Şekil 41).

A.



B.



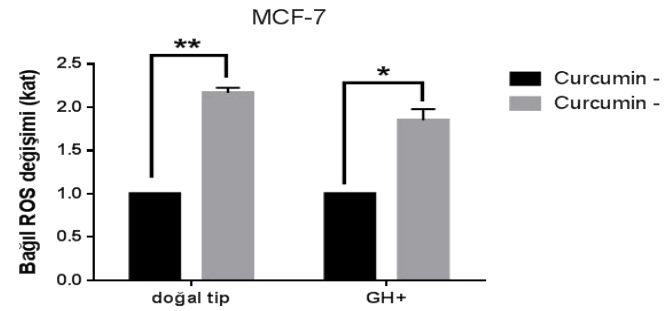
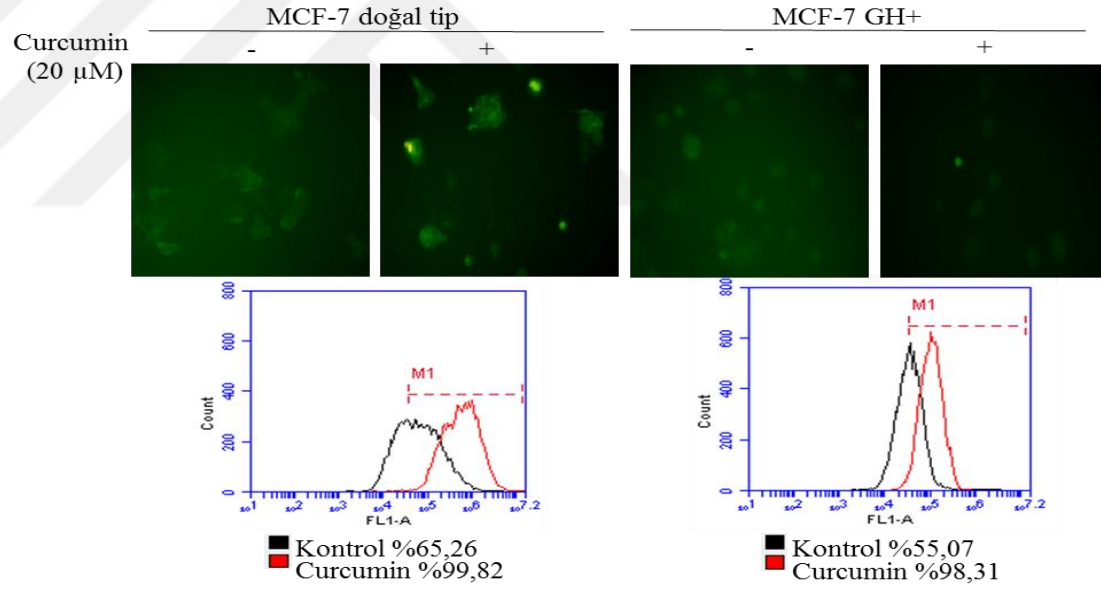
Şekil 41. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcuminin poliamin metabolizması üzerine etkisinin gösterilmesi. *p<0,05;p<0,01;***p<0,001**

6.17. Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında reaktif oksijen türleri (ROS) üzerine etkisi

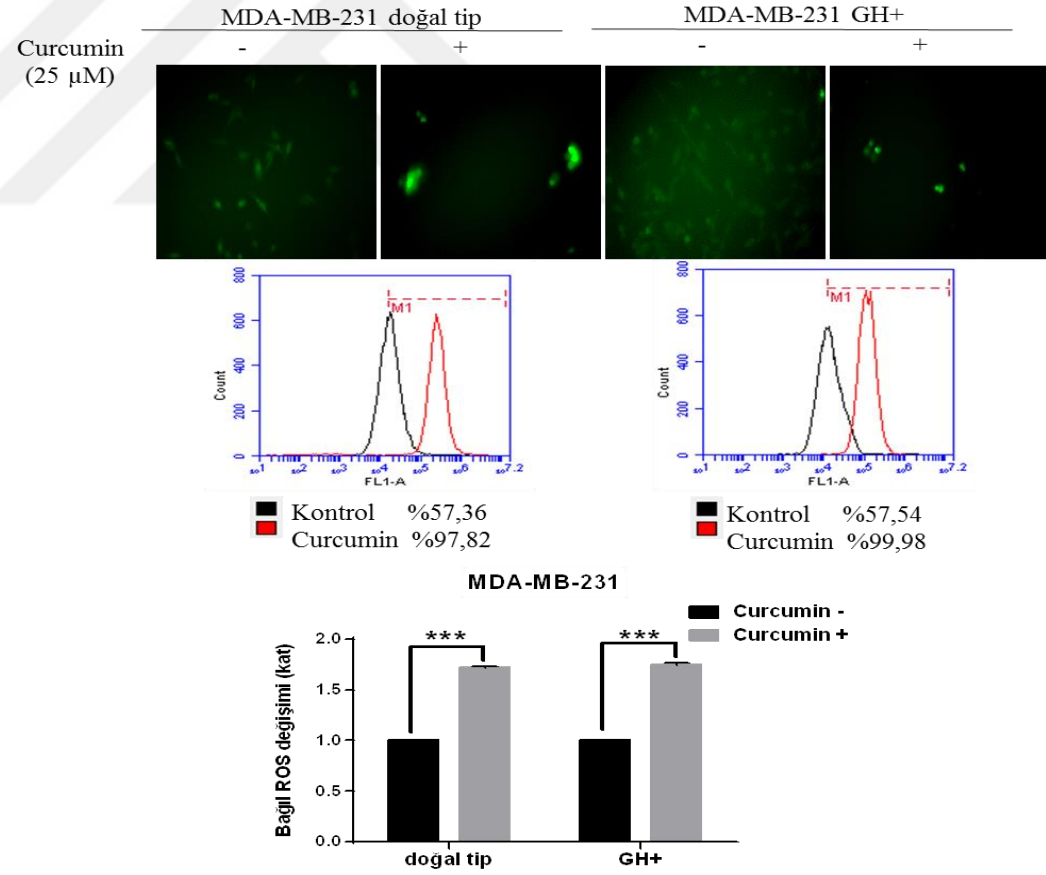
MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin ROS değişimi üzerine etkisi belirlemek amacıyla DCFH-DA boyama ve akış sitometre tekniği kullanılmıştır.

Curcumin uygulaması sonrası DCFH-DA boyaması gerçekleştirilerek hem floresan mikroskopunda görüntüleme yapılmış hem de akış sitometresinde analiz edilmiştir. Heriki meme kanseri hücre hattında da 24 saat boyunca uygulanan curcumin ROS üretimini indüklemektedir. MCF-7 doğal tip hücre hattında GH+ hücrelere oranla ROS düzeyinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 42).

MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarına bakıldığında ise curcumin uygulaması sonrasında her iki hücre hattında da ROS düzeyinin benzer oranda arttığı tespit edilmiştir (Şekil 43).



Şekil 42. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin ROS değişimi üzerine etkisinin gösterilmesi.
*** $p < 0,001$

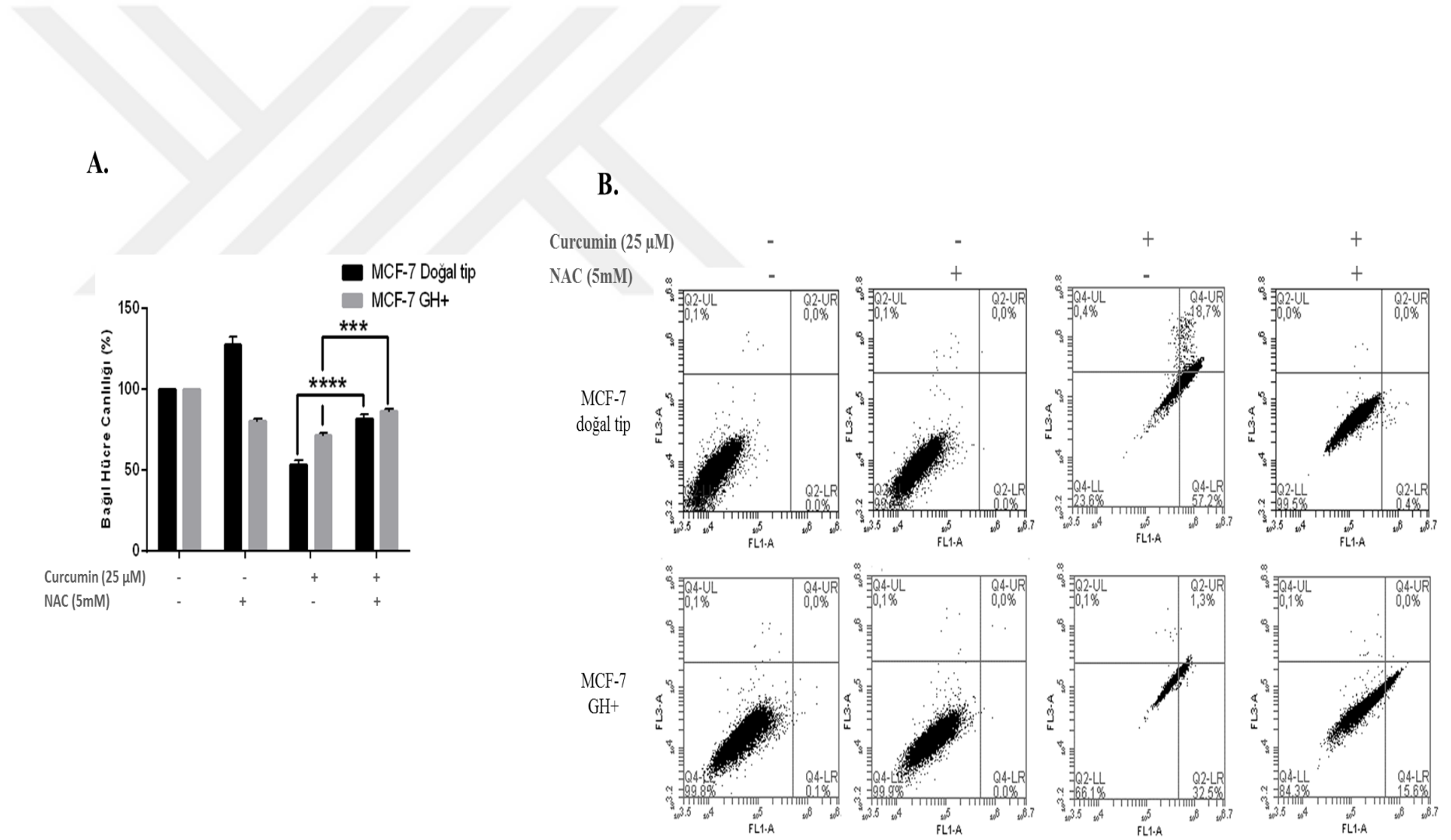


Şekil 43. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin ROS değişimi üzerine etkisinin gösterilmesi. ***p<0,001

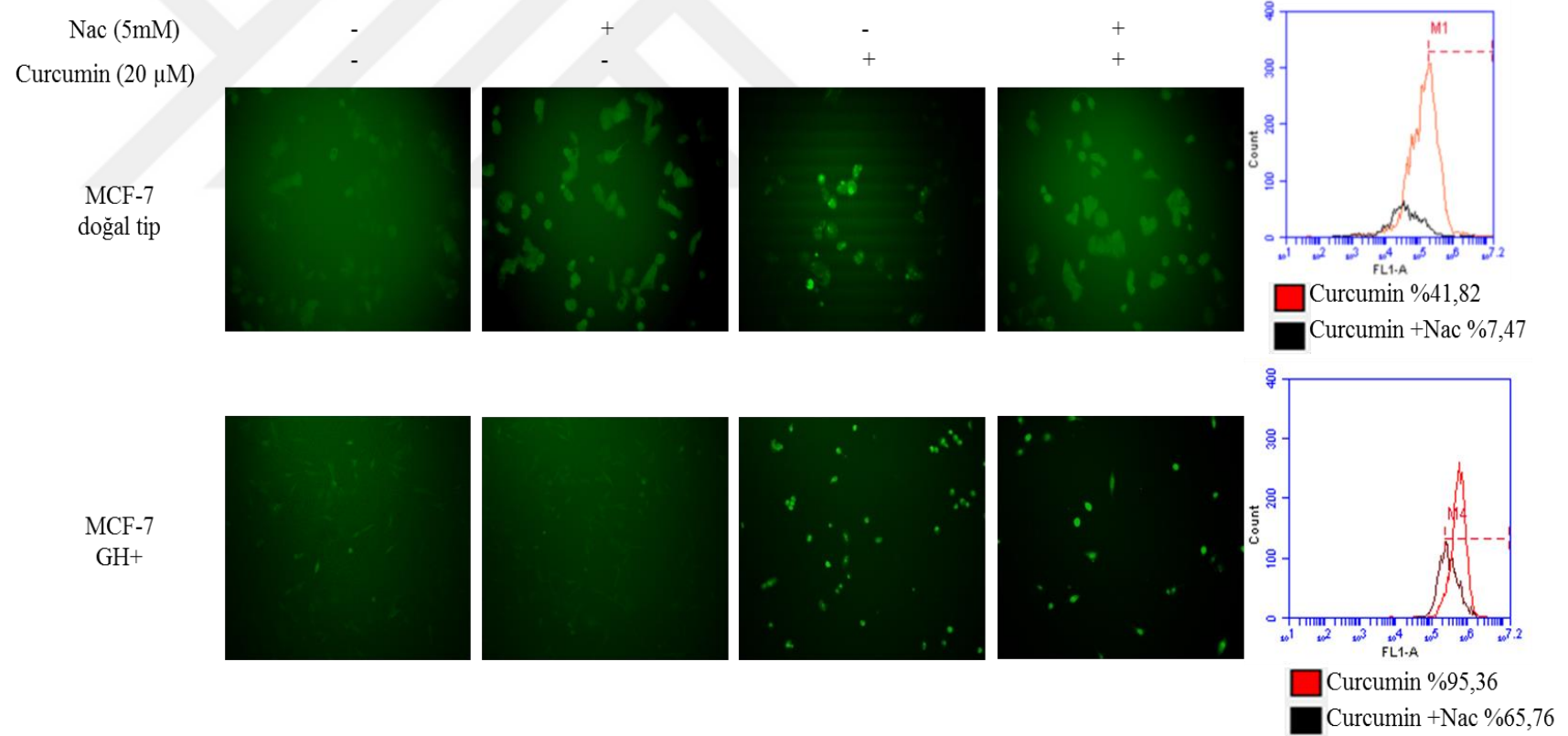
Curcuminin poliamin katabolizmasını aktive ederek ROS üretimini tetiklediğini kanıtlamak amacıyla ROS inhibitörü olan N-asetil sistein ajanı uygulanmıştır. Curcumin ve NAC uygulamasının hücre canlılığı ve apoptotik hücre ölümü üzerine etkisi gösterilmiştir. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında NAC uygulaması curcuminin etkinliğini azalmakta, hücre canlılığını arttırmakta ve curcuminin apoptotik etkisini geriye çekmektedir (Şekil 44)

MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin ROS oluşumunu tetikleyici etkisi, curcumin ve NAC uygulamasını takiben geri çekilmiştir (Şekil 45).

MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin hücre canlılığını azaltıcı ve apoptotik hücre ölümünü tetikleyici etkisi, curcumin ve NAC birlikte uygulaması ile geri çekilmiştir (Şekil 46). aynı zamanda curcuminin ROS oluşumunu tetikleyici etkisi de curcumin ile birlikte NAC uygulaması sonrası geriye çekildiği görülmüştür (Şekil 47).

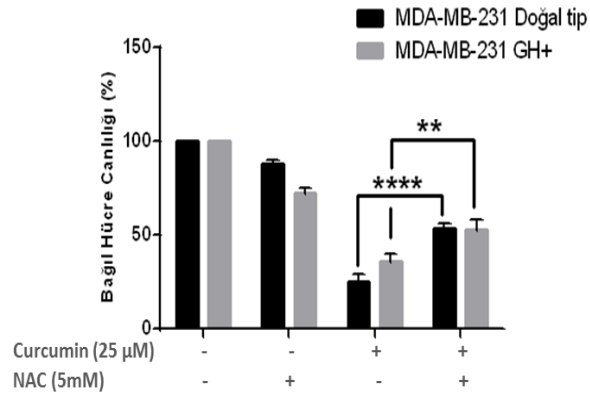


Şekil 44. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcumin ve NAC uygulamasının hücre canlılığı ve apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin gösterilmesi. *p<0,001;****p<0,0001**



Şekil 45.MCF -7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcumin ve NAC uygulamasının ROS oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi.

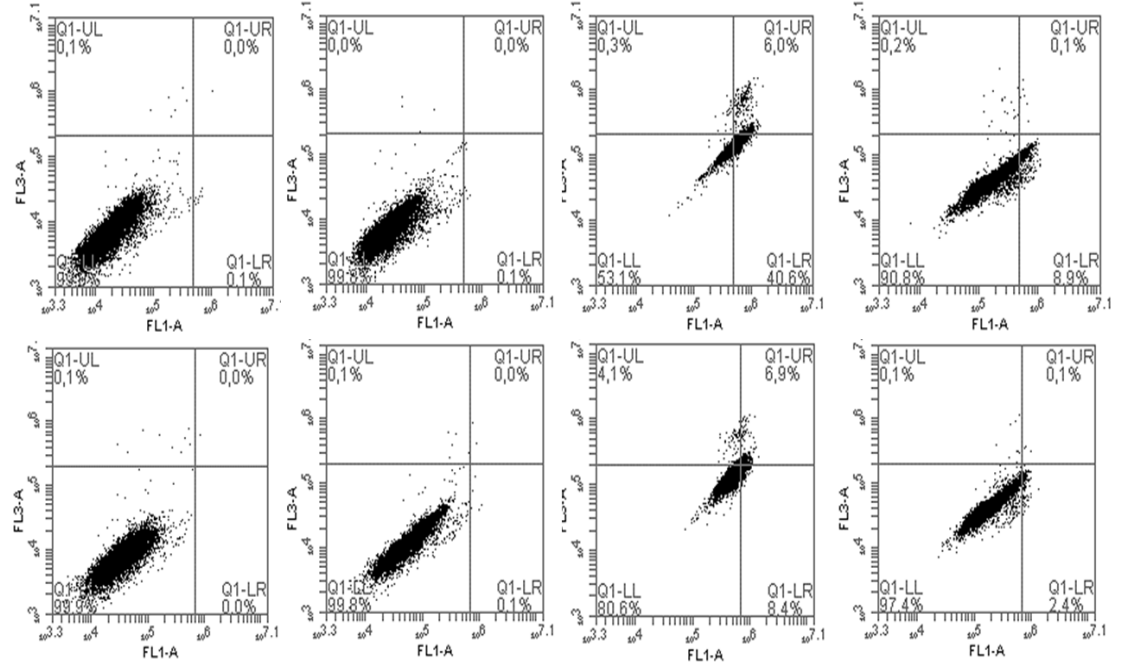
A.



B.

Curcumin (25 µM) - - + +
NAC (5mM) - + - +

MDA-MB-231
doğal tip



Şekil 46.. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcumin ve NAC uygulamasının hücre canlılığı ve apoptotik hücre ölümu üzerine etkisinin gösterilmesi. **p<0,01,****p<0,0001

NAC (5mM)
Curcumin (20 µM)

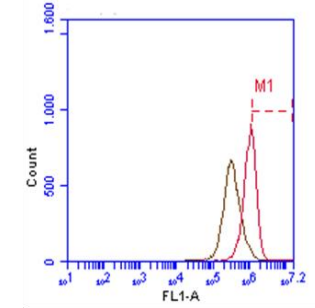
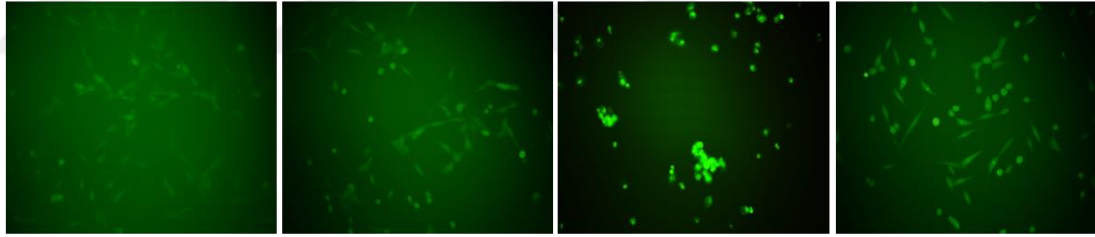
-

+

-

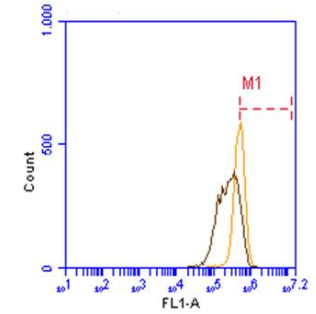
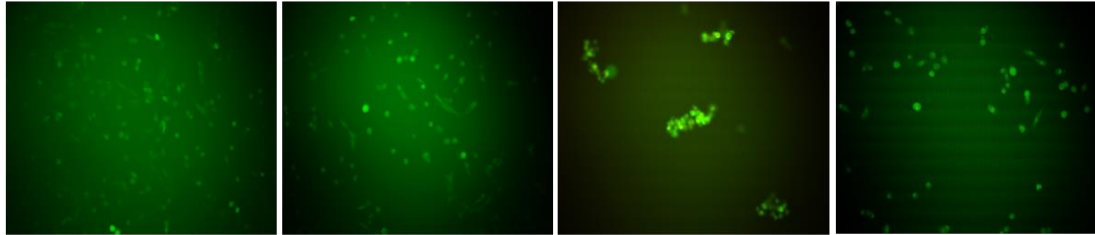
+

MDA-MB-231
doğal tip



Curcumin %41,16
Curcumin +Nac %2,22

MDA-MB-231
GH+

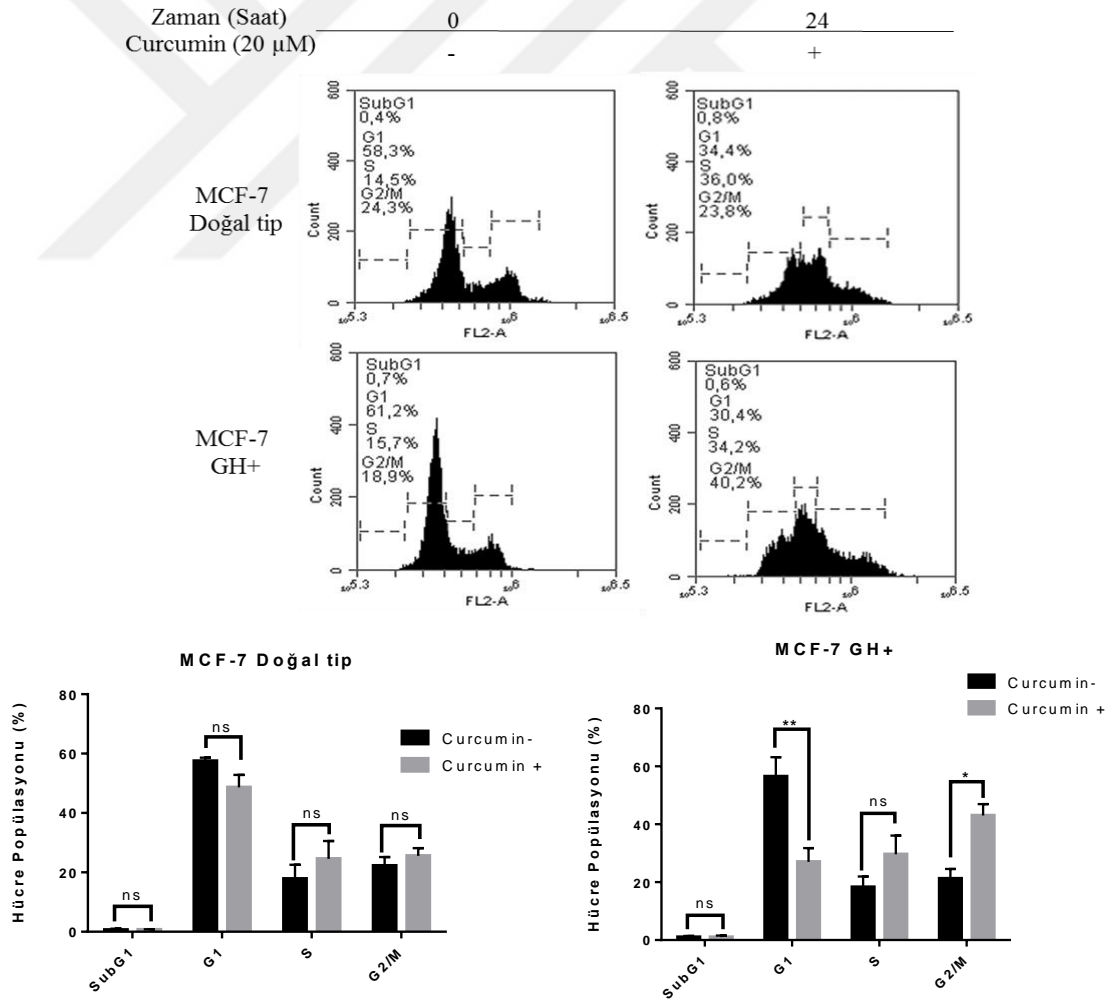


Curcumin %52,57
Curcumin +Nac %14,19

Şekil 47. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcumin ve NAC uygulamasının ROS oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi.

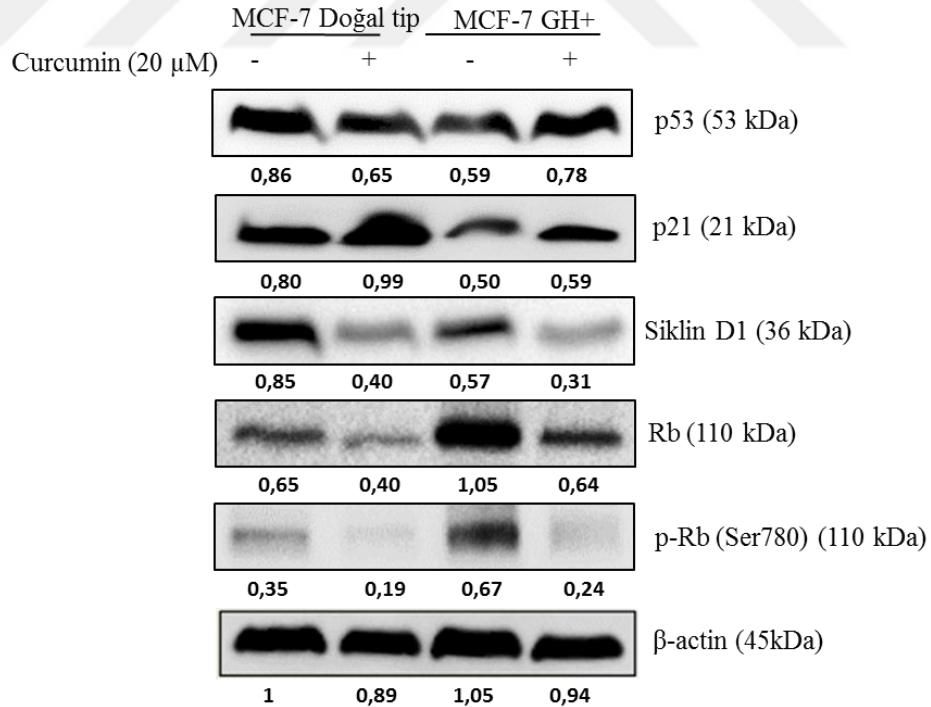
6.18. Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre döngüsü üzerine etkisi

Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre döngüsünü belirlemek amacıyla PI boyaması sonrası akış sitometresi kullanılmıştır. MCF-7 doğal tip hücre hattında curcumin uygulaması sonrasında SubG1 fazında herhangi bir değişim gözlemlenmez iken G1 popülasyonunda azalma, G2/M popülasyonunda ise artış saptanmıştır. MCF-7 GH+ hücre hattında ise doğal tip hücre hattına oranla G1 popülasyonunda daha yüksek miktarda bir düşüş, G2/M popülasyonunda daha fazla artış görülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda curcuminin MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü üzerinde G2/M fazını durducu etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 48).



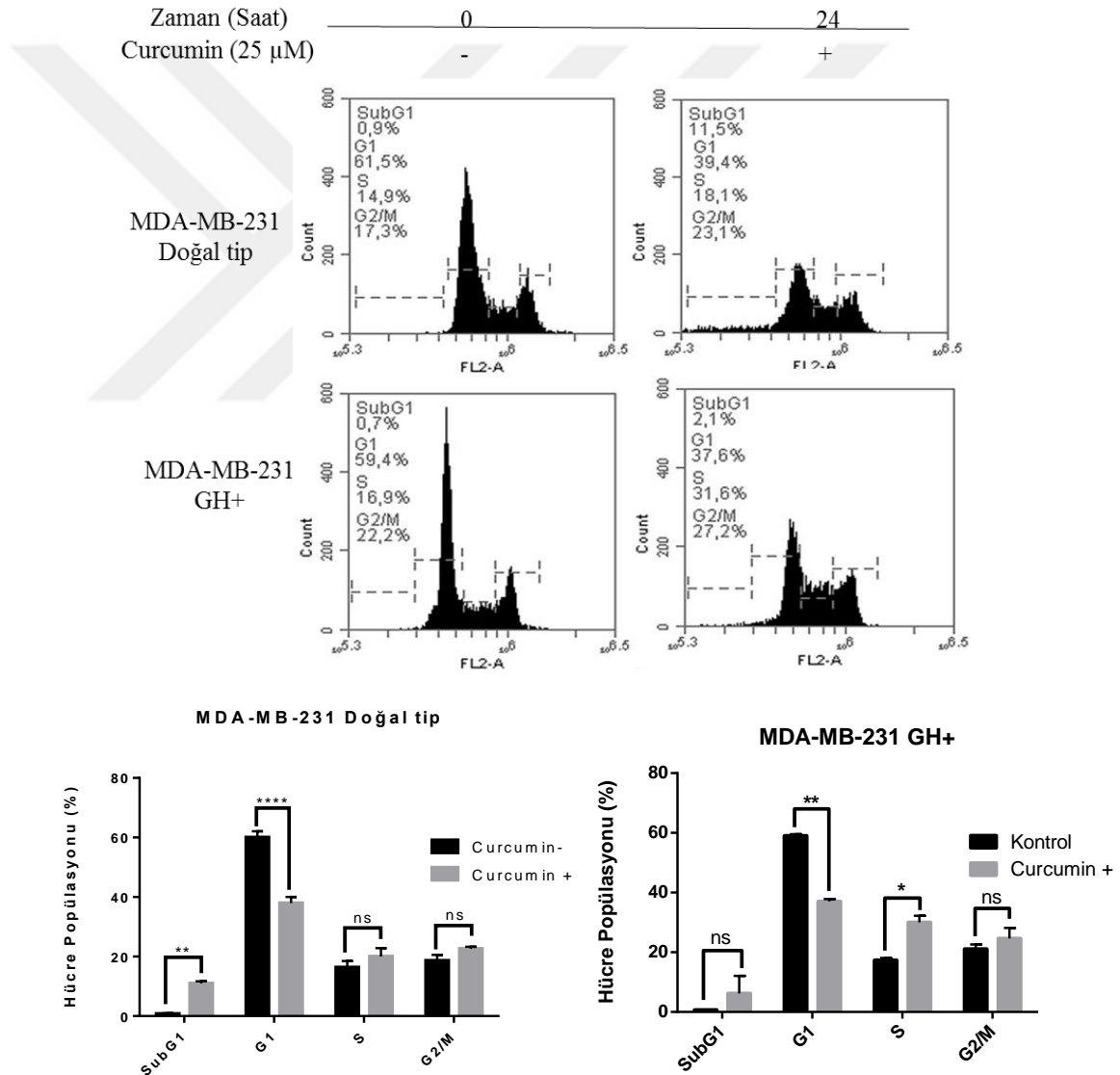
Şekil 48. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin hücre döngüsü üzerine etkisinin gösterilmesi. *p<0,05;**p<0,01

MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin hücre döngüsü üzerine etkisini belirlemek amacıyla G1-S faz geçişinde önemli rollere sahip çeşitli belirteçlerin anlatımları immunoblotlama tekniği ile gösterilmiştir. Sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olan p21'in transkripsiyonel regülasyonunu sağlayan tümör supresör protein olan p53 anlatım düzeyi, MCF-7 doğal tip hücre hattında curcumin uygulaması sonrası değişim göstermez iken GH+ hücre hattında artış göstermektedir. p53' e bağlı olarak p21 anlatımı da GH+ hücre hattında artmaktadır. SiklinD1 CDK4 ile kompleks oluşturarak Rb proteininin fosforilasyonundan sorumludur. Buna bağlı olarak siklin D1 doğal tip hücrelerde curcumin ile birlikte baskılanır iken GH+ hücrelerde artmaktadır. Rb proteini G1 fazında E2F ile birlikte kompleks halinde bulunmaktadır. Ancak S fazına geçiş sürecinde siklin D1 ve CDK4 kompleksi tarafından fosforile edilir. Curcumin her iki hücre hattında da Rb anlatımını baskılamakta ve aynı zamanda fosforilasyonunu inhibe etmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda curcuminin MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hattında hücre döngüsünü G1 fazında durdurucu etkiye sahip olduğu görülmektedir (Şekil 49).



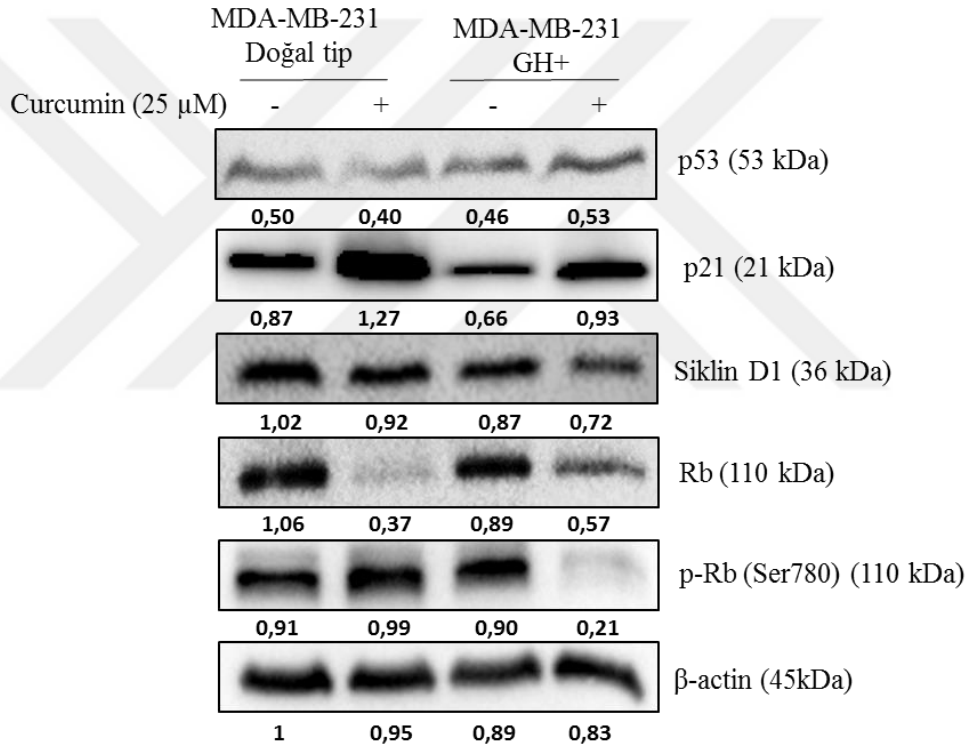
Şekil 49. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcuminin G1/S geçişinde fonksiyonel proteinlerin anlatımını üzerine etkisinin gösterilmesi.

MDA-MB-231 doğal tip hücre hattında curcumin SubG1 popülasyonunu arttırmaktadır. Bununla birlikte G1 popülasyonunda düşüşe neden olmaktadır. MDA-MB-231 GH+ hücre hattında ise aynı şekilde SubG1 popülasyonunu artırırken G1 popülasyonunu düşürmektedir. Curcumin her iki hücre hattında da SubG1 popülasyonunu arttırarak hücre ölümüne neden olmaktadır. MDA-MB-231 doğal tip hücre hattında %11,5 SubG1 popülasyonu var iken GH+ hücre hattında bu değer %2,1 'dir. GH anlatımının varlığı ile MDA-MB-231 hücre hattı daha agresif bir profile sahip olmakta ve hücre ölümüne karşı daha dirençli bir profil sergilemektedir (Şekil 50).



Şekil 50. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin hücre döngüsü üzerine etkisinin gösterilmesi. *p<0,05;**p<0,01;****p<0,0001

MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin hücre döngüsü üzerine etkisini belirlemek amacıyla G1-S faz geçişinde önemli rollere sahip çeşitli belirteçlerin anlatımları immunoblotlama tekniği ile gösterilmiştir. MDA-MB-231 doğal tip hücre hattında p53 anlatımı curcumin uygulaması ile önemli derecede değişim göstermez iken GH+ hücre hattında artmaktadır. Bununla birlikte curcumin CDK inhibitörü olan p21 anlatımını her iki hücre hattında da arttırmaktadır. Siklin D1 anlatımı curcumin uygulaması ile azalmaktadır. Buna bağlı olarak Rb anlatım düzeyi ve fosforilasyonu da baskılanmaktadır. Curcumin MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında da G1 fazında durdurucu etkiye sahiptir (Şekil 51).

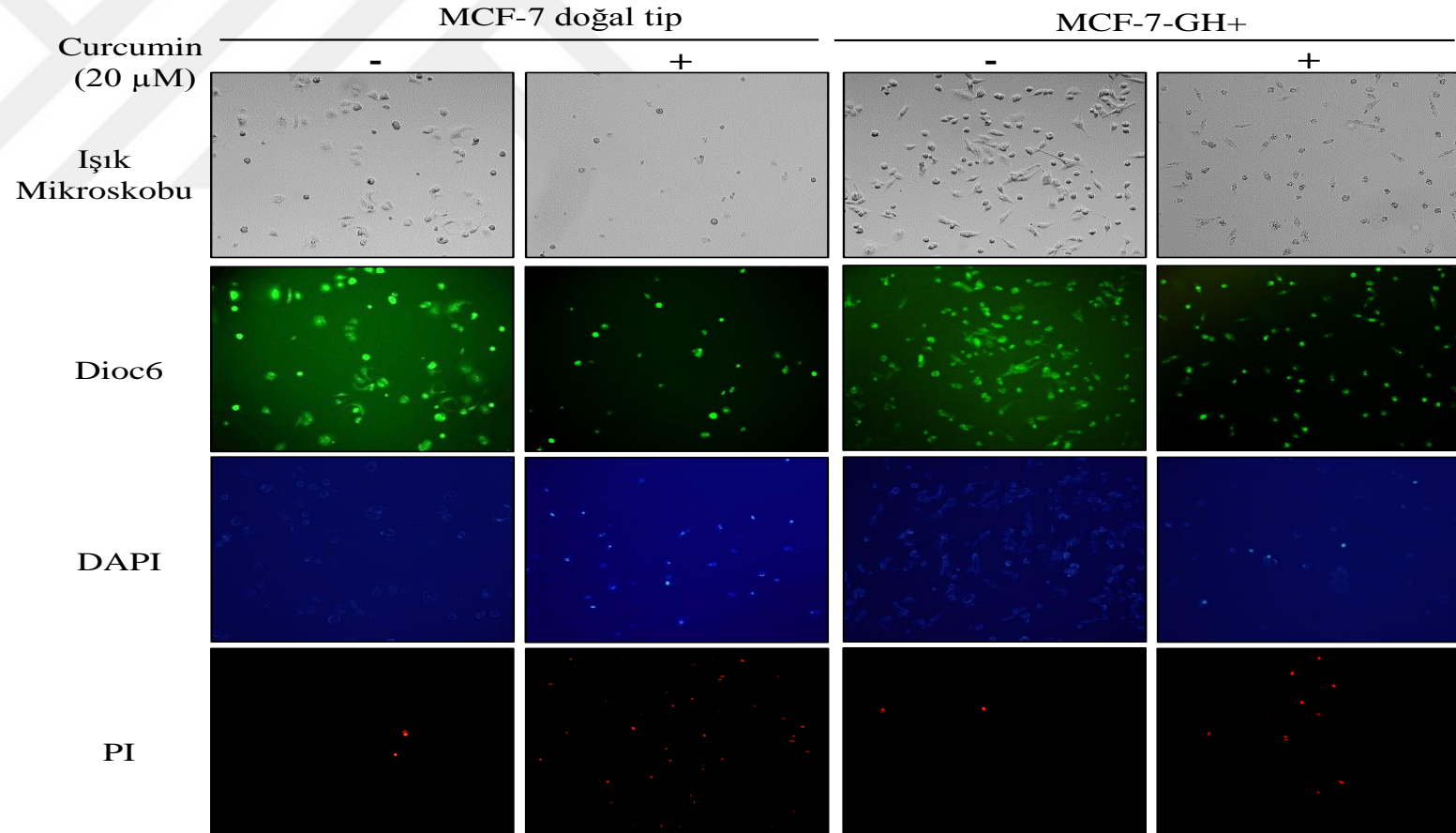


Şekil 51. MDA-MB-2317 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcuminin G1/S geçişinde fonksiyonel proteinlerin anlatımı üzerine etkisinin gösterilmesi.

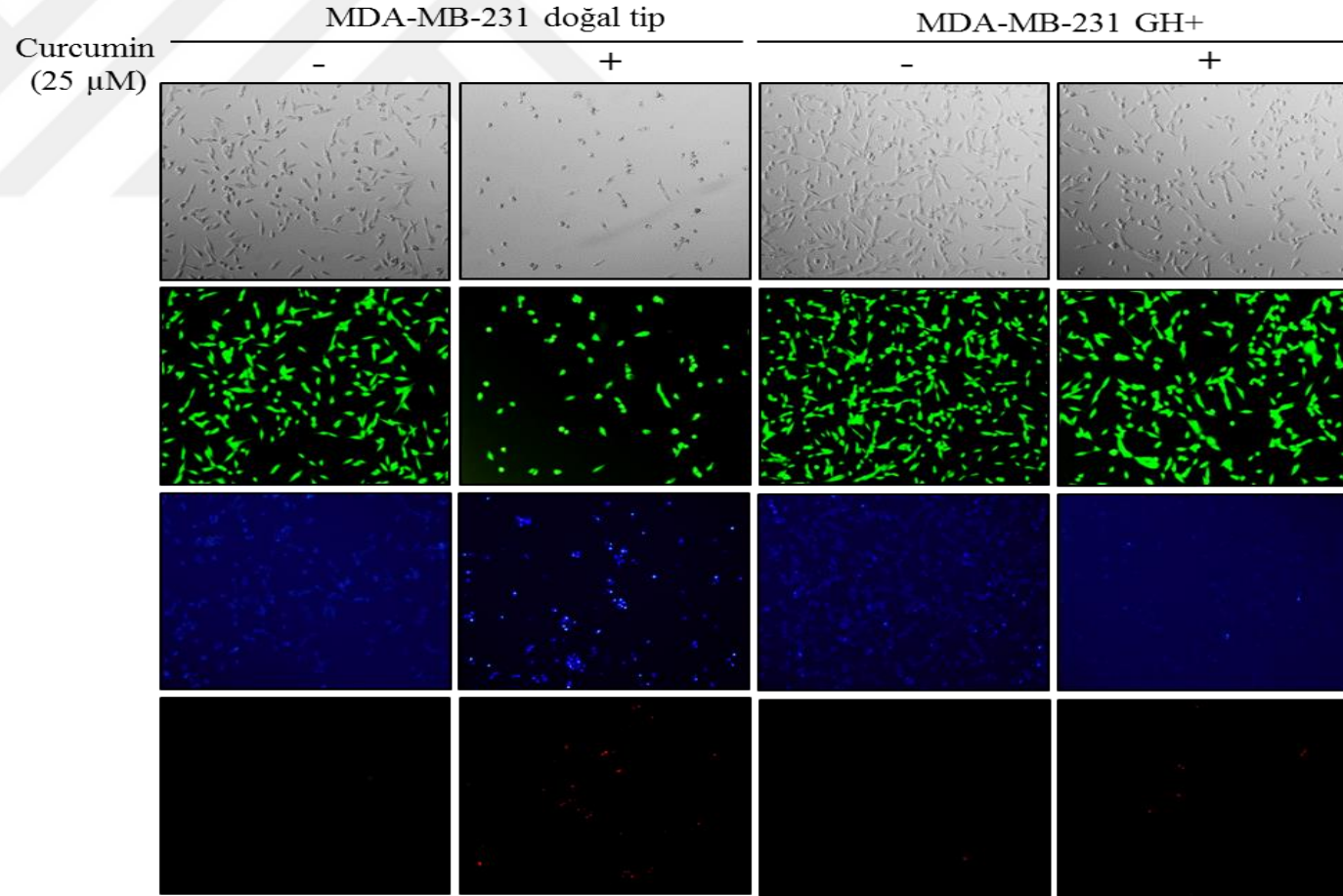
6.19. Curcumin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre ölümü üzerine etkisi

Curcumin uygulamasının MCF-7 doğal tip, GH+ meme kanseri hücrelerinde hücre ölümü, mitokondriyal membran potansiyel (MMP) değişikliği ve nükleer kondenzasyon üzerine etkisini gösterebilmek için Dioc6, DAPI ve PI floresan boyamaları gerçekleştirilmiştir. MCF-7 hücrelerinde curcumin uygulaması ile birlikte doğal tip hücre hattında MMP azalırken otokrin GH anlatımı gerçekleşen hücre hattında da ilaç uygulanmayan hücrelere kıyasla MMP düşürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca curcuminin doğal tip hücrelerde hücre ölümü ve nükleer kondenzasyon üzerine etkisinin GH+ MCF-7 hücrelerine kıyasla daha fazla olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 52).

Curcumin uygulaması ile birlikte doğal tip hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli azalırken otokrin GH anlatımı gerçekleşen hücre hattında büyük bir değişiklik gözlemlenmemektedir. MDA-MB-231 doğal tip hücre hatlarında curcumin uygulaması ile birlikte DNA kırıkları artar iken MDA-MB-231 GH+ hücre hattında doğal tipe oranla daha az DNA kırıkları görülmektedir. Curcumin uygulaması sonrasında MDA-MB-231 doğal tip hücre hattında ölü hücre sayısında artış görülmektedir. MDA-MB-231 GH+ hücre hattında ise doğal tipe oranla ölü hücre sayısındaki artış daha az olarak gözlemlenmiştir (Şekil 53)



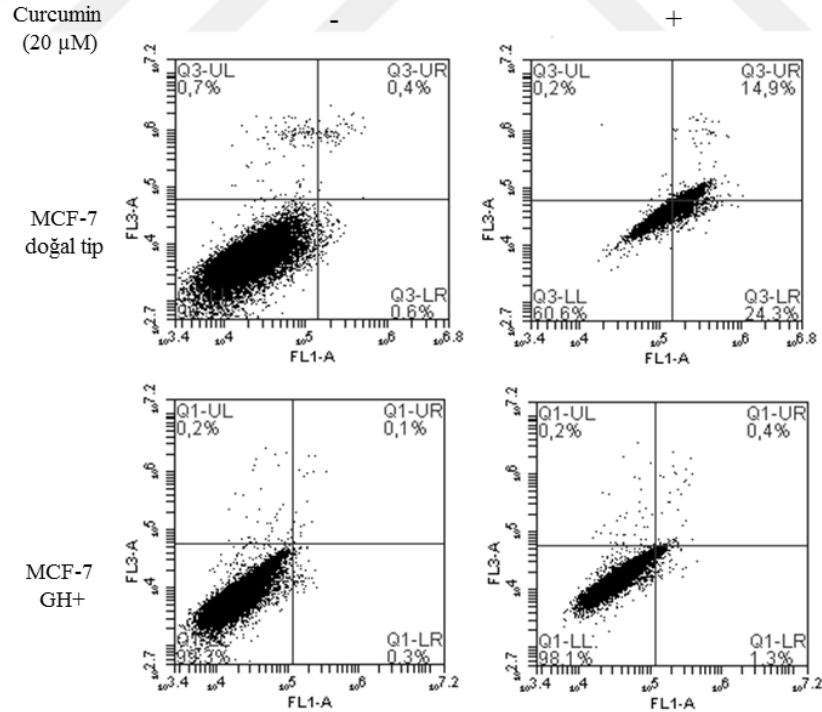
Şekil 52. Curcuminin MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre ölümü üzerine etkisinin gösterilmesi. Büyütme: 10X



Şekil 53. Curcuminin MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre ölümü üzerine etkisinin gösterilmesi. Büyütme 10X

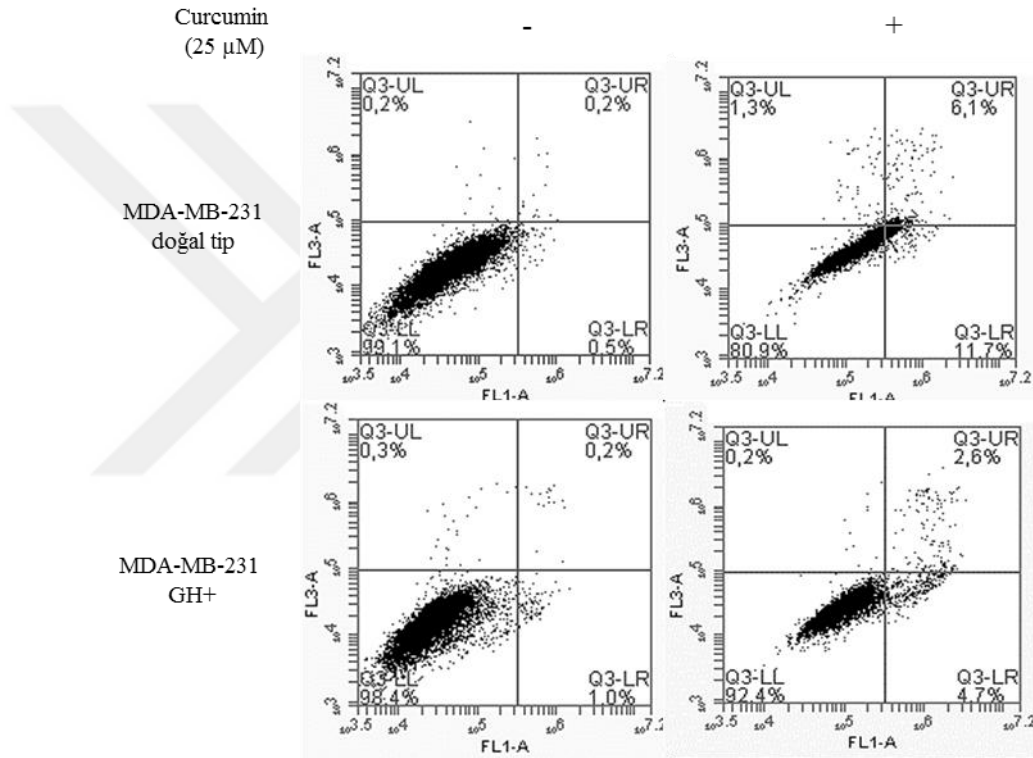
Curcuminin hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla Annexin V-FITC Propidyum iyodür boyamaları gerçekleştirilip hücre akış sitometresinde hücre populasyonları irdelenmiştir. Normal şartlarda hücre içi membranda bulunan fosfotidilserinin apoptotik süreçte hücrenin dış membranına geçişi söz konusu olması nedeni ile ancak apoptotik ölüme giden hücreler Annexin V boyası ile fosfotidilserinleri üzerinden bağlanmaktadır. Propidyum iyodür boyası ise ölü hücrelerde sitoplazmik membran bütünlüğünün bozulması ile hücre içerisine girebilmekte ve DNA'ya bağlanmaktadır. Böylece curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerinde erken, geç apoptotik ve nekrotik ölüm üzerine etkisi irdelenmiştir.

MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin erken apoptotik hücre ölümünü tetiklemektedir. Doğal tip hücre hattında %24.3, GH+ hücre hattında ise %1.3'lük erken apoptotik hücre populasyonu bulunmaktadır. Bununla birlikte doğal tip hücre hattında %14.9'lük bir hücre populasyonu da geç apoptotik süreçtedir. MCF-7 meme kanseri hücre hattında GH geninin kazandırılması, curcumin tarafından indüklenen apoptotik hücre ölümüne karşı bir direnç oluşumunu tetiklemiştir (Şekil 54).



Şekil 54. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin V-PI boyama yöntemi ile gösterilmesi

MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında ise curcumin erken apoptotik hücre ölümünü tetiklemektedir. MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile kıyaslandığında MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının curcumin tarafından indüklenen apoptotik hücre ölümüne karşı daha dirençli olduğu belirlenmiştir. Doğal tip hücre hattında %11.7, GH+ hücre hattında ise %4.7'lik erken apoptotik hücre popülasyonu bulunmaktadır. Ayrıca doğal tip hücrelerde %6.1, GH+ hücrelerde ise %2.6 oranında geç apoptotik hücre popülasyonu belirlenmiştir. Sonuç olarak GH+ hücre hattında curcumin tarafından tetiklenen apoptotik hücre ölümüne karşı bir direncin varlığı belirlenmiştir (Şekil 55).



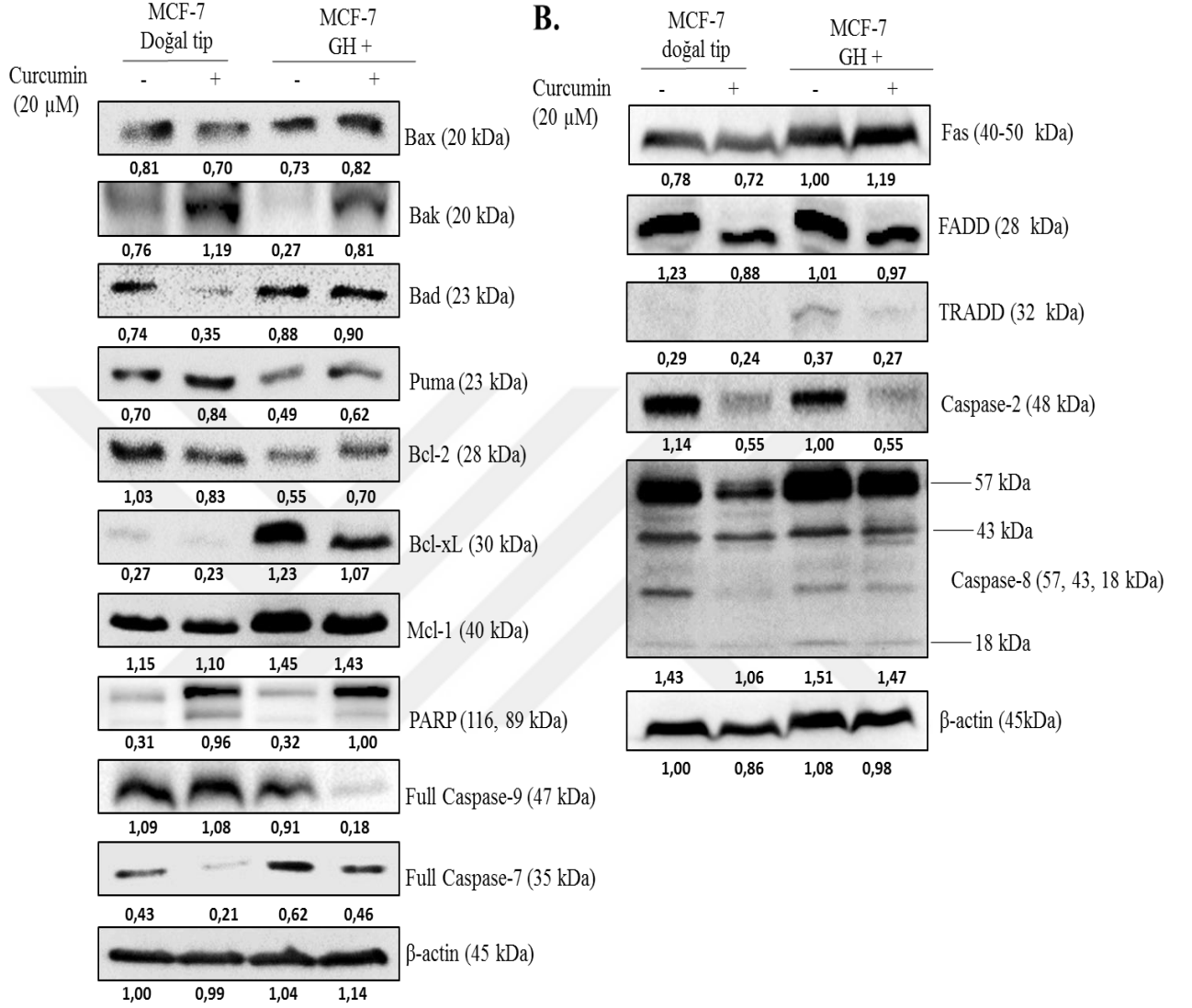
Şekil 55. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin V-PI bayama yöntemi ile gösterilmesi

Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında içsel apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla immunoblotlama tekniği kullanılmıştır. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında pro-apoptotik belirteçlerden Bax, Bak ve Puma curcumin uygulaması sonrası artış göstermekle birlikte Bcl-2 ve Bcl-xL gibi anti apoptotik belirteçlerde azalma görülmektedir. Bunun yanısıra pro-apoptotik belirteçlerden Bad anlatımı doğal tip hücrelerde azalırken GH+ hücrelerde değişim göstermemektedir. Anti-apoptotik belirteçlerden Mcl-1 ise hem doğal tip hem de GH+ hücrelerde değişim göstermez iken GH+ hücre hattındaki anlatımı daha yüksektir. Bir diğer apoptotik belirteç olan PARP curcumin uygulaması ile hem doğal tip hem de GH+ hücre hattında kesilmiştir. Hücrenin apoptotik ölüm sürecinde hücre içi filamentlerin degradasyonunda görevli enzimlerden kaspaz-9 ve kaspaz-7 anlatımları curcumin uygulaması ile azalmaktadır. Full kaspazlar kesilerek aktif formlarını oluşturacağından curcumin kaspaz-9 ve -7 aktivasyonunu tetiklemektedir. Curcumin ile indüklenen içsel apoptotik ölüm yolağı MCF-7 doğal tip hücre hattında GH+ hücre hattına oranla daha aktif olduğu belirlenmiştir (Şekil 56A)

Dışsal apoptotik yolda ise apoptotik sinyal UV veya çeşitli kimyasal ajanlar tarafından hücre dışından gelmektedir. Apoptotik sinyal membranda lokalize olan Fas ve ölüm reseptörleri tarafından alınır. Hücre içerisine aktarımı sürecinde FADD ve TRADD gibi adaptör moleküller rol almaktadır. Bu moleküller kaspaz-8 ve -2 aktivasyonunda görevlidir. Kaspaz-8 ve -2 aktivasyonu kaspaz kaskadını başlatarak efektör kaspazların aktive olmasını sağlamaktadır. Curcuminin dışsal apoptotik yolda görevli moleküllerin anlatımları üzerine etkisi immunoblotlama tekniği kullanılarak irdelenmiştir.

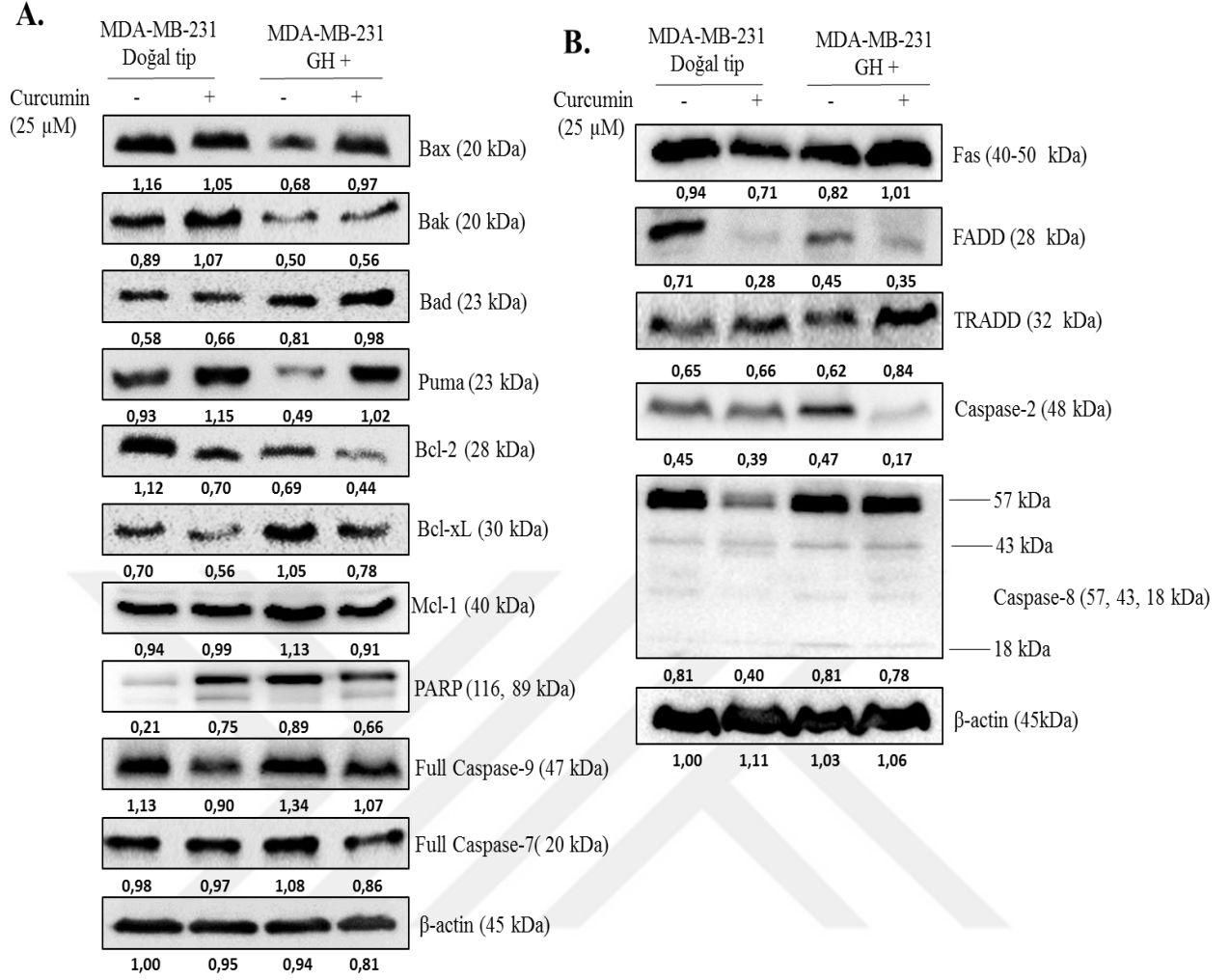
MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin Fas ve TRADD anlatımında önemli derecede bir değişime neden olmaz iken FADD anlatımını her iki hücre hattında da baskılamaktadır. Curcumin hem doğal tip hem de GH+ hücre hattında kesilmiş kaspaz-8 anlatımında bir değişime neden olmaz iken doğal tip hücre hattında full kaspaz-8 anlatımını azaltmaktadır. Dışsal apoptotik yolda görevli bir diğer kaspaz molekülü ise kaspaz-2'dir. Kaspaz-2 mRNA molekülü alternatif kesilim sürecinde iki formu oluşmaktadır. Bunlar kısa ve uzun form olarak isimlendirilmektedir. Uzun formu apoptozda görev alırken kısa formu apoptozda zıt olarak çalışmaktadır. Bu durumda curcumin uygulanan hem doğal tip hem de GH+ hücre hattına baktığımızda kaspaz-2 anlatımının azaldığı

görülmektedir. Curcumin MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında dışsal apoptotik yolağı kaspaz-2 üzerinden aktive etmektedir (Şekil 56B).



Şekil 56. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin içsel ve dışsal apoptotik yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi.

MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin özellikle Bak ve Puma anlatımını arttırmaktadır. Anti-apoptotik belirteçlerden Bcl-2 ve Bcl-xL anlatımı hem doğal tip hem de GH+ hücre hattında curcumin uygulaması ile birlikte azalmaktadır. Ancak Mcl-1 anlatımı MDA-MB-231 doğal tip hücre hattında curcumin uygulaması ile bir değişim göstermez iken GH+ hücre hattında azalmaktadır. Curcumin MDA-MB-231 doğal tip hücre hattında daha yüksek oranda olmak üzere GH+ hücre hattında da PARP kesilimini tetiklemektedir. Bunun yanısıra full kaspaz-9 ve -7 anlatımı her iki hücre hattında da curcumin etkisiyle azalmaktadır (Şekil 57A). MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında dışsal yolağa bakıldığında ise curcumin uygulaması sonrası Fas anlatımı doğal tip hücre hattında artarken GH+ hücre hattında azalmaktadır. FADD anlatımı hem doğal tip hem de GH+ hücre hattında curcumin ile baskılanmaktadır. TRADD anlatımı ise GH+ hücre hattında curcumin uygulaması ile artarken doğal tip hücre hattında azalmaktadır. Curcuminin kaspaz-8 üzerine MCF-7 meme kanseri hücre hattında olduğu gibi benzer bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Kaspaz-2'nin kısa formu üzerinde ise GH+ hücre hattında baskılayıcı bir etkiye sahip iken doğal tip hücrelerde bir değişime neden olmamıştır (Şekil 57B).



Şekil 57. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin içsel ve dışsal apoptotik yolak üzerine etkisinin gösterilmesi

BÖLÜM V

7. TARTIŞMA

Meme kanseri batı ülkelerinde kadınlar arasında genellikle ortak olarak görülen kanser tiplerinden biridir ve en sık karşılaşılan türü duktal karsinomdur. Meme kanserine yakalanan kadınların yaklaşık olarak %6,6'sının 40 veya daha genç yaşta bireyler olduğu görülmüştür. Bununla birlikte meme kanseri gelişim süreci genetik faktörler tarafından da tetiklenmekle birlikte *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonlar bu açıdan önem teşkil etmektedir [70]. Genetik faktörlerin yanısıra besleme faktörleri, pro-inflamatuar ajanlar vasıtasıyla inflamasyonun tetiklenmesi de meme kanserinde nüksetmeye ve sağkalım oranlarının düşmesine neden olmaktadır. Yaşam tarzının da meme kanseri gelişim ve tedavi sürecinde önemli rol oynamaktadır, iyileştirilmesi durumunda hastalarda sağkalım oranını artmakta ve meme kanseri nedeni ölüm oranını azalmaktadır [71].

Meme bezlerinin gelişimi endokrin sistem tarafından kontrol edilmektedir. Özellikle yumurtalıkla ilgili olan hormonlarından östrojen ve progesteron ile hipofiz bezi hormonlarından GH ve PRL bu aşamada rol almaktadır [72]. GH hipofiz bezinin ön lobundan salınan bir hormon olup sentezi, depolanması ve salınımı somatotrofik hücreler tarafından gerçekleştirilir. Somatotroplarda GH sentezi GHRH tarafından tetiklenirken somatostatin tarafından da inhibe edilmektedir. Hücrelerden salınan GH dolaşım sistemine katılarak karaciğerde IGF-I salınımını tetiklemektedir. Böylece meme bezi ve meme epitel hücrelerinin gelişimi ve farklılaşması sağlanmaktadır [73]. Uzun süreli çeşitli steroid hormonların uygulanmasının da meme kanserinde önemli bir risk faktörü olduğu, yapılan deney hayvanları ve epidemiyolojik çalışmaların yüksek düzeyde GH varlığının artan meme kanseri riski ile ilişkili olduğu belirlenmiştir [74]. Buna bağlı olarak yapılan çalışmada yüksek GH salınımı ile ilişkili olan akromegali hastalarında meme kanserine yakalanma oranının yüksek olduğu tespit edilmiştir [75]. Ayrıca meme kanseri hücrelerinin de GH salınımını gerçekleştirebildiği görülmüştür [76]. Otokrin GH sinyalinin meme kanseri hücre

hattında mezenkimal, invazif fenotipi tetiklediği ve agresif tümör oluşumuna neden olduğu görülmüştür [77].

Meme kanserinde tedavi amaçlı geliştirilen stratejiler genellikle hücre büyüme, farklılaşma, mobilite ve apoptoz ile ilişkili sinyal mekanizmalarının karakterize edilmesine dayanmakla birlikte bu mekanizmalar üzerinden terapötik potansiyele sahip çeşitli kemoterapötik ajanların geliştirilmesi ve hücre içi moleküler mekanizmalarının aydınlatılması önem taşımaktadır [78]. Curcumin, *Curcuma longa* bitkisinin rizomundan izole edilen sarı renkli fenolik bir bileşiktir. Meme, kolon ve prostat gibi birçok kanser türünün tedavisinde günümüzde yapılan çalışmalarla önemli rol oynadığı gösterilmiştir [79]. Yapılan çoğu çalışmada curcuminin meme kanseri hücrelerinde NF-κB sinyal yolağını modüle ederek hücre büyümesini inhibe ettiği [80], HER2 onkoproteinini azalttığı ve buna ek olarak Akt, MAPK fosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir [81]. Aynı zamanda curcuminin meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu, Bax anlatımını arttırdığı ve Bcl-2 anlatımını baskıladığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [80].

Tüm bu bilgiler ışığında yapılan bu çalışmada amaç, otokrin GH sinyali aktive edilen ve edilmeyen MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında curcuminin hücre sağkalımı, invazyon ve metastaz, NF-κB sinyali, poliamin metabolizması ROS üretimi ve apoptotik hücre ölümü üzerine etkilerini irdelemektedir. Bu amaç doğrultusunda ER pozitif olan ve daha yuvarlak hücre morfolojisine sahip MCF-7 ile ER negatif olup buna bağlı olarak daha agresif bir profil sergileyen ve daha mekiksi hücre morfolojisine sahip MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri kullanılmıştır (Şekil 13). Öncelikle MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerine GH geni PC3.1 vektörü aracılığı ile transfekte edildikten sonra GH anlatımı en fazla olan klonun neomisin (G418) antibiyotiği ile seçim gerçekleştirilmiş olup stabil hücre hatları elde edilmiştir (Şekil 14).

Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, otokrin büyüme hormonu sinyali aktive olan hücrelerde hücre büyümesi ile ilişkili sinyallerin indüklenmesine bağlı olarak doğal tip hücrelere oranla hücre proliferasyon hızında artış saptanmıştır (Şekil 15). GH geni aktarılan hücrelerde GH proteininin sentezi ve salınımını belirlemek amacıyla ELISA tekniği kullanılmış olup hücrelerden ekstrasellular alan GH salınımının gerçekleştiği gösterilmiştir (Şekil 16).

Curcuminin meme kanseri hücrelerinde GH üzerine etkisini belirleyebilmek amacıyla gerçekleştirilen immunoblotlama sonuçları incelendiğinde artan

konsantrasyonda 24 saat boyunca uygulanan curcumin ile MCF-7 GH+ hücre hattında GH anlatımı 20 μM 'den itibaren baskılanmaya başlamıştır. MDA-MB-231 GH+ hücre hattında ise 25 μM curcumin uygulamasından itibaren GH anlatımında baskılanma tespit edilmiştir. 48 saat boyunca uygulanan curcumin sonrası MCF-7 GH+ hücre hattında GH anlatımı artan konsantrasyona bağlı olarak azalır iken MDA-MB-231 GH+ hücre hattında GH anlatımında bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 17).

MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında zamana bağlı olarak artan konsantrasyonlarda uygulanan curcuminin hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. otokrin GH sinyalinin aktive edilmesi ile birlikte her iki meme kanseri hücre hattında da doğal tip hücrelere oranla curcuminin anti-proliferatif etkisine karşı bir direnç oluşumu söz konusu olmuştur. MCF-7 doğal tip hücrelerde 24 saat süre ile 20 μM curcumin uygulanmasının ardından %50 oranında canlılık görülürken, MCF-7 GH+ hücre hattında bu oran %73 olarak saptanmıştır. MDA-MB-231 doğal tip hücre hattında 24 saat süre ile 25 μM curcumin uygulanmasının ardından %50 oranında canlılık görülürken, MDA-MB-231 GH+ hücre hattında ise bu oran %76 olarak tespit edilmiştir. 48 saat boyunca uygulanan curcumin de hem doğal tip hem de GH+ her iki meme kanseri hücre hattında da hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir (Şekil 18). Bununla birlikte curcumin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre sağkalımını da engellemektedir. GH anlatımı artırılmış olan hücre hatlarında doğal tip hücrelere kıyasla sağkalım oranı daha yüksek iken zamana bağlı curcumin uygulaması sonrasında her iki hücre hattında da sağkalımın baskılandığı gösterilmiştir (Şekil 19).

Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında hücre sağkalım sinyal yollarından JAK/STAT, PI3K/Akt, MAPK ve onkogenler üzerine etkisini incelenmiştir. GH'nin GHR'ye bağlanması ile bu sağkalım sinyalleri tetiklenmektedir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde curcuminin meme kanseri hücrelerinde JAK/STAT sinyal yolağını inhibe ettiği görülmüştür [79]. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hattında curcumin, GHR tarafından fosforile edilen JAK2 kinazının anlatımını baskılamakta ve pJAK2 (Tyr1007/1008) düzeyini de indirmektedir. Aşırı GH anlatımına bağlı olarak doğal tip hücre hattına oranla JAK2'nin GHR tarafından fosforilasyonu artış göstermektedir. pJAK2 tarafından fosforile edilen STAT5 molekülünün anlatımı GH+ hücre hattında daha fazla olmakla birlikte pSTAT5 (Tyr694) anlatımı curcumin uygulaması ile doğal tip hücre hattında

azalırken GH+ hücre hattında önemli bir değişim göstermemektedir. Bir diğer kinaz molekülü olan ve özellikle STAT3 fosforilasyonunu gerçekleştiren Src anlatımı curcumin uygulaması ile birlikte azalmaktadır. Ancak STAT3 fosforilasyonu doğal tip hücrelerde baskılanır iken GH+ hücre hattında pJAK2 varlığından ve pSTAT3 (Tyr705) inhibitörü olan SOCS-3 anlatımındaki artıştan kaynaklı değişim göstermediği düşünülmektedir. STAT1 anlatımı curcumin uygulaması ile MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında bir değişim göstermez iken fosforile formu pSTAT1 (Tyr701) inhibitörü olan SOCS-1 anlatımının artışına bağlı olarak özellikle doğal tip hücre hattında baskılanmaktadır (Şekil 20A). MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında GH anlatımının kazandırılması sonucu artan GH/GHR sinyaline bağlı olarak GH+ hücrelerde doğal tip hücre hattına oranla JAK2 anlatımı artış göstermektedir. Curcumin uygulaması sonrası doğal tip hücrelerde JAK2 anlatımı baskılanmaktadır. Ancak curcuminin JAK2'nin aktif formu olan pJAK2 anlatımı üzerindeki değişim gelecek çalışmalarda gösterilmelidir. Diğer bir kinaz molekülü olan Src proteini GH+ hücrelerde daha fazla anlatılmakla birlikte curcumin uygulaması sonrası hem doğal tip hem de GH+ hücre hattında baskılanmaktadır. Curcumin MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında STAT3 anlatımını baskılamaktadır. Src tarafından fosforile olan STAT3 proteini, MDA-MB-231 doğal tip hücrelerde pSTAT3 inhibitörü olan SOCS-3 anlatımındaki azalışa bağlı olarak artış gösterdiği, MDA-MB-231 GH+ hücre hattında pSTAT3 anlatımı ise SOCS-3 anlatımındaki artışa bağlı olarak azaldığı düşünülmektedir (Şekil 20B).

MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin PI3K/Akt sinyal yolağı üzerine etkisine bakıldığında, özellikle MCF-7 GH+ hücre hattında otokrin GH sinyalinin aktivasyonu ile sağkalım ve proliferasyonda görevli pAkt (Ser473) anlatımı da doğal tip hücrelere oranla artış göstermektedir. Curcumin uygulaması ile doğal tip ve GH+ pAkt (Ser473) anlatımı artış göstermektedir. pAkt tarafından fosforile olan pFOXO3 α (Ser318/321) molekülünün fosforile formu sitoplazmada iken fosforile olmayan formu nukleusa göç ederek transkripsiyonel düzeyde hücre döngüsü inhibitörleri olan p21 ve p27 anlatımını arttırarak hücre döngüsünü durdurmaktadır. Ancak MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında curcumin uygulaması ile pFOXO3 α artış göstermektedir (Şekil 21A). MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında ise curcumin pAkt (Ser473) anlatımını baskılamakta ve böylece sağkalım sinyaline ket vurmaktadır (Şekil 21B).

Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında bir diğer hücre sağkalım sinyal yolağı olan MAPK üzerine etkisine bakıldığında ise, hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında otokrin GH sinyalinin aktivasyonu sonucunda doğal tip hücrelere oranla GH+ hücre hatlarında p38, p-p38 (Thr180/Tyr182) ve p-p44/42 (Thr202/Tyr204) anlatımlarında artış saptanmıştır. Curcumin uygulaması ile MCF-7 GH+ hücre hattında özellikle p-p38 anlatımındaki artışın DNA hasarına bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hattında ise p-p44/42 anlatımı curcumin uygulaması ile baskılanarak bir diğer sağkalım yolağına ket vurulduğu görülmüştür (Şekil 22A, 22B).

Otokrin GH/GHR sinyalinin hedef moleküllerinden biri olan onkogenler MCF-7 ve MDA-MB-231 GH+ hücre hatlarında doğal tip hücrelere kıyasla özellikle c-fos, c-jun, c-Raf ve Ras anlatımlarında artış görülmüştür. Ancak curcumin uygulaması ile birlikte hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında yalnızca Ras ve c-Raf anlatımlarının baskılandığı tespit edilmiştir (Şekil 23A, 23B).

Tüm bu hücre proliferasyonu ve sağkalımı ile ilişkili sinyal yollarının hedef molekülleri aynı zamanda hücre mobilitesi, invazyonu ve mastastaz ile ilişkili olup otokrin GH sinyali ile birlikte her iki meme kanseri hücre hattında da bu süreçleri tetiklemektedir. Curcuminin hem doğal tip hem de GH+ hücre hatlarında koloni oluşumu, yara kapanma aktivitesi, invazyon ve metastaz üzerine etkisi incelenmiştir. MCF-7 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin koloni oluşumu üzerine etkisine bakıldığında, GH+ hücrelerde GH sinyalinin aktivasyonu ile koloni oluşumu da tetiklenmiş olup curcumin uygulaması sonrasında her iki hücre hattında da koloni oluşumunun baskılandığı görülmüştür (Şekil 24). MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında bakıldığında ise, GH varlığında koloni oluşumu tetiklenmekte, curcumin uygulaması ile her iki hücre hattında da koloni oluşumu baskılanmaktadır (Şekil 25). Yapılan çalışmalar incelendiğinde curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde koloni oluşumuna ket vurduğu görülmüştür [82]. Curcuminin koloni oluşumu üzerine etkisini daha iyi bir şekilde anlayabilmek adına üç boyutlu ortamda koloni oluşumu irdelenmiştir. Otokrin GH sinyal aktivasyonu ile birlikte hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 GH+ hücre hatlarında doğal tip hücrelere kıyasla koloni çaplarının daha büyük olduğu, curcumin uygulaması ile birlikte hem doğal tip hem de GH+ hücre hatlarında koloni çapının

küçüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 26 ve 27). Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında hücre mobilitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen yara kapanma aktivitesi sonuçlarına bakıldığında, MCF-7 hücre hattında otokrin GH sinyali varlığında hücre mobilitesindeki artışa bağlı olarak yara kapanma oranı da artış göstermiştir. Curcumin uygulaması ile birlikte hem doğal tip hem de GH+ hücre hattında hücre mobilitesi engellenmiş ve yara kapanma oranında azalma görülmüştür (Şekil 28). MDA-MB-231 hücre hattında ise MCF-7 hücre hattına göre ER negatif profile sahip olmasından kaynaklı daha agresif bir fenotip sergilemekte ve bu nedenle hücre mobilitesinin MCF-7 hücre hattına oranda daha fazla olduğu görülmektedir. Otokrin GH sinyali ile yara kapanma aktivitesi arttığı, curcumin uygulaması ile birlikte ise yara kapanma oranlarının azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 29). MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde curcuminin invazyon ve metastaz üzerine etkisine bakıldığında ise, MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında zamana bağlı uygulanan curcuminin invazyon ve metastazı baskıladığı görülmüştür. GH+ hücre hattında ise otokrin GH sinyalinin aktivasyonuna bağlı olarak doğal tip hücre hattına oranla invazyon ve metastaz oranı artış göstermektedir (Şekil 30 ve 31). MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında da zamana bağlı uygulanan curcumin invazyon ve metastaza ket vurmakla birlikte GH anlatımının artışına bağlı olarak oluşan agresif profile ket vurmaktadır (Şekil 32 ve 33).

Curcuminin meme kanserinde invazyon ve metastaz süreçlerinde fonksiyonel rol oynayan MMP proteinleri üzerine etkisi incelendiğinde, otokrin GH sinyali varlığında MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında özellikle MMP-2 ve MMP-9 anlatımında artış görülmüştür. Hem RT-PCR hem de immunoblotlama sonuçlarına bakıldığında, MCF-7 doğal tip hücre hattında mRNA düzeyinde MMP-2 belirlenememiş iken GH+ hücre hattında yüksek düzeyde MMP-2 anlatımı saptanmıştır. Protein düzeyinde bakıldığında ise curcuminin doğal tip ve GH+ hücre hattında MMP-2 anlatımını baskıladığı görülmüştür. MMP-2 inhibitörü olan TIMP-2 anlatımı ise curcumin uygulaması sonrası doğal tip ve GH+ hücre hattında önemli bir değişim göstermemiştir. Anjiyonezde rol alan VEGF α , GH sinyalinin artışına bağlı olarak GH+ hücrelerde doğal tip hücrelere oranla mRNA düzeyi daha fazladır. Ancak curcumin uygulaması sonrası doğal tip hücrelerde artış gösterirken GH+ hücrelerde bir değişim görülmemiştir. MMP-9 anlatımı ise hem mRNA düzeyinde hem de protein düzeyinde doğal tip hücre hattında curcumin birlikte artış gösterirken GH+

hücre hattında mRNA düzeyinde saptanamamış, protein düzeyinde ise MMP-9 inhibitörü olan TIMP-1 anlatımındaki artışa bağlı olarak azalma tespit edilmiştir (Şekil 34A, 34B). MDA-MB-231 GH+ hücre hattında MMP-2 düzeyi otokrin GH sinyaline bağlı olarak artış göstermiştir. Curcumin uygulaması ile doğal tip hücre hattında protein düzeyinde anlatımı azalırken GH+ hücre hattında bir değişim belirlenmemiştir. Bunun yanısıra TIMP-2 anlatımı da curcumine bağlı olarak hem doğal tip hem de GH+ hücre hattında azalmıştır. VEGF α anlatımı mRNA düzeyinde GH+ hücre hattında anlatımı yüksek olup curcumin uygulaması ise baskıladığı görülmüştür. MMP-9 mRNA düzeyinde hem doğal tip hem de GH+ hücre hattında curcumin ile baskılanırken protein düzeyinde önemli derecede bir değişim belirlenmemiştir. TIMP-1 anlatımı da buna bağlı olarak curcumin uygulaması sonrasında doğal tip hücrelerde azalırken GH+ hücre hattında değişim göstermemiştir (Şekil 35A, 35B).

Meme kanseri metastazında EMT süreci önem teşkil etmekle birlikte primer tümör bölgesinde bulunan kanser hücreleri epitel hücre profilini kaybederek mezenkimal hücre profili kazanırlar ve böylece dolaşıma katılarak sekonder tümör bölgesini oluşturabilirler. Bu durumda MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında curcuminin EMT süreci üzerine etkisini incelendiğinde, MCF-7 GH+ hücre hattında otokrin GH sinyal aktivasyonuna bağlı olarak doğal tip hücre hattına oranla mezenkimal hücre belirteçlerinden N-kaderin, Vimentin, Slug ve β -catenin anlatımının yüksek olduğu görülmüştür. Ancak curcumin uygulamasına bağlı olarak hem doğal tip he de GH+ hücre hattında mezenkimal hücre belirteçlerinin anlatımı baskılanmıştır (Şekil 36A). MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında ise GH varlığında mezenkimal hücre belirteçlerinin artış gösterdiği belirlenmiştir. curcumin uygulamasını takiben MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında N-kaderin, Vimentin, Snail ve β -catenin anlatımlarını baskıladı görülmüştür (Şekil 36B).

EMT sürecinde rol oynayan mezenkimal hücre belirteçlerinin transkripsiyon faktörü olan Snail ve Slug, NF- κ B sinyali üzerinden regüle edilmektedir. Bunun yanısıra hücre içi inflamasyon, proliferasyon ve apoptotik süreçler de aynı zamanda NF- κ B sinyal yolağı ile ilişkilidir [83]. Buna bağlı olarak curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında klasik NF- κ B sinyal yolağı üzerine etkisi incelendiğinde, MCF-7 hücre hattında GH varlığına bağlı olarak p-p65 (Ser536) anlatımının doğal tip hücrelere oranla arttığı görülmüştür. Curcumin uygulaması ile MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında NF- κ B p65 anlatımının baskılandığı tespit

edilmiştir. Ancak pIKK α/β (Ser176/180) tarafından fosforilasyonu sağlanan p65 proteininin anlatımı, hem doğal tip hem de GH+ hücre hattında pIKK α/β anlatımındaki artışa bağlı olarak artış göstermektedir. MCF-7 hücre hattında curcumin ile birlikte oluşan DNA hasarı üzerinden p-p38 anlatımındaki artışa bağlı olarak p65 proteinin p-p38 tarafından fosforilasyonunun gerçekleştiği düşünülmektedir [84]. Bununla orantılı olarak p65'in sitoplazmada kalmasını sağlayan IKB α proteininin anlatımı da azalmaktadır (Şekil 37A). MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında ise, curcumin uygulamasına bağlı olarak pIKK α/β anlatımı baskılanmış ve sinyal yukardan kesilmiştir. pIKK α/β tarafından fosforile olan pIKB α (Ser32) proteininin anlatımı da buna bağlı olarak azalmıştır. Hücre içerisinde IKB α proteinine bağlı ve inaktif olarak bulunan NF- κ B p65 proteininin fosforilasyonu pIKK α/β anlatımındaki düşüğe bağlı olarak azalmıştır (Şekil 37B). Bir diğer NF- κ B sinyal yolağı olan alternatif yolak üzerinde curcuminin etkinliği incelendiğinde, MCF-7 hücre hattında yalnızca otokrin GH sinyalinin aktivasyonu ile birlikte NIK, p-NF- κ B p100 ve RelB anlatımında doğal tip hücre hattına oranla artış saptanmıştır. Curcuminin MCF-7 meme kanseri hücre hattında alternatif yolak üzerinde önemli bir değişime neden olmazken, etkisini klasik yolak üzerinden gösterdiği düşünülmektedir (Şekil 38A). MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında ise GH fazla anlatımına bağlı olarak RelB, TRAF2 ve TRAF3 anlatımında doğal tip hücrelere oranla artış görülmüştür. Curcumin uygulamasını takiben her iki hücre hattında da p-NF- κ B p100 anlatımı artış göstermektedir. NF- κ B p100 fosforilasyonu proteozomal degradasyona neden olmakla birlikte p52 alt ünitesinin oluşumu ile sonuçlanır. p52 alt ünitesi ile RelB ile birlikte kompleks oluşturup nukleusa geç ederek transkripsiyonel regülasyonda görev alır. Bu durumda Curcumin MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında RelB düzeyini baskılar iken p52 alt ünitesi oluşumunu desteklemektedir (Şekil 38B).

Curcuminin NF- κ B sinyal yolağı üzerine etkisini tam olarak aydınlatılabilmek adına nukleusta transkripsiyon faktörü olarak rol oynayan p65 ve RelB proteinlerinin nukleusa göçü sitoplazmik ve nuklear protein lizatları kullanılarak incelenmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 GH+ hücre hatlarında p65 ve RelB alt üniteleri normal şartlarda nukleusa geç ederek transkripsiyonel aktivitelerini gerçekleştirmektedirler. Curcumin uygulaması ile birlikte her iki hücre hattında da p-p65 proteininin nukleusa göçü, pozitif kontrol olarak kullanılan ve NF- κ B inhibitörü olan Wedelolacton sonucunda olduğu gibi curcumin uygulaması ile de

engellenmiştir. RelB proteininin nukleusa göçü MCF-7 ve MDA-MB-231 GH+ hücre hatlarında curcumin uygulamasını takiben azalmıştır (Şekil 39A, 39B). Bu durumda curcuminin her iki meme kanseri hücre hattında da NF-κB sinyaline ket vurduğu gösterilmiştir.

NF-κB sinyal yolağının hedef moleküllerinde biri de poliamin metabolizmasında rol oynayan SSAT ve PAO enzimleridir. Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında poliamin düzeyleri ve metabolizmasında görevli enzimlerin anlatımı üzerine etkisi incelendiğinde, MCF-7 doğal tip hücre hattında curcumin uygulaması ile ODC anlatımının azalmasına bağlı olarak put düzeyinin; SSAT ve PAO anlatımındaki artışa bağlı olarak ise spd ve spm düzeylerinin azaldığı görülmüştür. Ayrıca poliamin düzeylerindeki bu azalışın katabolik enzimler tarafından asetile edilen spm ve spd'nin hücre membranında bulunan taşıyıcı proteinler vasıtasıyla dışarıya atılmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. GH+ hücre hattında ise curcumin ile spm düzeyi azalırken put ve spd düzeyinde artış tespit edilmiştir. Bunun nedenin ise katabolik enzimlerin anlatımındaki artış ile spd'nin spm ve put'e dönüştürülmesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Şekil 40A, 40B). MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına bakıldığında, curcumin uygulaması ile hem doğal tip hem de GH+ hücre hattında biyosentezde görevli ODC anlatımının azalması ve katalobizmada görevli SSAT ile PAO anlatımının artışına bağlı olarak poliamin düzeylerinde azalma görülmüştür (Şekil 41A, 41B).

Poliamin metabolizmasında görevli PAO enziminin katalize ettiği reaksiyon sonucunda yan ürün olarak H₂O₂ açığa çıkmaktadır. Reaktif oksijen türü olan H₂O₂ apoptotik hücre ölümünü tetiklemektedir [65]. Bu nedenle curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulaması ile birlikte poliamin katabolik enzimlerindeki artışa bağlı olarak ortaya çıkan ROS miktarı da artış göstermiştir (Şekil 42 ve 43). ROS düzeyinin curcumin tarafından tetiklendiğini desteklemek amacıyla ROS inhibitörü olan NAC kullanılmıştır. MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hattında curcumin uygulaması ile azalan hücre canlılığı, curcumin ve NAC birlikte uygulandığı durumda artış göstermiştir (Şekil 44A). Curcumin uygulaması ile MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında apoptotik hücre ölümünün tetiklenmiş olup curcumin ve NAC birlikte uygulandığında bu etkinin azaldığı görülmüştür (Şekil 44B). MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında da curcumin ile azalan hücre canlılığı curcumin ve NAC uygulaması ile birlikte

artmış (Şekil 45A), yine curcumin ile tetiklenen apoptotik hücre ölümü curcumin ve NAC uygulaması ile birlikte azalmıştır (Şekil 45B). MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında curcumin ile tetiklenen ROS üretimi, curcumin ve NAC uygulaması ile birlikte azalmaktadır (Şekil 46 ve 47). Tüm bu sonuçlar doğrultusunda curcuminin poliamin katabolik enzimlerini arttırarak ROS üretimini tetiklediği ve ROS üretimine bağlı olarak da apoptotik hücre ölümünü indüklediği belirlenmiştir.

Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında hücre döngüsü üzerine etkisi incelendiğinde, MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hattında curcumin uygulaması ile hücre döngüsünün G2/M fazında durduğu görülmüştür (Şekil 48A). Ayrıca hücre siklüsü inhibitörü olan p21 anlatımı curcumin uygulaması ile birlikte artış göstermiştir. G1'den S fazında geçişte rol oynayan Rb proteinin E2F proteini ile interaksiyon halindedir. Rb proteininin Siklin D1 tarafından fosforilasyonu ile E2F proteini serbest kalır ve transkripsiyonel düzeyde S fazına geçişi teşvik etmektedir. MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hattın curcumin uygulamasını takiben siklinD1, Rb proteininin anlatımı ve Rb proteininin fosforilasyonu azalmıştır (Şekil 48B). MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü analizine bakıldığında G1 populasyonu curcumin ile birlikte azalma ve SubG1 populasyonu da artış göstermektedir (Şekil 49A). Curcumin MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücrelerde p21 anlatımını arttırmakla birlikte Rb proteininin anlatımını azalmıştır. Ancak Rb fosforilasyonu yalnızca MDA-MB-231 GH+ hücre hattında baskılanmaktadır (Şekil 49B).

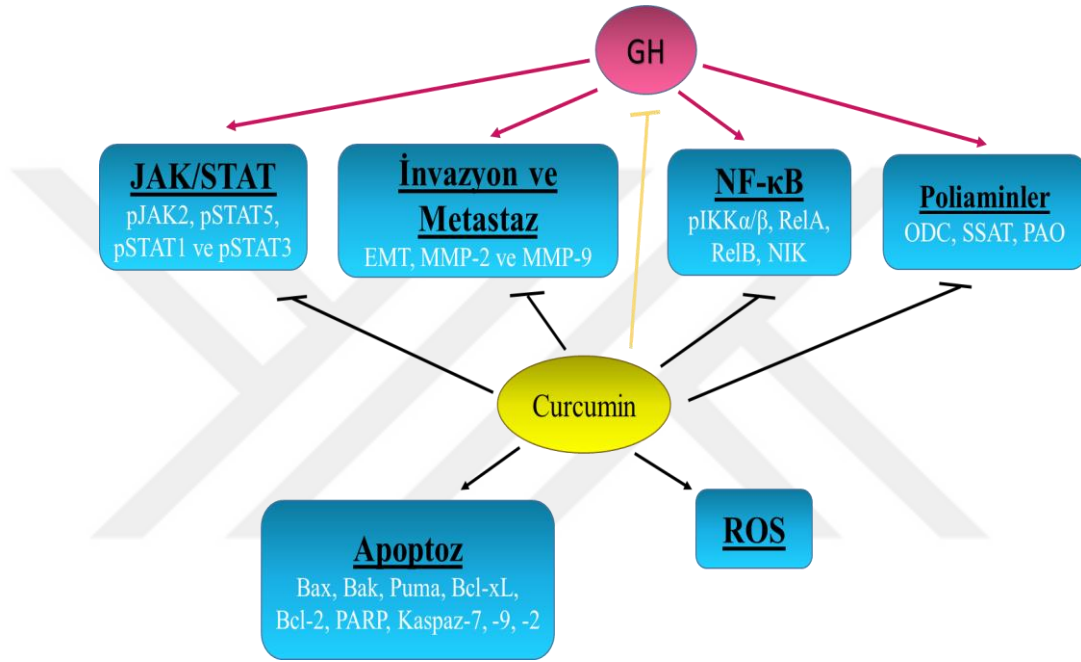
Tüm bu veriler ışığında curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hattında apoptotik hücre ölümü üzerine etkisi incelemek amacıyla floresan mikroskopu vasıtasıyla mitokondri membran potansiyelindeki ($\Delta\psi_m$) değişim, apoptotik ölüme bağlı oluşan DNA kırıkları ve hücre ölümü belirlenmiştir. MCF-7 hücre hattında otokrin GH sinyalinin aktivasyonu ile curcuminin tarafından indüklenen apoptotik hücre ölümüne karşı doğal tip hücrelere oranla bir direnç görülmesine rağmen MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hattında curcumin $\Delta\psi_m$ kaybına ve bunun sonucunda mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salınımına neden olmaktadır [85]. Curcumin MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında apoptotik hücre ölümüne bağlı olarak gerçekleşen DNA fragmentasyonu tetiklemiştir ve ölü hücre populasyonu arttırmıştır (Şekil 50). MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hattında da $\Delta\psi_m$ kaybı, apoptotik hücre ölümüne bağlı oluşan DNA

kırıklarında ve ölü hücre sayısında artış gözlemlenmiştir. Otokrin GH sinyali, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında doğal tip hücrelere kıyasla curcumin ile tetiklenen apoptotik hücre ölümüne karşı direnç oluşumuna neden olduğu görülmüştür (Şekil 51). Curcumin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında apoptotik hücre ölümü üzerine etkisi incelendiğinde, MCF-7 doğal tip hücre hattında %24,3 oranında erken apoptotik hücre popülasyonu mevcut iken GH+ hücre hattında bu oran %1,3 'tür. GH sinyalinin varlığı ile hücrelerin apoptoza karşı direnç oluşturdukları görülmüştür (Şekil 52). MDA-MB-231 doğal tip hücre hattında curcumin uygulaması sonrası erken apoptotik hücre popülasyonu %11,7 oranında iken GH+ hücre hattında bu oranın % 4,7 olduğu görülmüştür (Şekil 53).

Curcumin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında curcuminin apoptotik hücre ölümü üzerine etkilerini açık bir şekilde ortaya koymak adına curcuminin içsel ve dışsal apoptotik yolak üzerine etkileri incelenmiştir. MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hattında curcumin içsel yolda pro-apoptotik proteinler olan Bak, Bax ve Puma anlatımını arttırıp, anti-apoptotik proteinlerde Bcl-xL ve Bcl-2 anlatımını azaltarak apoptozu tetiklemektedir. Özellikle full kaspaz-7 anlatımını azaltarak kaspaz aktivasyonu üzerinden PARP kesilimini indüklemektedir (Şekil 54A). Dışsal yolda ise curcumin kaspaz-2 üzerinden etki etmektedir. Kaspaz-2'nin uzun formu pro-apoptotik, kısa formu ise anti-apoptotik etkinliğe sahiptir. Curcumin uygulamasını takiben MCF-7 doğal tip ve GH+ hücre hattında kaspaz-2'nin kısa formu azalmıştır (Şekil 54B). MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında ise curcumin içsel yolda pro-apoptotik proteinlerden Bax, Bak, Bad ve Puma anlatımını arttırmış, anti-apoptotik proteinlerden ise Bcl-xL ve Bcl-2 anlatımını azalmıştır. Bunun yanısıra full kaspaz-9 ve full kaspaz-7 anlatımını azaltarak kaspaz kaskadını aktive etmiş ve PARP kesilimini tetiklemiştir (Şekil 55A). Curcumin MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında dışsal yolda ise apoptotik sinyalin hücre içerisine iletilmesinde rol oynayan TRADD anlatımını arttırmıştır. Bunun yanısıra kaspaz-2'nin kısa formunun anlatımında azalma görülmüştür (Şekil 55B).

Sonuç olarak bu çalışma kapsamında elde edilen bulgulara göre: curcumin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı, hücre sağkalım sinyallerine ket vurduğu belirlenmiştir. literatürde ilk defa otokrin GH sinyali aktive edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde curcuminin invazyon, metastaz, poliamin metabolizması ve apoptotik hücre ölümü

üzerine etkisi aydınlatılmıştır. Otokrin GH sinyalinin aktivasyonunun meme kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonunu, sağkalımını, invazyon ve metastazı tetiklediği belirlenmiştir. Her iki hücre hattında da farklı sağkalım siyallerine ket vurduğu ve farklı NF-κB sinyali üzerinden etki gösterdiği tespit edilmiştir. Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında poliamin katabolik enzimlerini arttırdığı, bunun sonucunda oluşan ROS üretimini tetiklediği ve ROS'a bağımlı apoptotik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir (Şekil 56).



Şekil 58. Curcuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre sağkalım yolları, invazyon, metastaz, poliamin metabolizması, apoptoz ve ROS üretimi üzerine etkisi.

Elde edilen tüm bu bilgiler curcumin ile ilgili mevcut olan literatürü doğruladığı gibi gelecekte yapılacak olan çalışmalar için otokrin GH sinyali aktive olan meme kanserinde curcuminin anti-hormonal ve terapötik etkinliği açısından temel oluşturma niteliği taşımaktadır.

REFERANSLAR

1. Ozmen, V., *Breast Cancer in the World and Turkey*. JOURNAL OF BREAST HEALTH, 2008.
2. Lux M. P., F.P.A.a.B.M.W., *Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives*. Springer-Verlag, 2006. **84**: p. 16–28.
3. Zatelli M. C., M.M., Mole D., Cason V., Tagliati F., Margutti A., Bondanelli M., Ambrosio M. R., and Uberti E. D., *Growth Hormone Excess Promotes Breast Cancer Chemoresistance*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**((10)): p. 3931–3938.
4. Lv Z., L.X., Zhao W., Dong Q., Li F., Wang H., Kong B., *Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**((6)): p. 2818-2824.
5. Miller M., C.S., Woodliff J., and Kansra S., *Curcumin (Diferuloylmethane) Inhibits Cell Proliferation, Induces Apoptosis, and Decreases Hormone Levels and Secretion in Pituitary Tumor Cells*. Endocrinology, 2007. **149**((8)): p. 4158–4167.
6. H., W.K.R., *Jak2/Stat5 Signaling in Mammogenesis, Breast Cancer Initiation and Progression*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2008. **13**: p. 93–103.
7. Cosse J., R.M., Ninane N., Raes M. J., and Michiels C., *Hypoxia-induced decrease in p53 protein level and increase in c-jun DNA binding activity results in cancer cell resistance to etoposide*. Neoplasia, 2009. **11**((11)): p. 976–986.
8. Gil, E.M.C., *Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer*. Cancer Treatment Reviews, 2014
9. Dolcet X., L.D., Pallares J., Matias-Guiu X., *NF- κ B in development and progression of human cancer*. Virchows Arch, 2005. **446**: p. 475–482.
10. Lamouille S., X.J.a.D.R., *Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition*. NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY, 2014. **15**: p. 178-196.
11. Singer C. F., K.N., Marton E., Kubista M., Cullen K. J., Hirtenlehner K., Seifert M., and Kubista E., *MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions*. Breast Cancer Research and Treatment, 2002. **72**: p. 69–77.
12. J., T.T.a.T.T., *Polyamine metabolism and cancer*. J.Cell.Mol.Med., 2003. **7**((2)): p. 113-126.
13. Singh D. V., A.S., Singh P., Godbole M. M., Misra K., *Curcumin Conjugates Induce Apoptosis Via a Mitochondrion Dependent Pathway in MCF-7 and MDA-MB-231 Cell Lines*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**((10)): p. 5797-5804.
14. Sudhakar, A., *History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods*. J Cancer Sci Ther, 2009. **1**((2)).
15. Irwin M. L., S.A.W., Tiernan A. M., Ballard-Barbash R., Cronin K., Gilliland F. D., Baumgartner R. N., Baumgartner K. B., and Bernstein L., *Influence of*

- Pre- and Postdiagnosis Physical Activity on Mortality in Breast Cancer Survivors: The Health, Eating, Activity, and Lifestyle Study.* JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, 2008. **26**: p. 3958-3964.
16. SANT M., C.R., VERDECCHIA A., ESTEVE J., GATTA G., MICHELI A., COLEMAN M. P., BERRIN F. and THE EUROCAREWORKING GROUP, *SURVIVAL OF WOMEN WITH BREAST CANCER IN EUROPE: VARIATION WITH AGE, YEAR OF DIAGNOSIS AND COUNTRY.* Int. J. Cancer, 1998. **77**: p. 679–683.
 17. Thijssen, J.H.H., *On the possible role of mammary-derived growth hormone in human breast cancer.* Maturitas, 2009. **655**: p. S13–S16.
 18. Buckley E.S., W.F., Hiller J.E., Roder D.M., Farshid G., *A systematic review of surgical biopsy for LCIS found at core needle biopsy e Do we have the answer yet?* EJSO, 2014. **40**: p. 168-175.
 19. V., H.D.L.a.S., *Choosing the right cell line for breast cancer research.* Holliday and Speirs Breast Cancer Research, 2011. **13**((215)).
 20. *Cancer Facts & Figures 2016.* American Cancer Society 2016. .
 21. Nelson H. D., Z.B., Cantor A., Fu R, Griffin J., O’Meara E. S., Buist D. S. M., Kerlikowske K., Ravesteyn N. T., Trentham-Dietz A., Mandelblatt J. S., and Miglioretti D. L., *Risk Factors for Breast Cancer for Women Aged 40 to 49 Years.* Ann Intern Med, 2012. **156**: p. 635-648.
 22. Key T. J., V.P.K., and Banks E., *Epidemiology of breast cancer.* THE LANCET Oncology, 2001. **2**: p. 133-140.
 23. MacMahon B., C.P., and Brown J., *Etiology of Human Breast Cancer: A Review.* JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1973. **50**
 24. PHAROAH P. D. P., D.N.E., DUFFY S., EASTON D. F. and PONDER B. A. J., *FAMILY HISTORY AND THE RISK OF BREAST CANCER: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS.* Int. J. Cancer, 1997. **71**: p. 800–809.
 25. Ford D., E.D.F., Stratton M., Narod S., Goldgar D., Devilee P., Bishop D. T., Weber B., Lenoir G., Chang-Claude J., Sobol H., Teare M. D., Struewing J., Arason A., Scherneck S., Peto J., Rebbeck T. R., Tonin P., Neuhausen S., Barkardottir R., Eyfjord J., Lynch H., Ponder B. A. J., Gayther S. A., Birch J. M., Lindblom A., Stoppa-Lyonnet D., Bignon Y., Borg A., Hamann U., Haites N., Scott R. J., Maugard C. M., Vasen H., Seitz S., Cannon-Albright L. A., Schofield A., Zelada-Hedman M., and the Breast Cancer Linkage Consortium, *Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families.* Am. J. Hum. Genet, 1998. **62**: p. 676–689.
 26. A.L.M., B.M.J.M.a.V., *Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors.* Radiological Diagnosis of Breast Diseases, 2000.
 27. N., S.R.C.A.D.B., *Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent.* J. Pharm. Pharmac, 1973. **25**: p. 447-452.
 28. CHEN E. Y., L.Y., SMITH D. H., BARRERA-SALDAKJA H. A., GELINAS R. E., AND SEEBURG P. H., *The Human Growth Hormone Locus: Nucleotide Sequence, Biology, and Evolution.* GENOMICS, 1989. **4**: p. 479~497.
 29. Mangalam H. J., A.V.R., Ingraham H. A., Kapiloff M., Wilson L., Nelson C., Elsholtz H., and Rosenfeld M. G., *A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally.* GENES & DEVELOPMENT, 1989. **3**: p. 946-958.

30. M., K.J.J.a.A.J., *Growth Hormone (GH), GH Receptor, and Signal Transduction*. Molecular Genetics and Metabolism, 2000. **71**: p. 293–314.
31. L., W.M.J.a.C.-C.B., *The oncogenic potential of autocrine human growth hormone in breast cancer*. PNAS, 2004. **101**((42)): p. 14992–14993.
32. Gebre-Medhin M., K.L., Wennbo H., To J. M. Kindblom, *Growth Hormone Receptor Is Expressed in Human Breast Cancer*. American Journal of Pathology, 2001. **158**: p. 1217-1222.
33. Minoia M., G.E., Mole D., Rossi M., Filieri C., Tagliati F., Baroni A., Ambrosio M. R., Uberti E. D., and Zatelli M. C., *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**: p. E907–E916.
34. HORTOBAGYI G. N., A.F.C., BUZDAR A. U., KAU S. W., McNEESE M. D., PAULUS D., HUG W., HOLMES F. A., ROMSDAHL M. M., FRASCHINI G., MCBRIDE C. M., MARTIN R. G., AND MONTAGUE E., *Management of Stage Ill Primary Breast Cancer With Primary Chemotherapy, Surgery, and Radiation Therapy*. Cancer 1988. **62**: p. 2507-2516,.
35. Carmichael A., S.A.S., and Dixon J. M., *Breast cancer risk among the survivors of atomic bomb and patients exposed to therapeutic ionising radiation*. EJSO, 2003. **29**: p. 475–479.
36. Skliris G. P., L.E., Watson P. H., Murphya L. C., *Estrogen receptor alpha negative breast cancer patients: Estrogen receptor beta as a therapeutic target*. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 2008. **109**: p. 1–10.
37. Palmieri C., P.D.K., Januszewski A., Zucchini G., Howell S. J., *Breast cancer: Current and future endocrine therapies*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2014. **382**: p. 695–723.
38. Shanmugam M. K., R.G., Kanchi M. M., Arfuso F., Chinnathambi A., Zayed M. E., Alharbi S. A., Tan B. K. H., Kumar A. P. and Sethi G., *The Multifaceted Role of Curcumin in Cancer Prevention and Treatment*. Molecules, 2015. **20**: p. 2728-2769.
39. Choudhuria T., P.S., Agwarwalb M. L., Dasa T., Saa G., *Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction*. FEBS Letters, 2002. **512**: p. 334^340.
40. Somasundaram S., E.N.A., Moore D. T., Small G. W., Shi Y. Y., and Orłowski R. Z. , *Dietary Curcumin Inhibits Chemotherapy-induced Apoptosis in Models of Human Breast Cancer*. CANCER RESEARCH, 2002. **62**: p. 3868–3875.
41. Nagaraju J. P., A.S., Zafar S. F., Basha R., Diazd R. and El-Rayes B. F. , *The impact of curcumin on breast cancer*. Cite this: Integr. Biol, 2012. **4**: p. 996–1007.
42. Liu D., C.Z., *The Effect of Curcumin on Breast Cancer Cells*. J Breast Cancer, 2013. **16**((2)): p. 133-137.
43. Miller M., C.S., Woodliff J., and Kansra S., *Curcumin (Diferuloylmethane) Inhibits Cell Proliferation, Induces Apoptosis, and Decreases Hormone Levels and Secretion in Pituitary Tumor Cells*. Endocrinology, 2008. **149**(8): p. 4158–4167.

44. RuiS H., K.R.A., and Farrar W. L., *Activation of Receptor-associated Tyrosine Kinase JAK2 by Prolactin*. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1994. **269**: p. 5364-5368.
45. Herrington J., S.L.S., Schwartz J. and Carter-Su C., *The role of STAT proteins in growth hormone signaling*. Oncogene, 2000. **19**: p. 2585 ± 2597.
46. Yoshimura A., N.T.a.K.M., *SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation*. NATURE REVIEWS | IMMUNOLOGY, 2007. **7**: p. 454-465.
47. Åberg N. D., Brywe K. G., and a.I. J., *Aspects of Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I Related to Neuroprotection, Regeneration, and Functional Plasticity in the Adult Brain*. The Scientific World JOURNAL, 2006. **6**: p. 53–80.
48. Ahmed T., Y.G., Shumate M., Lang C. H., Rotwein P. and CooneyR. N., *Tumor necrosis factor inhibits growth hormone-mediated gene expression in hepatocytes*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **291**: p. G35-G44.
49. Cesen T. I., C.T.X., Piwien-Pilipuk G., Kaplani J., Calinescu A., Huo J. S., Iniguez-Lluhi J. A., Kwok R., Schwartz J., *Multiple mechanisms of growth hormone-regulated gene transcription*. Molecular Genetics and Metabolism, 2007. **90**: p. 126–133.
50. Bartsch J. E. and S.E.D.a.A.H. E., *Matrix Metalloproteinase Expression in Breast Cancer*. Journal of Surgical Research, 2003. **110**: p. 383-392.
51. Duffy M. J., M.T.M., Hill A., McDermott E. and O’Higgins N., *Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis*. Breast Cancer Res, 2000. **2**: p. 252-257.
52. C., R.D., *Epithelial-mesenchymal transition*. Journal of Cell Science, 2005. **118**(9): p. 4325-4326.
53. Huber M A., A.N., Baumann B., Grünert S., Sommer A., Pehamberger H., Kraut N., Beug H., and Wirth T., *NF-κB is essential for epithelialmesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression*. The Journal of Clinical Investigation, 2004. **114**: p. 569-581.
54. Kalluri R., a.W.R.A., *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J. Clin. Invest., 2009. **119**: p. 1420–1428.
55. Kokkinos M. I., W.R., Wong M. K., Newgreen D. F., Thompson E. W., Waltham M., *Vimentin and Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer – Observations in vitro and in vivo*. Cells Tissues Organs, 2007. **185**: p. 191–203.
56. Sun, S.-C., *Non-canonical NF-κB signaling pathway*. Cell Research, 2011. **21**: p. 71-85.
57. Cogswell P. C., G.D.C., Funkhouser W. K., and Baldwin A. S. , *Selective activation of NF-κB subunits in human breast cancer: potential roles for NF-κB2/p52 and for Bcl-3*. Oncogene, 2000. **19**: p. 1123 ± 1131.
58. Lin Y., B.L., Chen W. & Xu S., *The NF-κB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy*. Expert Opin. Ther. Targets, 2010. **14**(1): p. 45-55.
59. Viatour P., M.M., Bours V. and Chariot A., *Phosphorylation of NF-κB and IκB proteins: implications in cancer and inflammation*. TRENDS in Biochemical Sciences, 2005. **30**((1)): p. 43-52.
60. Amendola R, C.M., Fratini E, Polticelli F, Sallustio DE, Mariottini P, *Spermine metabolism and anticancer therapy*. Curr Cancer Drug Targets, 2009. **9**: p. 118–130.

61. Manni A, B.B., Luk G, Wright C, Caplan R, Rockette H, Bartholomew M, Ahmed SR, *Role of polyamines in the growth of hormone-responsive experimental breast cancer In vivo*. Breast Cancer Res Treat, 1988. **11**: p. 231–240.
62. Rea G, B.A., Cervelli M, *Question: what is the biological function of the polyamines?* IUBMB Life, 2004. **56**: p. IUBMB Life.
63. Zhu Q, J.L., Casero RA Jr, Davidson NE, Huang Y, *Role of ornithine decarboxylase in regulation of estrogen receptor alpha expression and growth in human breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat, 2012 **136**: p. 57–66.
64. HM, W., *The physiological role of the polyamines*. Eur J Clin Invest, 2000. **30**(1-3).
65. Cervelli M., P.S., Signore F., Amendola R., Mariottini P., *Polyamines metabolism and breast cancer: state of the art and perspectives*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **148**: p. 233-248.
66. Norbury CJ, H., *Cellular responses to DNA damage*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. PubMed, 2001. **41**: p. 367–401.
67. JJ., C., *Programmed cell death in the immune system*. Adv Immunol, 1991. **50**: p. 55-85.
68. Elmore, S., *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**((4)): p. 495-516.
69. Rai NK, T.K., Sharma D, Shukla VK., *Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing*. Int J Low Extrem Wounds, 2005. **4**: p. 138–44.
70. Ferlay J., S.H., Bray F., Forman D., Mathers C. and Parkin D. M., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. International Journal of Cancer, 2010. **127**: p. 2893–2917.
71. Brenner D. R., B.N.T., Kotsopoulos J., Cotterchio M., Boucher B. A., Courneya K. S., Knight J. A., Olivotto I. A., Quan M. L., Friedenreich C. M., *Breast cancer survival among young women: a review of the role of modifiable lifestyle factors*. Cancer Causes Control, 2016. **27**: p. 459–472.
72. Swanson, S.M., and Unterman, T.G., *The growth hormone-deficient Spontaneous Dwarf rat is resistant to chemically induced mammary carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2002. **23**: p. 977–982.
73. N., M.N.a.J.J.O., *Effects of Growth Hormone on Glucose, Lipid, and Protein Metabolism in Human Subjects*. Endocrine Reviews, 2009. **30**(2): p. 152–177.
74. De Stavola B. L., d.S.S.I, McCormack V., Hardy R. J., Kuh D. J., and Wadsworth M. E. J., *Childhood Growth and Breast Cancer*. American Journal of Epidemiology, 2004. **159**.
75. Jenkins, P.J., *Acromegaly and cancer*. Horm. Res., 2004. **62**: p. 108–115.
76. Chiesa J., F.C., Arnould C., Vouyovitch M., Diaz J., Gonzalez S., Mares P., Morel G., Wu Z., Zhu T., Lobie P. E., and Mertani H. E., *Autocrine Proliferative Effects of hGH Are Maintained in Primary Cultures of Human Mammary Carcinoma Cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(9): p. E1418–E1426.
77. Mukhina S., M.H.C., Guo K., Lee K., Gluckman P. D., and Lobie P. E., *Phenotypic conversion of human mammary carcinoma cells by autocrine human growth hormone*. PNAS, 2004. **101**: p. 15166–15171.
78. BANGE J., Z.E.U.A., *Molecular targets for breast cancer therapy and prevention*. NATURE MEDICINE, 2001. **7**: p. 548-552.

79. Duvoix A., B.R., Delhalle S., Schneckenger M., Morceau F., Henry E., Dicato M., Diederich M., *Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin*. Cancer Letters, 2005. **223**: p. 181-190.
80. CHIU T., a.S.C., *Curcumin inhibits proliferation and migration by increasing the Bax to Bcl-2 ratio and decreasing NF- κ Bp65 expression in breast cancer MDA-MB-231 cells*. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, 2009. **23**: p. 469-475.
81. Lai H., C.S., Kuo S., Tseng L., Lin H., ChiC. and Chen D., *The Potential Utility of Curcumin in the Treatment of HER-2-Overexpressed Breast Cancer: An In Vitro and In Vivo Comparison Study with Herceptin*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012.
82. Patel P. B., Thakkar V. R. and Patel J. S., *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.225-234.
83. Kumar P. A., Chitra P. S., Lu C., Sobhanaditya J., Menon R., *Growth hormone (GH) differentially regulates NF-kB activity in preadipocytes and macrophages: implications for GH's role in adipose tissue homeostasis in obesity*. J Physiol Biochem, 2014.**70**: p.433-440.
84. Olson C. M., Hedrick M. N. , Izadi H., Bates T. C., Olivera E. R., and Anguita J., *p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Controls NF- κ B Transcriptional Activation and Tumor Necrosis Factor Alpha Production through RelA Phosphorylation Mediated by Mitogen- and Stress-Activated Protein Kinase 1 in Response to Borrelia burgdorferi Antigens*. INFECTION AND IMMUNITY, 2007 : p.270-277.
85. Dong Z., Liu X., Zhao W., Dong O., Li F., Wang H., Kong B., *Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo*. Int J Clin Exp Pathol, 2014 **7**(6). P: 2818-2824.

EKLER

Tablo 5. 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
Florasan Mikroskobu	Model: 1X71	Olympus
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer, U725 innova	New Brunswick Scientific
Elektroforez Aletleri		BioRad
Facs Flow Cihazı	AC6531180147	BD ACURI C6

HPLC Cihazı	120 Infinity Series	Afilent Technologies
-------------	---------------------	----------------------

Tablo 6. 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 7. 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-merkptoetanol	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 GH 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 8. %12'lik SDS-PAGE Jel içeriği

	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



Merve ÇELİK

Tel: +90 212 644 05 64

+90 506 403 20 06

E-posta: merve.celik1992@gmail.com

Adres: Türkoba Mahallesi Eski Çatalca Yolu Caddesi No:62 D:24
Büyükkemece / İstanbul

Doğum Tarihi : 28.09.1992

Doğum Yeri : İstanbul

Uyruğu : T.C.

Eğitim Bilgileri :

- | | |
|-----------|--|
| 2014-2016 | <u>T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi</u>
Moleküler Biyoloji ve Genetik (Yüksek Lisans) |
| 2010-2014 | <u>T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi</u>
Moleküler Biyoloji ve Genetik (Lisans) |
| 2006-2010 | <u>Bahçelievler Lisesi(İstanbul)</u>
Ortaöğrenim |
| 1999-2006 | <u>Mevlana İlköğretim Okulu(İstanbul)</u>
İlköğrenim |
| 1998-1999 | <u>Fikret Yüzatlı İlköğretim Okulu(İstanbul)</u>
İlköğrenim |

Projeler :

2014-2016

Yüksek Lisans Dönemi T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, **Tübitak 1001 Projesi (Bursiyer) ve Bitirme Projesi**, Curcumin'in terapotik etkinliğinin otokrin büyüme hormonu sinyal yolağı aracılığı ile farklı meme kanseri hücrelerinde poliamin metabolizması irdelenerek incelenmesi

2013 - 2014 Lisans Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, **Bitirme Projesi**, Katepsin K geni fazla anlatımı sağlanan östrojen reseptörü pozitif ve negatif meme kanseri hücrelerine uygulanan curcuminin hücre ölümü ve invazyonu üzerine etkisinin incelenmesi

2012 – 2013 Lisans Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı, **Öğrenci Projesi**, Meme kanseri hücrelerinde epibrassinolidle tetiklenen hücre ölümünde Bcl-2 'nin rolü

Staj Deneyimi :

Haziran 2013 - Ağustos 2013 University of Amsterdam, Academic Medical Center, Oncogenomics Department of Prof. Dr. R. Versteeg (Yaz – Dönemi Stajı)

Eylül 2011 - Devam T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı Doç. Dr. Damla Arısan (Öğrenci Asistanı)

Katılan Kurslar :

16 - 25 Ocak 2014 T. C. Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi (YÜDETAM), XII. Deneysel Hayvanı Kullanım Sertifikası Eğitim Kursu

Sertifikalar :

18 Aralık 2015 Kök Hücre Temelli Tedavilerde Güncel Yaklaşımlar Çalıştayı, T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi

2015 Abcam Seminar: "Introduction and optimization of Chip" and "optimization of ELISA", Bilim Üniversitesi

20 - 21 Aralık 2013 Nanoteknoloji ve Doku Mühendisliği: Güncel Sorunlar ve Gelecek Öngörüler, T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi

10 -12 Mayıs 2013 I. Uluslararası GEN-AREL Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, T. C. İstanbul Arel Üniversitesi

16 - 18 Nisan 2013 Oksidatif Stres, DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklarla İlişkileri, T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

23 – 24 Mart 2013 Moleküler Biyoloji ve Genetik Haftasonu VIII Sempozyumu, Boğaziçi Üniversitesi

2 – 7 Eylül 2012 Uluslararası Poliamin Kongresi, T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi

24 – 26 Şubat 2012 Uluslararası Katılımlı 9. İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kış Okulu, İstanbul Üniversitesi

4 – 6 Mart 2011 Uluslararası Katılımlı 8. İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kış Okulu, İstanbul Üniversitesi

9 – 10 Nisan 2011 Moleküler Biyoloji ve Genetik Haftasonu VI Kongresi, Boğaziçi Üniversitesi

Poster Sunumu :

04-07 Temmuz 2015 Merve Çelik, Ajda Çoker Gürkan, Elif Damla Arısan, Pınar Obakan, Narçın Palavan Ünsal, "Curcumin induced-apoptotic cell death in GH overexpressed MDA-MB-231 breast cancer in time dependent

manner”, 40th FEBS Congress The Biochemical Basis of Life, Berlin

14– 15 Haziran 2012

Y. Akkoç, M. Celik, P. Obakan, A. C. Gurkan, E. D. Arisan, N. P. Unsal, “The functional role of Bcl-2 in the regulation of Curcumin induced autophagic/apoptotic cell death in MCF-7 breast cancer cells”, Apoptosis and Cancer, Cambridge, England

Laboratuvar Deneyimi :

- Laboratuvar malzemelerinin sterilizasyonu
 - Otoklav
 - Kuru sterilizasyon
- Elektroforez
 - Nükleik asitlerin dikey ve yatay elektroforezde ayrışımı
 - Sodyum dodesil sülfat – poliakrilamid jel elektroforezi
 - Native jel elektroforezi
 - Denatüre edici gradient jel elektroforezi (Mutasyon analizi)
- İmmunoblotlama
- Protein tayin yöntemleri
 - Bradford
 - Lowry
- Hayvan Doku Kültürü
 - Memeli hücre kültüründe hücre canlılığı ve sağ kalım analizi
 - FACS flow
- Bitki Doku Kültürü
 - Doku sterilizasyon teknikleri
 - Afrika menekşesi explant kültür, mikroçoğaltım
- HPLC ile poliamin analizi (Benzilasyon)
- Mikroskop Kullanımı
 - Işık mikroskobu
 - Floresan mikroskobu
 - Diseksiyon mikroskobu
- PCR Uygulamaları
 - RT – PCR
 - qRT – PCR
 - Long PCR
- Deneysel Hayvanları Kullanımı
 - Enjeksiyon teknikleri
 - Anestezi ve ötenazi teknikleri
 - Kan ve örnek alma teknikleri
 - İlaç uygulama teknikleri
- Mikrobiyoloji
 - Bakterilerde boyama teknikleri
 - Bakterilerin fizyolojik karakter özelliklerinin belirlenmesi

- Mikroorganizmaların sayım teknikleri
- Spektrofotometrik bakteri miktarı tayini

Ödüller :

2011 - 2012 Eğitim Dönemi	T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Onur Belgesi
2008	Bahçelievler Belediyesi Okullararası Genç Kızlar Voleybol Birinciliği , Kültür ve Spor Ligi, Bahçelievler Lisesi
2008	Bahçelievler Belediyesi Okullararası Genç Kızlar Masa Tenisi Üçüncülüğü , Kültür ve Spor Ligi, Bahçelievler Lisesi
2007	Bahçelievler Belediyesi Okullararası Genç Kızlar Voleybol Birinciliği , Kültür ve Spor Ligi, Bahçelievler Lisesi
2007	Bahçelievler Belediyesi Okullararası Genç Kızlar Masa Tenisi Üçüncülüğü , Kültür ve Spor Ligi, Bahçelievler Lisesi

Yabancı Dil(ler) :

- **İngilizce**
Seviye: Orta

Kullanılan Bilgisayar Programları :

- Microsoft Office
- PyMOL
- Workbench

İlgi Alanları :

- Kök Hücre Biyolojisi, Moleküler Kanser Biyolojisi, Doku Mühendisliği, Nörodejeneratif Hastalıklar ve Moleküler Evrim

Yapılan Ödevler :

2011 – 2012 Bahar Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,

Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı Dersi

- Kekik Bitkisinin Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması

2012 – 2013 Bahar Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, **Bitki**

Doku Kültürü Dersi

- Otoklav ve Fırın Sterilizasyonu

- Farklı Doku Sterilizasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması
 - Afrika Menekşesinde Mikroçoğaltım
 - Soya Tohumlarının Çimlendirilmesi; Soyadan Kallus ve Sürgün Eldesi
 - Karnabahar Btikisinde Sürgün Oluşumu
 -
- 2012 – 2013 Bahar Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, **Moleküler Biyoloji Teknikleri Dersi**
- PCR Çeşitleri ve Primer Dizaynı
- 2013 – 2014 Güz Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, **Hücre Moleküler Biyolojisi Dersi**
- Machinery Regulating Vesicle Traffic, a Major Transport System in our cells
- 2013 – 2014 Güz Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, **Moleküler Kanser Biyolojisi Dersi**
- Pankreas Kanserinde Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörünün Rolü

Yapılan Sunumlar :

- 2011 – 2012 Bahar Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, **Moleküler Mikrobiyoloji Dersi**
- Bakterilerin Fizyolojik Karakter Özellikleri
 - Mikroorganizmaların Sayım Teknikleri
 - Bakterilerin Fiziksel Kontrol Koşulları
- 2012 – 2013 Bahar Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, **Bitki Hormonları Dersi**

- Brassinosteroidler

2013 – 2014 Güz Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,

Araştırma Projesi Dersi

- Katepsin K geni overekspre edilen östrojen reseptörü pozitif ve negatif meme kanseri hücrelerine uygulanan Curcuminin hücre ölümü ve invazyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi

2013 – 2014 Güz Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,

Moleküler Kanser Biyolojisi Dersi

- Pankreas Kanseri

Hobiler :

- Voleybol, masatenisi, yüzme, bilardo, bowling, kitap okumak, film izlemek, örgü örmek, farklı ülkeleri gezmek,