



**T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**MDA-MB-231 ve MCF-7 İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE  
SOYLARINDA ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRESİNİN ANTI-KANSER  
İLAÇLARLA KOMBİNASYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Şeniz KORKMAZ**

**UZMANLIK TEZİ**

**BURSA - 2012**



**T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**MDA-MB-231 ve MCF-7 İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE  
SOYLARINDA ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRESİNİN ANTI-KANSER  
İLAÇLARLA KOMBİNASYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Şeniz KORKMAZ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışmanı: Prof. Dr. Engin ULUKAYA**

**BURSA - 2012**

## İÇİNDEKİLER

Türkçe Özet	.....	ii
İngilizce Özet	.....	iv
Giriş	.....	1
Meme Kanseri	.....	1
Apoptozis	.....	12
Zeytin Yaprağı Ekstresi	.....	26
Gereç ve Yöntem	.....	29
Bulgular	.....	45
Tartışma ve Sonuç	.....	61
Kaynaklar	.....	67
Ekler	.....	79
Teşekkür	.....	80
Özgeçmiş	.....	81

## ÖZET

Meme kanseri kadınlarda en çok görülen kanser olmakla birlikte birçok ülkede kanserden ölümlerin başlıca nedenidir. Bu nedenle erken tanı ve etkin tedavisi çok önemli hale gelmiştir.

Epidemiyolojik çalışmalar ve hayvan deneyleri bazı besinsel bileşiklerin çeşitli kanserlerin insidans hızlarında rol oynadığını ortaya çıkarmıştır. Zeytin yaprağı ekstresinin ve fenolik bileşenlerinden biri olan oleuropeinin anti-kanser etkisi birçok çalışmada gösterilmiştir. Mevcut literatürlerde zeytin yaprağı ekstresinin diğer ilaçlarla kombinasyon çalışmasına rastlanmamıştır.

Bu çalışmada MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre soylarında, zeytin yaprağı ekstresini tedavide kullanılan ajanların değişik dozları ile kombine ederek, düşük tedavi dozlarının etkinliğinin artırılıp arttırılmadığı araştırıldı. Böylece meme kanserinde yeni tedavi yaklaşımlarının araştırılması planlandı. Bu nedenle meme kanseri tedavisinde kullanılan epirubisin, doksorubisin ve dosetaksol ilaçları seçildi. Zeytin yaprağı ekstresi hem tek başına hem de bu ilaçlarla kombine edilerek kullanıldı.

Çalışmamızda zeytin yaprağı ekstresinin, MDA-MB-231 hücre soyunda ilaçların sitotoksik etkilerini arttırdığı saptandı. MCF-7 hücre soyunda ise, MDA-MB-231 hücrelerindeki etkinin tersine, epirubisin ve doksorubisin ile kombinasyonlarında bu ilaçların sitotoksik etkisini azalttığı bulundu. Western blotting ile bakılan kırılmış PARP proteininin MCF-7 hücre soyunda dosetaksol ve epirubisinin tek başına ve zeytin yaprağı ekstresi ile kombinasyonlarında kırıldığı dolayısıyla ölümün apoptozisten kaynaklandığı, MDA-MB-231 hücre soyunda ise PARP kırılması olmadığı bulundu. RT-PCR ile gen ekspresyon düzeylerine bakıldığında MDA-MB-231 hücrelerinde zeytin yaprağı ekstresi apoptozis ile ilişkili genlerde artışa neden oldu. MCF-7 hücrelerinde epirubisin ile artan apoptozis ile

ilişkili genlerin, epirubisin ile zeytin yaprağı ekstresinin kombine edilmesi halinde azaldığı görüldü. Bu azalma zeytin yaprağı ekstresinin MCF-7 hücrelerinde sitotoksisiteyi azaltıcı etkisi ile uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak bu bulgulara dayanarak, zeytin yaprağı ekstresinin anti-kanser ilaçlarla kombine edildiğinde hücrenin fenotipine bağlı olarak ilaçların etkisini değiştirebileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Zeytin yaprağı ekstresi, meme kanseri, apoptozis

## SUMMARY

### **Investigation of Olive Leaf Extract in Combination with Anti-cancer Drugs in MDA-MB-231 and MCF-7 Human Breast Cancer Cell Lines**

Breast cancer is the most common cancer in women and the primary reason of deaths from cancer in most countries. Therefore, early diagnosis and effective therapy has become very important.

Epidemiologic studies and animal experiments have shown that some nutritional compounds play a role in incidence rates of various cancers. The anti-cancer effect of olive leaf extract and oleuropein, one of the phenolic compounds in the extract, were demonstrated in many studies. There were no combination studies of olive leaf extract with other drugs in current literature.

In this study, olive leaf extract is used in combination with different doses of agents that are currently used in the treatment of breast cancer in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cell lines and it is investigated whether their combination increases the effectiveness of low treatment doses. Thus, investigation of new approaches in breast cancer treatment is planned. For this reason, the drugs that are used in breast cancer therapy, epirubicin, doxorubicin and docetaxel, are chosen.

In our study, it was found that olive leaf extract increases the cytotoxic effect of the drugs in MDA-MB-231 cell line. In contrast, it was found that combinations with epirubicin and doxorubicin decreases the cytotoxic effect on MCF-7 cell line. Detection of PARP cleavage by western blotting in MCF-7 cell line treated with epirubicin and docetaxel alone and their combination with olive leaf extract shows that these cells undergo apoptosis while PARP cleavage was not detected in MDA-MB-231 cell line. Olive leaf extract caused an increase in expression levels of apoptosis related genes in MDA-MB-231 cell line by using RT-PCR. In

MCF-7 cell line, it was found that the expression levels of apoptosis related genes increase in epirubicin treatment and decrease in epirubicin and olive leaf extract combination treatment. This decrease was in accordance with the cytotoxicity reducing effect of olive leaf extract in MCF-7 cell line.

As a result, it was concluded that when used in combination with anti-cancer agents, olive leaf extract can change the effectiveness of these drugs depending on cell phenotype.

**Keywords:** Olive leaf extract, breast cancer, apoptosis

# GİRİŞ

## Meme Kanseri

Meme kanseri dünyada yıllık 1 milyon yeni tanı ve yaklaşık 373.000 ölüm vakasıyla kadınlarda en önemli kanser nedenleri arasındadır (1). Kadınlarda yaşam boyu gelişme riski 1/12 ile 1/20 arasında değişmektedir (2). Amerika'da 2010 yılında kadınlarda 207.090 yeni invaziv meme kanseri olgusu, erkeklerde de yaklaşık 1.970 yeni olgu oluşması beklenmektedir. Deri kanserleri hariç, meme kanseri kadınlarda en sık tanı konulan kanserdir ve kanser nedeni ölümlerde meme kanseri (% 15) akciğerden (% 26) sonra 2. sırada yer almaktadır (3). Meme kanserinden ölüm oranları 1990'dan beri azalma göstermektedir ve bu oran 50 yaşından genç kadınlarda yılda %3.3, 50 yaş ve üstünde %2 azalma olarak görülmektedir. Bu azalma erken tanı ve tedavinin gelişmesine bağlanmaktadır (3).

Türkiye'de 2005 yılı kanser verilerine göre meme kanseri 4. sırada yer alırken kadınlarda 1. sırada gelmektedir ve insidansı 35-47/100.000'dir (4). Meme kanseri insidansı ve ölüm hızı genellikle yaşla birlikte artış göstermektedir. 2004-2008 yılları arasında yeni vakaların % 95'i, meme kanseri ölümlerinin % 97'si 40 yaş ve üstü kadınlarda görülmüştür (5).

Erken tanıdaki gelişmelere ve meme kanseri biyolojisinin moleküler temelini anlaşılmış olmasına rağmen erken evre meme kanserli olguların %30'unda rekürrens görülmektedir (6).

## Meme Kanserinde Etyoloji

### A. Endokrin Etkenler

#### a) Üreme ile İlgili Etkenler

Reproduktif faktörler ilk primer meme kanseri için risk faktörleri olarak belirlenmiştir (7). Geç yaşta menarş, erken menapoz, genç yaşta gebelik ve gebelik sayısının artışı, emzirme süresinin uzaması azalmış meme kanseri



riski ile bağlantılı bulunmuştur (8). Reprodüktif faktörler ve kontralateral memede kanser riski açısından BRCA-1 (Breast Cancer-1) ve BRCA-2 (Breast Cancer-2) mutasyonu olanlar ve olmayanlar arasında anlamlı fark saptanmamıştır (9). Erken menstruasyon yaşı, meme dokusunun östrojene maruz kalma süresini uzatır. Bu nedenden dolayı erken menarşın meme kanseri riskini arttırdığına inanılmaktadır (10). Menstruasyon yaşı ile ilk doğum yapma yaşı arasındaki sürenin uzunluğu meme kanseri riski ile doğru orantılı bulunmuştur. Uzun süren laktasyonların ovulatuvar dönem sayısını azaltarak koruyucu etki yaptığı varsayılmaktadır (11,12). Doğurmamış ya da evlenmemiş kadınlarda meme kanseri görülme olasılığı daha fazladır (13,14). İlk doğumunu 35 yaşından sonra yapmış olmak ve geç menapoz da meme kanseri görülme olasılığını arttırmaktadır (13,14).

27.397 invaziv meme kanserli kadında yapılan geniş bir prospektif çalışmada, reprodüktif faktörler ile farklı histolojik tipte meme kanserlerinin ilişkisi bildirilmiştir. Menarş yaşı ve ilk doğum yaşının özellikle lobüler meme kanseri ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Artan parite duktal, lobüler, tübüler ve özellikle müsinöz tipler için düşük risk oluşturmakla birlikte medüller kanserde artışa sebep olduğu görülmektedir.

Reprodüktif faktörlerin hangi mekanizmayla meme kanseri gelişimine etkili olduğu tam anlaşılammakla birlikte gebelik ve laktasyon sırasındaki hormonal değişikliklerin koruyucu etkisine inanılmaktadır (15). Hormon replasman tedavisi duktalden daha çok lobüler ve tübüler kanserde risk artışına sebep olmaktadır (16). Lobüler meme dokusunun hormonlara duktal dokudan daha duyarlı olduğu söylenmektedir (17).

#### **b) Hormonal Etkenler**

Oral kontraseptif (OKS) kullanım süresi ile meme kanseri riski arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (18). Fakat yapılan çalışmalarda 45 yaş altı kadınlarda uzun süreli OKS kullanımının meme kanseri riskinde anlamlı bir artışa neden olduğu gösterilmiştir (19).

#### **c) Genetik Etkenler**

Meme kanserinin büyük çoğunluğu sporadik vakalar olmasına rağmen yaklaşık %5-10 oranında kalıtsal nedenli ailesel meme kanserleri

ortaya çıkmaktadır (20). Meme kanseri olan anne, kız ve kız kardeşler arasında meme kanseri görülme olasılığı normal popülasyondan iki kat fazladır. Meme kanseri aile hikayesi olanlarda meme kanseri ortaya çıkma yaşı daha erken ve bilateral olma eğilimindedir (13,21). Son yıllarda ailevi meme kanseri ile ilgili olduğu düşünülen bazı genler izole edilmiştir (22,23). Bu genlerden birisi olan BRCA-1, 17q21'e yerleşiktir. Mutasyon sonucu ailevi meme ve over kanserinde rol oynadığı saptanmıştır. BRCA-2 geni kromozom 13q12'ye yerleşik olup hastalığın erken ortaya çıkmasında ve bilateral olmasında önemlidir. Bu genlerdeki germ hücre soyu mutasyonlarını içeren kadınların yaşamlarının bir döneminde meme kanseri geliştirme riski %50-80 arasında değişmektedir (20). Meme kanseri oluşan bir kadında yaşamı boyunca ikinci meme kanseri oluşma riski % 25-30'dur. Meme koruyucu cerrahi sonrası kalan meme dokusu risk altındadır. Fakat bu risk, karşı memede oluşma riski kadar ve her yıl % 0.5-1'dir (24).

### **B. Diyet**

Genel eğilim yağdan zengin beslenmenin meme kanseri riskini arttırdığı yönündedir (25). Birçok hayvan modellerinde gösterildiği gibi diyetteki hayvansal yağların % 10'dan fazla olması meme kanseri riskini arttırmakta, buna karşın diyetteki yağın % 5'in altında olması özellikle yağ içermeyen diyetle beslenme, tümörün büyümesini dahi inhibe edebilmektedir (13,26). Liften zengin gıdaların barsaktan östrojen absorpsiyonunu engelleyerek meme kanserini önleyebileceği düşünülmektedir (27). Alkol kullanan kadınlarda da meme kanseri daha fazla görülmektedir (13). Meme kanserinde diyetin etkisi çocuk ya da adölesanlarda erken yaşta oluşur. İleri yaşlardaki diyet değişikliğinin riskin azalmasına katkısı gösterilememiştir (28).

### **C. Sosyoekonomik Durum**

Sosyoekonomik durumun meme kanseri insidansı, mortalitesi ve survisiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Sosyoekonomik durumu düşük olan kadınlarda meme kanseri mortalitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür (29).

## **D. Radyasyon**

Meme kanserinde en iyi saptanan etyolojik ajan radyasyona maruz kalınmasıdır (28).

### **Meme Kanserinde Risk Faktörleri**

**A- Yüksek risk faktörleri** ( 3 kat ya da daha fazla risk artışına yol açarlar)

**a. Cinsiyet:** Kadın olmak

**b. Yaş:** Risk yaşla birlikte artmaktadır. Olguların çoğu 40 yaş üstünde görülmektedir. Ancak, kız kardeşi veya annesinde genç yaşta kanser saptanmışsa, bu kişide daha erken yaşta meme kanseri oluşabilmektedir (5,30).

**c. Meme kanseri için genetik mutasyon olması (BRCA-1 ve/veya BRCA-2)** (5).

**d. Ailede meme kanseri öyküsü olması:** Meme kanseri insidansı özellikle anne, kız kardeş ve kız evlatlarda, yine teyze, kuzen, anneannede de artmış olarak görülür. Menopoz öncesi, bilateral ya da unilateral meme kanseri gelişen kadınların annelerinde, kız çocuklarında, kardeşlerinde risk daha yüksektir.

**e. Daha önce bir memede kanser öyküsü olması:** Özellikle menopoz öncesi meydana gelenler önemlidir. Daha önce meme kanseri geçiren ve tedavi alan kadınların, diğer memelerinde kanser gelişme olasılığının meme kanseri teşhisi konulmamış olanlara göre 3-4 kat daha fazla olduğu ifade edilmektedir (31).

**f. Atipi ile birlikte hiperplazi:** Benign meme hastalarının birçok formu meme kanseri için predispozan faktör değildir. Bu durum, özellikle fibrokistik hastalık için geçerlidir. Atipik hiperplazili memenin proliferatif hastalığı olanlarda risk 5 kat daha fazladır. Atipinin oluşturduğu risk, ailesinde meme kanser öyküsü olanlarda 11 kat daha yüksektir (28).

**g. Yüksek meme dokusu yoğunluğu** (32).

- h. Parite:** Nulliparlar ya da ilk doğumunu 30 yaşından sonra yapanlarda, ilk gebeliği 18 yaşından önce olanlara göre risk 3-4 kez daha fazladır.
- i. Lobuler karsinoma insitu:** İnvaziv kanser için %30 oranında risk taşır.
- j. Erkeklerde risk faktörleri:** Klinefelter sendromu, jinekomasti ve ailede erkek meme kanseri öyküsünün olması şeklinde sayılabilir (28).

#### **B. Orta derecede risk faktörleri (1.2 -1.5 kez fazla)**

- a.** Menstrüasyon öyküsü (erken menarş < 12 yaş, geç menopoz > 55 yaş)
- b.** Uzun süreli OKS kullanımı ve hormon replasman tedavisi (HRT)

Menapozdaki hormon tedavisinin riski tedavinin süresi, seçilen ilaçlar ve hastanın özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Östrojenin tek başına ve aralıklı kullanımının riski arttırmadığı görülmüştür. Uzun süreli östrojen kullanımı (5 yıldan fazla) riski artırmakta ve kombine östrojen-progestin kullanımı, tek başına östrojenden daha fazla risk artışı yapmaktadır (33).

- c.** Over, uterus ya da kolon kanser öyküsü
- d.** Diabetes mellitus
- e.** Alkol alımı
- f.** Obezite (postmenopozal)

#### **C- Riski azaltan faktörler**

- a.** Asya ırkı
- b.** Erken menopoz
- c.** 50 yaşından önce bilateral ooforektomi (34,35)
- d.** Emzirme (36,37)
- e.** 20 yaş öncesi gebelik (38)
- f.** 14 yaş sonrası menarj (7)
- g.** Artan parite (7,38)
- h.** Fiziksel aktivite (39,40)
- i.** Selektif östrojen reseptör modülatörü kullanımı (41)

#### **D-Risk faktörü olmayanlar**

- a.** Benign meme lezyonları (42)
- b.** Diyet (kahve, çay, diğer kafeinli içecekler, diyetel fitoöstrojenler, meyve ve sebzelerin tutarlı bir etkisi saptanmamıştır) (43-46)

- c. İlaçlar (antibiyotikler, aspirin ve nonsteroid antiinflatuarların tutarlı bir etkisi saptanmamıştır) (47-50)
- d. Düşükler (51)
- e. Sigara (52)

### **Meme Kanseri Sınıflandırılması**

Meme kanseri çok fazla morfolojik özellikler sergileyebilen heterojen bir hastalıktır. Duktal karsinoma ve lobüler karsinoma meme kanserlerinin çok büyük bölümünü oluşturmakla birlikte, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Meme Tümörleri Histopatolojik Sınıflaması'nın son versiyonunda yirminin üzerinde meme karsinomu histopatolojik tipi tanımlanmaktadır. Meme kanseri sınıflaması, meme kanserini tübüler, müsinöz, medüller ve lobüler karsinomlar gibi pek çok özel tümör tipine ve özel olmayan duktal karsinomlara ayırmaktadır (53).

Kanser hücreleri, çevresindeki bazal hücreleri aştığında invaziv, aşmadığında in situ olarak isimlendirilirler. İnvaziv duktal karsinom en fazla görülen meme kanseri tipi olup tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %75'ini oluşturduğu bildirilmiştir (54).

### **Meme Kanserinin Evrelemesi**

Meme kanserli hastalar, hekime başvurduklarında hastalıklarının yayılımı bakımından farklılıklar gösterirler. Sağkalım süresi, tanı konulduğunda hastalığın yaygınlığı (evre) ile ilişkilidir. Evre sadece sağkalım süresini belirlemek için değil, hastaya uygulanacak tedavi protokolünün belirlenmesi için de çok önemlidir. TNM (tümör-nod-metastaz) parametreleri sağkalım süresini önceden tespit etmede en güçlü prognostik faktörlerdir. Günümüzde hemen her yerde UICC (Union International Contre Cancere) ve American Joint Committee On Cancer'in (AJCC) biçimlendirdiği "tumor-node-metastasis (TNM) staging" sistemi kullanılmaktadır (55,56). AJCC periyodik

olarak evreleme standartlarını günceller. 2010 yılında da, meme kanseri evrelemesine yeni düzenlemeler getirilmiştir (57).

### **Meme Kanserinde Prognostik Faktörler**

Prognostik faktör terimi, kanserde tanı anında var olan, tedavi yapılmadığı durumda hastalısız sağkalım ve genel sağkalımla ilişkili her türlü ölçümü ifade etmekte ve bir tümörün doğal seyrini önceden belirlemek için kullanılabilir. Meme kanserinde bu amaçla kullanılan standart prognostik faktörler aksiller lenf nodu tutulumu ve sayısı, histolojik alt tip, tümör büyüklüğü, nükleer ve histolojik derece, ER (östrojen reseptör) ve PR (progesteron reseptör) durumunu içermektedir. Yaş, menapoz durumu, ırk, onkogenler, tümör supresor genler, büyüme faktörleri gibi işaretleyiciler muhtemel diğer prognostik faktörlerdir.

Üzerinde daha çok çalışılmasına ve yenilerinin bulunmasına açık olan prognostik faktörler aşağıda gösterildiği gibi çeşitli alt gruplarda sınıflanmıştır (58-60).

**1-Fiziksel etkenler:** Yaş, ırk, kilo

**2-Klinik etkenler:** Tümör boyutu, deriye, kasa invazyon, çevre dokuya fiksasyon, aksiller lenf nodu tutulumu

**3-Patolojik özellikler:**

**a-** Tümör boyutu ve büyüme şekli

**b-** Tümörün yerleşimi

**c-** Histolojik tür

**d-** Tümörün derecesi

**e-** Aksiller lenf nodu tutulumu

**f-** Damar invazyonu

**g-** Yaygın intraduktal komponent

**h-** Cerrahi sınırlar

**i-** Deri tutulumu

**j-** Aksiller lenf nodu değişiklikleri

**k-** Elastozis

**l-** Lenfosit infiltrasyonu

**m-** Tümör nekrozu

Lenf nodlarının durumu, tümör çapı, histolojik tip ve histolojik derece meme karsinomu için bilinen en önemli prognostik parametrelerdir (61).

**-Lenf nodu metastazı:** En önemli prognostik parametredir. Aksiller lenf nodları negatif hastalarda 10 yıllık yaşam %75 iken, nod-pozitif hastalarda bu oran %25-30'a düşmektedir. Metastatik lenf nodlarının seviyesi, sayısı ve büyüklüğü, perinodal yağ dokusuna invazyon durumu da prognoz açısından önemlidir.

**-Tümör boyutu:** Uzak metastazı olmayan ve nod negatif hastalarda en güçlü prognoz belirleyicisi tümör büyüklüğüdür (62,63). Tümör boyutu arttıkça aksiller lenf nodu metastazı artmakta ve sağkalım oranı düşmektedir.

**-Tümörün histolojik tipi:** Tübüler karsinom, invaziv kribriform karsinom, sekretuar karsinom ve invaziv lobuler karsinomun tübülobülöler varyantının prognozu iyidir. Buna karşın metaplastik karsinom, invaziv lobüler karsinomun pleomorfik ve solid tiplerinin, invaziv mikropapiller karsinomun ve inflamatuvar karsinomun prognozu kötüdür. Medüller karsinomun prognozu tartışmalı olmakla birlikte, invaziv duktal karsinoma göre daha iyi prognoz gösterdiği birçok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir.

**-Histolojik derecelendirme:** Günümüzde morfolojik tipine bakılmaksızın invaziv karsinomların tümünün derecelendirilmesi önerilmektedir ve en çok kullanılan derecelendirme sistemi modifiye Bloom-Richardson sistemidir. Bu derecelendirme sisteminde tümör hücrelerinin nükleer özellikleri, oluşturdukları tubulus yapılarının oranı ve mitoz sayısı ayrı ayrı skorlanarak elde edilen toplam skora göre derece belirlenmektedir.

**-Lenfovasküler invazyon:** Tümör çevresindeki lenfatik ve kan damarlarının lümeninde tümör hücrelerinin görülmesi durumunda lenf nodu metastazı olasılığı yüksektir. Lenf nodu metastazı görülmese de lenfovasküler invazyon varlığı kötü prognostik parametredir.

**4-Evre**

**5-Kemik iliği metastazları**

**6-Biyolojik belirleyiciler** (Proliferasyon belirleyicileri, DNA içeriği, Litik enzimler, Steroid hormon reseptörleri, Tümör baskılayıcı genler ve onkogenler)

**-Östrojen ve progesteron reseptörleri:** Meme kanserlerinin üçte birinde östrojen ve progesteron reseptörleri kaybolmuştur. Bu tümörler için kötü prognozu göstermektedir (64). İyi diferansiye tümörlerde reseptör seviyesi daha yüksek düzeydedir ve ER (+) tümörlerin prognozu daha iyidir (65). ER (+) ve PR (+) tümörlerde yaşam süresi daha uzundur (66).

**-Bcl-2:** Artmış Bcl-2 ekspresyonu varlığında ER (+) tümörlerde verilen tamoksifene direnç gelişir. Bcl-2 tamoksifen direnci için bir belirteç olarak kullanılabilir (67).

**-p53:** Hücre siklusunu suprese eden gendir. Meme karsinomlarının %50'sinde mutant p53 gen ekspresyonu vardır. Yüksek histolojik derece ve klinik agresiflik ile birlikte. Nod (-) hastalarda kullanılan bir prognostik belirteçtir (13).

**7-HER-2/neu:** Epidermal growth faktör reseptör ailesinden bir protoonkogendir. Meme karsinomlarının %10-30'unda FISH "fluorescent in situ hybridization" ile saptanan HER-2/neu gen amplifikasyonu ve immunhistokimyasal yöntemle saptanan protein aşırı ekspresyonu vardır. HER-2/neu aşırı ekspresyonu kötü prognostik parametredir ve genellikle histolojik derecesi yüksek, lenf nodu metastazı olan ve hormon reseptörleri negatif tümörlerde görülmektedir (68).

### **Meme Kanseri Tümör Belirteçleri**

Meme kanserinde en çok kullanılan tümör belirteçleri: CA 15-3, MCA, CEA, TPA, TPS ve Cyfra 21.1'dir (69-71).

Serumda CA 15-3, CEA, CA549, MCA, CA 27.29 testlerinden ikisine ilaveten, dokuda östrojen, progesteron reseptörleri ile onkogen c-erbB-2, serumda c-erbB-2 ektodomen ölçümleri teşhisi ve yaşam süresini % 90'lara çıkartabilmektedir. Hatta tümörün çevreye ya da lenf düğümlerine yayılımı yok ise % 100' lere çıkabilir (72)



### **1) Karbonhidrat Antijen 15-3 (CA 15-3)**

Meme dokusunun epitel hücreleri tarafından üretilen yüksek molekül ağırlıklı glikoprotein yapısında bir antijendir. Günümüzde meme kanserinin yaygınlığını saptamada kullanılmaktadır. Organa veya tümöre özgün değildir. Duyarlılığı % 77'dir. Diğer tümör belirteçleriyle birlikte kullanıldığında duyarlılığı % 12-25 oranında artmaktadır (73). Tedaviye cevabı izlemede de sadece CA15-3 kullanımı önerilmemekle beraber, yüksek CA15-3 seviyesinin tedavinin yetersizliğinin göstergesi olduğu kabul edilmektedir (72).

### **2) MCA “Mücin-like Carcinoma Associated Antijen”**

MCA bir serum glikoproteinidir. Normal dokuda MCA düzeyleri çok düşük olmasına karşın tümör sitozolünde yüksektir (74). Horgan ve ark.'ın (75) çalışmasında, benign meme hastalığı olan hastalarda, MCA seviyesinde yükselme olmadığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada meme kanserli hastalar arasında evre III ve evre IV olan hastalarda anlamlı bir artış saptanmıştır (75).

### **3) Karsino Embriyonik Antijen (CEA)**

Glikoprotein yapısında onkofetal tümör belirteçidir. Yetişkin insanların serumunda yüksek düzeyde olması malignite bulgusudur. Primer olarak kolorektal kanserlerde kullanılır. Ayrıca meme, akciğer, pankreas, mide, serviks, mesane, böbrek, tiroid, karaciğer ve over kanserlerinde de yükselmektedir. Erken evre meme kanserinde duyarlılığı düşük olmasına rağmen metastatik meme kanserlerinde % 40-50 olguda yükseldiği gösterilmiştir (76).

### **4) Doku Polipeptid Antijen (TPA)**

Sitokeratin 8, 18, 19 içeren sitokeratin kompleksidir. Tümör hücrelerinin membranında ve epitel hücrelerinde bulunan doku polipeptid antijenidir (77). Serum düzeyindeki düşüklük, hücrelerdeki artmış proliferasyonu gösterir. Yüksek sitozolik TPA düzeyleri meme kanserinde iyi prognozu gösterir (78).

### **5) Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)**

6000 kDA ağırlığında bir peptittir. Birçok çalışma EGFR'nin meme kanserinde prognostik ve prediktif değeri olduğunu ortaya koymuştur (79).

### **6) Katepsin D**

52 kDA ağırlığında, asidik lizozomal bir proteaz olan fosfoglikoproteindir. Katepsin D geni meme kanserli hastalarda aşırı ekspresyon gösterir (80).

### **7) c-erb B-2 (HER-2 )**

185 kDa ağırlığında transmembran proteindir. Meme kanserli hastanın Herseptin ile tedavisinin yapılıp yapılamayacağını belirlemede, Herseptin tedavisinin izlenmesinde, tümörün erken dönemini belirlemede kullanılabilir (81).

### **8) p53**

p53, tümör baskılayıcı genlerdendir. Aşırı ekspresyonu meme kanserinde kötü prognozün göstergesidir. p53 proteini, transkripsiyon faktörü olarak DNA'nın özgül bölgesine bağlanarak, diğer genleri düzenler. Gen hücreyi DNA hasarına karşı korur ve hasar olduğu zaman hücre çoğalmasını G1/S sınırında durdurarak, DNA onarımını başlatır. Onarımın başarı ile tamamlanamadığı durumlarda ise apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmesini sağlar. Mutant p53 proteini meme, hemotopoetik sistem, baş-boyun, endometrium, akciğer, kolon kanserlerinde belirlenmiştir (82).

### **9) CA 27.29**

Breast carcinoma associated antijen, cancer antijen 27.29 isimleri ile de bilinir. Meme kanseri nükslerini belirlemede kullanılır. II veya III evre meme kanserli olgularda nüksü belirlemek için yararlı olan CA 27.29, tarama ve rutin izlemede önerilmemektedir (72).

### **10) Karbonhidrat Antijen 549 (CA 549)**

Normal meme ve epitelyal dokularda bulunabilen bir glikoproteindir. Meme, akciğer, prostat, kolon kanseri olan hastaların serum düzeylerinde artış görülmüştür. Tedavi izlemi ve progresyon izlemi için kullanılmaktadır (82). Metastazı olan meme kanserli hastaların izlenmesinde kullanılır.

Sensitivite ve spesifite düşüklüğü nedeni ile tarama ve teşhiste kullanılmaz (72).

## **Apoptozis**

Apoptozis fonksiyonlarını kaybetmiş, fazla üretilmiş, yaşlanmış, düzensiz gelişmiş veya DNA'sında hasar olan hücrelerin, güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Apoptozis aynı zamanda programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı demektir. Hücre doğar belli bir süre yaşar ve sonra ölür. Buradaki ölüm mekanizması apoptozistir (83).

Kaynaklarda, "Apoptozis" terimi ilk defa Kerr, Wyllie ve Currie adındaki patologlar tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokularda ki hücre azalmalarından sorumlu, özgün bir hücre ölüm şekli olarak tanımlanmıştır (84). 1983 yılında Duke ve ark. tarafından endonükleazların yol açtığı DNA kırıklarının jel elektroforezinde gösterilmesi ile apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtına ulaşılmıştır (84). Bu tarihten sonra apoptozis ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır.

- Apoptozis, nekrozdan farklı olarak, fizyolojik şartlar altında da oluşabilen ve genelde doku homeostazisini sağlayan hücre ölüm şeklidir (83).

- Apoptozis, embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun gelişiminin sürdürülmesinde, anahtar rolü oynar (85). Hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım (mitozis) - yıkım (apoptozis) arasında kontrollü bir denge vardır.

- Bu dengenin, apoptozisin lehine veya aleyhine bozulması, birçok önemli hastalığın patogenezinde rol oynar. Örneğin, bazı viral enfeksiyonlarda apoptozis baskılanır ve kanser gelişimine yol açar. Oto-reaktif lenfositlerin ortamdaki uzaklaştırılmaması veya geç uzaklaştırılmaları sonucu, otoimmün hastalıklar oluşur (85).

- Barsak epitel hücrelerinin devamlı yenilenmesi, menstruasyon esnasında uterusun iç duvarındaki hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması, deri keratinositlerinin derinin en üst katmanındaki stratum korneum'u

oluşturması, timusta, etkisiz T lenfositlerinin ve kişinin kendi dokularına zarar verecek olanlarının öldürülmesi apoptozise örnektir.

- Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Örneğin virüsle enfekte hücreler bu yolla ortadan kaldırılır.

- Hasarlı DNA da apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır (85). Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır (85,86).

- Apoptozis, doku gelişimi esnasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesinde de rol alır. Örneğin böcek ve amfibilerin metamorfozu esnasında larva dokusunun yok edilmesine neden olur. Diğer bir örnek de memelilerde sinir sisteminin gelişimi esnasındaki programlanmış hücre ölümüdür. Fazla sayıda üretilen nöronların %50'den fazlası programlanmış hücre ölümü yoluyla ortadan kaldırılır. Ayrıca akut hücre hasarı durumunda da apoptozis rol almaktadır (85).

Apoptozis hızının bozulduğu diğer bir deyişle yavaşladığı veya arttığı hallerde çeşitli hastalıklar ortaya çıkar. Viral bir enfeksiyon sırasında, normal şartlarda virüsler enfekte ettikleri hücrede, kendi proteinlerini sentezletirler ve hücrenin kendisi için gerekli proteinlerin yapımını da durdururlar. Bu yüzden virüsle enfekte olmuş hücrede apoptozis indüklenir ve hücre ölür. Böylece virüs kendisini de yok etmiş olur. Fakat bazı virüsler örneğin Epstein-Barr virüsü (EBV) veya insan papilloma virüsü (HPV), enfekte ettikleri hücrenin apoptozise gitmesini baskılayan yollar geliştirmişlerdir. Örneğin EBV, apoptozis sinyalini kontrol eden düzenleyicilerden biri olan bcl-2'ye benzer moleküller üreterek ve ayrıca enfekte ettiği hücrenin kendi bcl-2 üretimini indükleyen moleküller üreterek apoptozisi durdurmaktadır (87). HPV'de, güçlü bir apoptozis indükleyicisi olan p53'ü etkisizleştirmektedir. Virüslerin bu etkileri sonucunda, bazı hematolojik kanserlerin gelişimine neden oldukları düşünülmektedir (86). Alzheimer, Parkinson, Hutchinson, Amyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklarda, AIDS ve otoimmün hastalıklarda

nedeni henüz bilinmeyen bir şekilde apoptozisin rol aldığı düşünülmektedir (87).

Malign hastalıklar, klasik olarak kontrolsüz aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklar olarak bilinir. Oysa aşırı proliferasyonun yanında azalmış apoptotik hücre ölüm hızının da malignite gelişimine katkıda bulunduğu görülmüştür. Zamanı geldiğinde normal olarak apoptozise gidemeyen, beklenenden daha uzun süre yaşayan hücreler, genomlarında biriktirdikleri mutasyonların etkisi ile malign hücrelere dönüşme potansiyeli taşırlar.

### **Apoptotik Hücre Ölümünün Aşamaları**

1. Apoptozisin başlatılması
2. Sitokrom c'nin salıverilmesi
3. Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu
4. Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması
5. Fagositoz

#### **1. Apoptozisin Başlatılması (Sinyal Üretici Yollar)**

Hücresinin apoptozise gidebilmesi için ilk önce, ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyalle karşılaşması gerekir. Bu sinyal hücre içinden veya dışından gelebilir (88).

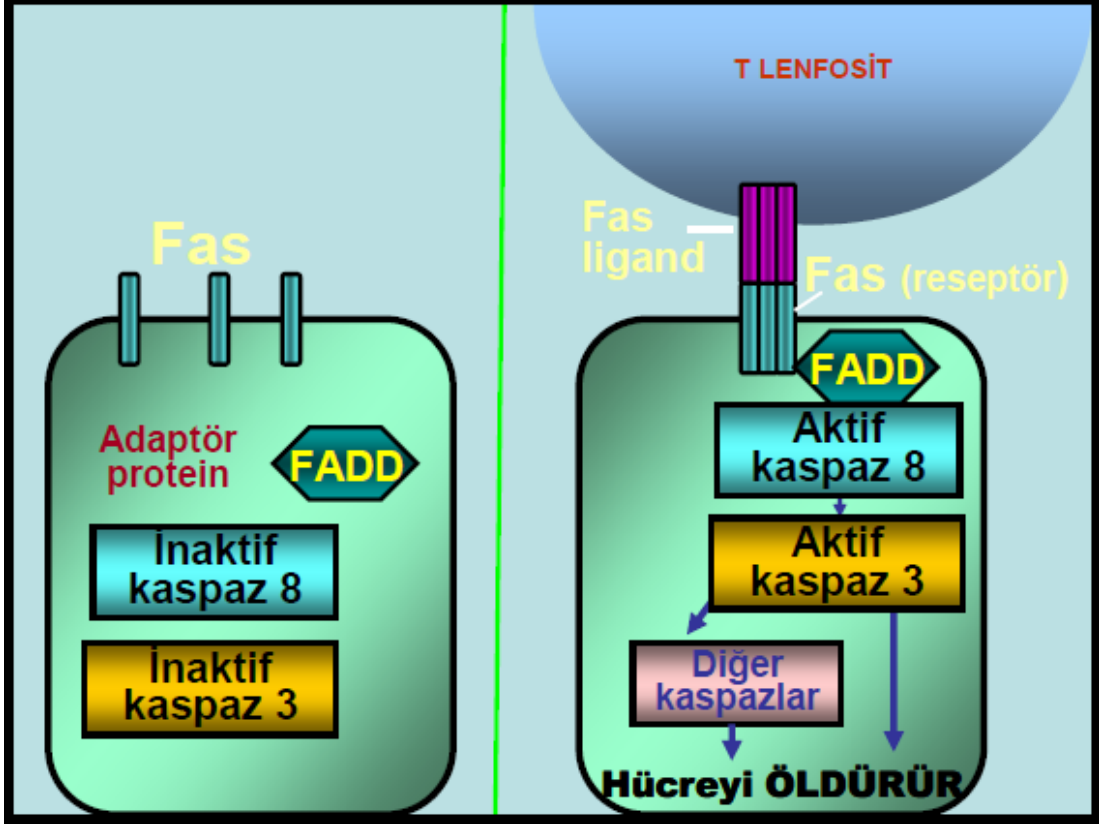
##### **1.1. Hücre Dışından Kaynaklanan Sinyaller**

**1.1.A. Çevresel Yaşam Sinyallerinin ve Büyüme Faktörlerinin Yetersizliği:** Hücreler çevre hücrelerden ve ekstrasellüler matriksten gelen yaşam sinyallerine, büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Bu sinyaller düzenli bir şekilde ve yeterli miktarda olmazsa hücreler apoptozise giderler (87).

**1.1.B. Ölüm Reseptörlerinin Aktivasyonu (Reseptör-Ligand Etkileşmesi):** Bazı sitokinler hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak ölüm programını harekete geçiren sinyaller üretebilirler (87). Apoptoziste rol alan membran reseptörleri içinde en önemli grup "Tümör Nekrozis Faktör Reseptör" (TNFR) ailesidir. TNFR içinde apoptozis oluşturan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR1'dir. Bu reseptörler

uyarıldıklarında, hücrenin sitoplazmasında bulunan parçaları, “adaptör proteinlere” bağlanırlar. Adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları vardır. Bunlar da apoptozis için başlatıcı olan kaspazlara (örn: prokaspaz-8) bağlanırlar (89).

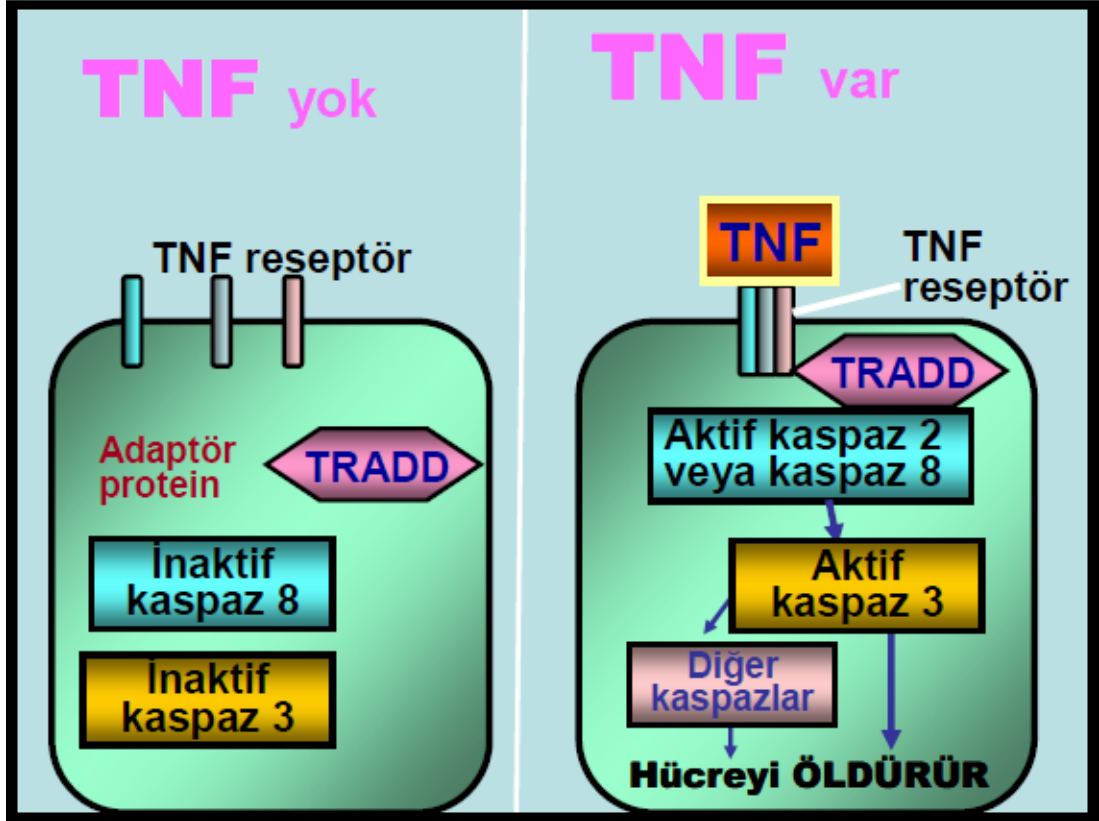
### 1.1.B.a. Fas-Fas Ligand Aracılı Apoptozis:



Şekil-1: Fas-fas ligand aracılı apoptozis (90)

Bu tip apoptozis hücre yüzey reseptörü Fas aracılığı ile oluşur. Fas ligandın Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içinde bulunan parçası, Fas, FADD'la “Fas adapter protein with a death domain” birleşerek ölüm başlatan sinyal kompleksini oluşturur. Bu da prokaspaz-8'in aktifleşmesini sağlar (91).

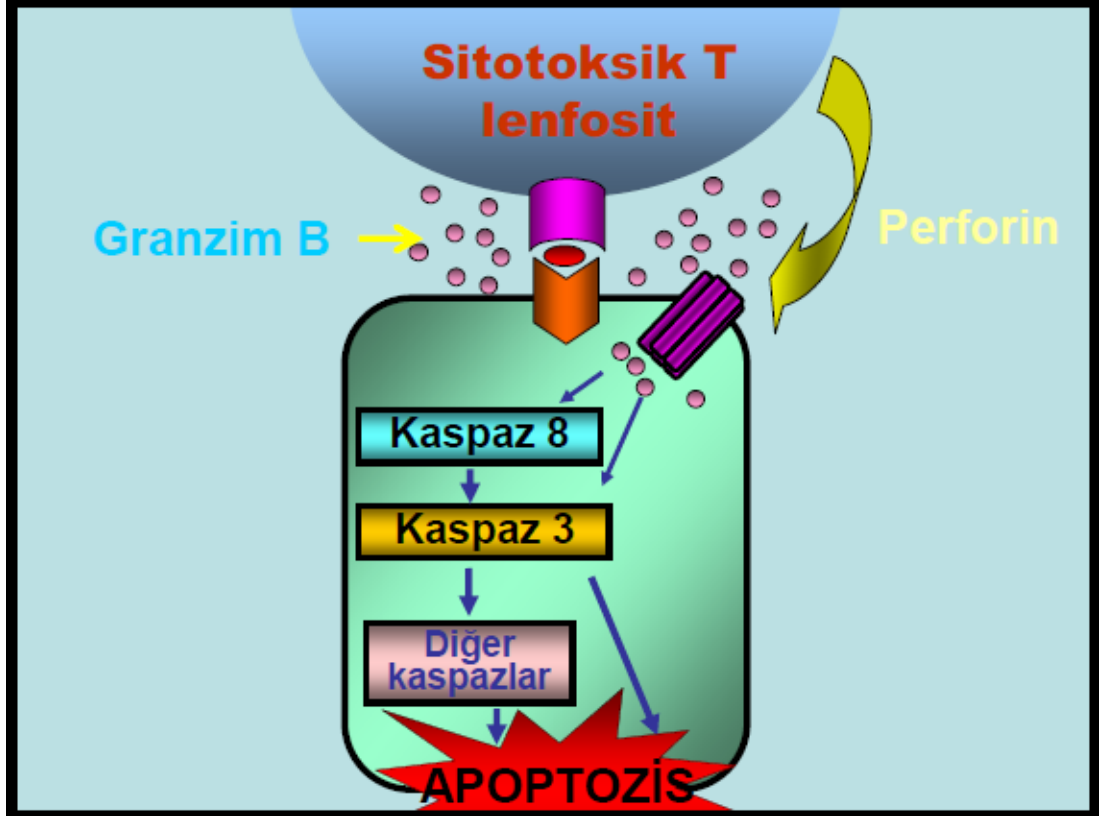
### 1.1.B.b. “Tumor Necrosis Factor” (TNF) Aracılı Apoptozis:



Şekil-2: Tümör Nekrozis Faktör (TNF) aracılı apoptozis (90)

Bir sitokin olan TNF'nin, TNF reseptörleri ile birleşmesi (örn: TNFR1) sonucunda reseptörün hücre içinde bulunan parçası, TRADD'la birleşerek “TNFR adapter protein with a death domain” etki gösterir. Adaptör protein daha sonra prokaspaz-8'i aktiveleştirerek apoptozise neden olur (88).

### 1.1.B.c. Sitotoksik T Lenfosit Aracılı Apoptozis :



Şekil-3: Sitotoksik T lenfosit aracılı apoptozis (90)

Sitotoksik T lenfositler (STL) infekte olmuş olan konakçı hücrelerin yüzeyinde bulunan yabancı antijenleri tanırlar. STL'lerin ana görevi malign ve/veya virüs ile infekte olmuş olan hücrelerin öldürülmesidir (88,92). Yabancı antijenleri tanıdıklarında yüzeylerinde Fas ligand oluşur. Hedef hücrelerin Fas reseptörlerine tutunurlar. STL'ler sitoplazmalarında granzim B (serin proteaz) ve perforin adı verilen ve apoptozis oluşmasını sağlayan proteinler içeren sitoplazmik granüllere sahiptirler (92). Perforin, transmembran por oluşturucu bir proteindir. STL'ler hedef hücrelerin membranlarında perforin ile porlar oluşturarak, sitoplazmalarına granzim B salgırlar. Granzim B hedef hücrelere girerek kaspazları aktive eder (87).



**1.1.B.d. Hücrelerin maruz kaldığı dış etkenler:** Hipoksi, radyasyon, antikanser ilaçlar, ısı, gamma ve ultraviyole ışınlar gibi etkenler apoptozise neden olabilirler. Bu etkenler DNA hasarı oluşturarak apoptozis meydana getirirler (87).

### **1.2. Hücre İçinden Kaynaklanan Sinyaller:**

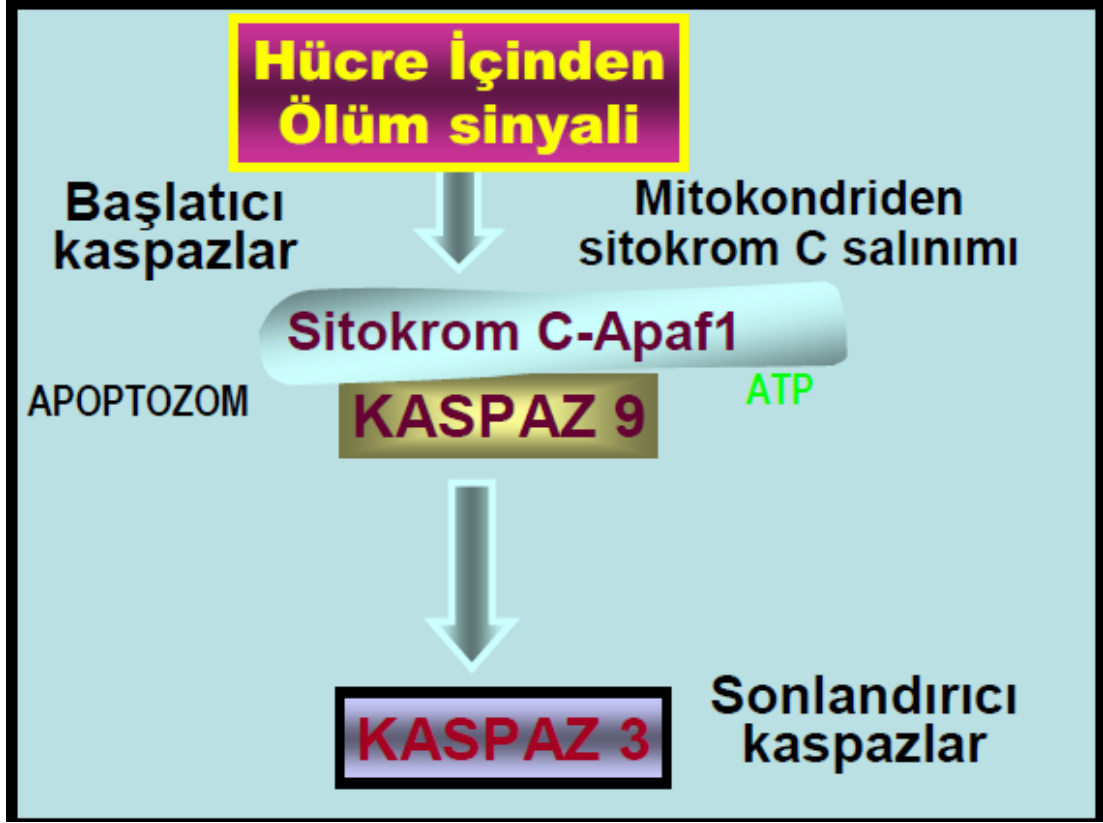
DNA hasarı, hücre içi pH'da düşme, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları, hücre içi  $Ca^{2+}$  seviyesinde artış, hücreyi apoptozise götüren merkezi hücre ölüm sinyallerini başlatabilmektedir (93).

### **2. Sitokrom c'nin Saliverilmesi**

Sitokrom c mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz bir döneme girildiğine işaret eder. Sitokrom c sitoplazmik bir protein olan Apaf-1'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3 etkisiyle dolaylı olarak apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonu ve oligonükleozomal DNA fragmantasyonu oluşur (94).

### **3. Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu**

İç ve dış sinyallerle hücre içindeki bir grup proteaz aktive olur. Bu proteazlara kaspaz adı verilmektedir. Ölüm reseptörleri adaptör proteinlerle, iç sinyaller ise mitokondriyle başlatıcı kaspazları aktive ederler (88).



**Şekil-4:** İç sinyallerle oluşan apoptozis (90)

Sinyaller dış mitokondri zarında geçirgenlik artışına neden olurlar. Mitokondri dış zarının geçirgenliğini bcl-2 gibi bazı proteinler ayarlamaktadır. Bcl-2 proteini antiapoptotiktir. Mitokondri dış membranına ve apoptozis proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf 1)'e tutunmuştur. Hücrenin içinden kaynaklanan apoptotik sinyaller Apaf 1'in mitokondriden ayrılmasına neden olur. Bu ayrılma dış mitokondri zarının geçirgenliğini artırır. Geçirgenliğin artması, mitokondrinin iki zarı arasında bulunan sitokrom c'nin sitozole çıkmasına neden olur. Sitokrom c sitoplazmada Apaf 1, kaspaz-9 ve ATP ile birleşir. Oluşan yapıya apoptozom denir (Şekil 4) Apoptozom sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz-3' u aktive ederek apoptozise neden olur (93).

Hücrede iç veya dış nedenlerle DNA hasarı olduğunda aktive olan bazı genler, hücrenin apoptozisine neden olabilir. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir. İnsan tümörlerinin %50'den fazlasında mutasyona uğradığı tespit edilen p53 geninin, kanser oluşumunu önlemede kritik rol oynadığı kabul edilmektedir (88,95).

Normalde inaktif durumda bulunan p53 geni, DNA hasarı oluştuğunda aktifleşerek p21 genini harekete geçirir. p21 geni hücrenin, geç G1 fazında kalarak, S fazına geçmesini engeller. Böylece hücre siklusu durdurularak oluşmuş olan, DNA'sı hasarlı hücrenin çoğalması engellenir. p53 geni, DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu sağlar. Bu proteinler DNA hasarını tamir edebilirse, hücre siklusundaki blok kalkar. Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p53 geni, bax proteinini (bcl-2 grubu proteinlerden, proapoptotik) aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptozise giderek ölmesini sağlar. Böylece DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur (88, 95).

#### **4. Hücrede Oluşan Biyokimyasal ve Morfolojik Değişiklikler**

##### **4.1. Biyokimyasal Değişiklikler**

Sonlandırıcı kaspazlar aktive olduktan sonra sitoplazmada ve çekirdek içinde hedef proteinleri yıkarlar.

- 1-DNA kırıklarının oluşması
- 2-Hücre iskeletinin yıkılması
- 3-Hücre membran değişiklikleri

##### **4.2. Morfolojik Değişiklikler**

Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlarda meydana gelmektedir. Apoptozis morfolojik olarak kendine özgü bir yapı içerir. Apoptoziste hücre küçülür, hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır (kromatin agregasyonu) ve yoğunlaşır (kromatin kondensasyonu) (85,87,96). Apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepecikler oluşur. Apoptotik hücre küçük cisimciklere (apoptotic bodies) parçalanır. Apoptotik cisimcikler, membran ile kaplıdır, değişen miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapılar içerirler (85). Apoptotik hücre veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden enflamasyon oluşmaz (87,96). Apoptozisin en özgün yönü, hücre DNA'sının nükleozomlar arası bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri de;

normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserinin erken evrede membranın dış yüzüne doğru yer değiştirmesidir “phosphatidylserine translocation”. Bu değişim, apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar (96).

### **5. Fagositoz**

Apoptotik cisimler çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından fagosite edilerek dokudan temizlenirler (87).

### **Apoptozis ile İlişkili Genler**

#### **Bcl-2**

Bcl-2 aile proteinleri, programlanmış hücre ölümü/apoptozisi düzenler. Geniş bir protein ailesidir ve tüm bireyleri dört BH domaininden en az bir tanesini içerir (Bcl-2 homolojisi). Bcl-2, Bcl-xl ve Mcl1 gibi üyeler anti-apoptotiktir. Bcl-2 proteinlerinin pro-apoptotik grupları, yapısal özellikleri açısından, yalnızca BH3 domaini içeren proteinler (Bid, Noxa, Puma ve Bad) ve multidomain proteinler (Bax ve Bak) olmak üzere alt gruplara ayrılabilir.

Bu gen, apoptotik ölümü engelleyen bir mitokondriyal membran proteini kodlar ve *apoptozisi baskılar*. Hücre ölümünü, mitokondriyal membran permeabilitesini kontrol ederek düzenler. Kaspaz aktivitesini, ya mitokondriden sitokrom c salınımını engelleyerek ya da Apaf-1'i bağlayarak inhibe eder (67).

#### **Bcl2L10**

Bu gen tarafından kodlanan protein Bcl-2 protein ailesine aittir. Bcl-2 aile üyeleri, hetero- veya homodimerler oluştururlar ve çeşitli hücrel aktivitelere yer alan anti veya pro-apoptotik düzenleyiciler olarak görev yaparlar. Protein BH4, BH1 ve BH2 domainlerini içerir. Bu protein, Bcl2, Bcl2L1/Bcl-X(L), ve Bax gibi diğer Bcl-2 protein aile üyeleri ile etkileşebilir. Bu genin aşırı ekspresyonunun, *apoptozisi baskıladığı* gösterilmiştir. Hücre yaşamını indükler. Bax tarafından indüklenen apoptozisi baskılar (67).

### **Bik**

Bu gen tarafından kodlanan proteinin, programlanmış hücre ölümünü indüklemek için Bcl-2 gibi hücre proteinleriyle etkileştiği bilinmektedir. Aktivitesi, yaşam proteinleri varlığında baskılanmış durumdadır ve bu proteinin anti-apoptotik proteinlerin hedefi olduğu düşünülmektedir. Diğer ölüm teşvik edici proteinler olan Bax ve Bak ile BH3 domaini paylaşırlar. *Apoptozisi teşvik eder*. Bu işlevi de Bcl-X(L), BHRF1, Bcl-2'ye bağlanarak yapar (67).

### **Bax**

Bu gen tarafından kodlanan protein Bcl-2 protein ailesine aittir. Bcl-2 aile üyeleri, hetero veya homodimerler oluştururlar ve çeşitli hücre aktivitelede yer alan anti veya pro-apoptotik düzenleyiciler olarak görev yaparlar. Bu protein, Bcl-2 ile bir heterodimer oluşturur ve apoptotik aktivatör olarak işlev görür. Proteinin, mitokondri membranı üzerinde yer alan anyon kanalları ile etkileşip, membran potansiyelinde değişiklik yaratarak sitokrom c salınımına (sonrası Kaspaz-3 aktivasyonu) sebep olur. Bu genin ekspresyonu, bir tümör supresör olan p53 ile düzenlenir ve p53 aracılığıyla gerçekleşen apoptoziste proteinin yer aldığı gösterilmiştir. *Apoptozis indükleyicisidir* (67).

### **Hrk**

Apoptozisi, ölüm baskılayıcı proteinler olan Bcl-2 and Bcl-X(L) ile etkileşerek düzenler. Hrk proteini 8 amino asit dışında (Bik proteininde yer alan BH3 domaini) diğer Bcl-2 aile üyeleri ile önemli bir homoloji göstermez. Hrk; Bcl-2 ve Bcl-XL (Bax, Bak ya da Bcl-XS gibi ölüm teşvik edici diğer Bcl-2-ilişkili proteinler ile değil) ile BH3 domaini vasıtasıyla etkileşir. Hrk, hücre içi organellerin membranlarına lokalize olur. *Apoptozisi aktive eder* ve seçici olarak yaşam proteinleri olan Bcl-2 and Bcl-X(L) ile etkileşir (67).

### **TNFRS10A ve TNFRS10B**

Bu genler tarafından kodlanan proteinler, TNF-reseptör ailesi üyelerindendir. Bu reseptörler, TNFSF10/TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand) ile aktive edilirler ve bu şekilde hücre ölüm sinyalini aktararak *apoptozisi indüklerler* (67).

## **FasLG**

Bu gen tarafından kodlanan protein, Fas reseptörünün ligandıdır. Her ikisi de transmembran proteinleridir. Fas'ın ligandı ile etkileşimi, hücrelerde *apoptozisin indüklenmesine* yol açar (67).

## **Meme Kanseri Tedavisi**

### **Cerrahi**

Meme kanserinin erken evrelerde küratif tedavisi cerrahi rezeksiyondur. En sık kullanılan yöntem modifiye radikal mastektomidir. Son yıllarda meme koruyucu cerrahi gittikçe önem kazanmaktadır. Yaşam süreleri bakımından mastektomi ile meme koruyucu cerrahi ve radyoterapi uygulanan erken evre meme karsinomlu olgular arasında anlamlı bir fark yoktur (97,98). Metastatik evrede ise yaklaşım palyatiftir. Uzak organ metastazı yapmış meme kanserinde, bugün uygulanan tedavi yaklaşımları ile kür elde etme şansı yoktur. Meme kanserinin soliter organ metastazlarında seçilmiş olgular için ilk tedavi yaklaşımı günümüzde metastazektomi yönünde gittikçe artan taraftar kazanmaktadır (99).

### **Radyoterapi**

Meme kanserinde radyoterapi lokal kontrolü artırmaktadır. Hem meme koruyucu hem de lokal ileri tümörlere multidisipliner yaklaşımda önemli bir disiplini oluşturmaktadır (99). Mastektomili hastalarda kemoterapinin tamamlanmasını takiben radyoterapi uygulanması önerilmektedir. Lokal nüks oranının bu yaklaşımla olumsuz etki oluşturmayacağı bildirilmektedir (100,101).

### **Hormonal Tedavi**

Hormonal reseptör pozitifliği saptanan hastalarda %60-70 cevap elde edilebilen tedavi yöntemidir. Adjuvan, neoadjuvan ve palyatif tedavide kullanılmaktadır. Tamoksifen (TAM), Lüteinizan hormon salgılatıcı hormon (LHRH) analogları, aromataz inhibitörleri (AI) en sık kullanılan ajanlardır. Dört çalışmanın metaanalizinde, premenapozal hastalarda TAM+LHRH analoglarının kombine kullanımının tek başına TAM kullanımına göre tüm

parametrelerde avantaj sağladığı bildirilmiştir (102). Postmenapozal kadınlarda AI kullanımı, premenapozal hastalarda ise tamoksifen ve gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) analogları kullanımı endokrin yanıtı hastalarda günümüzde önerilen tedavi yaklaşımlarıdır. Premenapozal kadınlarda GnRH analoglarıyla AI kombinasyonları devam eden çalışmalarda halen araştırılmaktadır.

### **Kemoterapi**

Meme kanserinde farklı evrelerde farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Adjuvan olarak kullanıldığında sağkalımı anlamlı olarak artırdığı bulunmuştur. Nüks riskini %25, ölüm riskini %15 azalttığı bildirilmektedir (103). Meme kanseri, antrasiklinler, taksanlar, antimetabolitler ve alkileyici ajanlar gibi çeşitli kemoterapötiklere cevap verirler (104). En etkili kemoterapi rejimi antrasiklinleri içeren rejimdir ve etkisi kemoterapi sonrası tamoksifen verildiğinde artar (105). Tek başına kullanılan sitotoksik ajanların çoğu ile vakaların % 20-35'inde kısmi yanıt (nadiren tam) alınır. Remisyon sıklıkla 4-6 ay sürer. En etkili tekli ajanlar doksorubisin ve taksanlardır. Dosetaksol (taksotere) meme kanserinin tedavisinde oldukça önemli sitotoksik ajandır (106). Dosetaksol özellikle karaciğer metastazı olan hastalarda etkilidir. Çoklu kemoterapi tekli kemoterapiden üstündür (107). CMF (Siklofosamid-metotreksat-5-Florourasil) protokolü özellikle klasik versiyonu başlangıç tedavisi için, prednizon ile birleştirildiğinde iyi bir seçimdir. Bu tedavi ile bir yıl veya daha uzun bir süreyle % 60 civarında yanıt beklenebilir. Doksorubisinin, CA (siklofosamid-Doksorubisin) ve FAC (5-Florourasil-Doksorubisin-Siklofosamid) kombinasyonları da etkilidir. CMF (Siklofosamid-Metotreksat-5-florourasil) veya CA (siklofosamid-Doksorubisin) başarısız olunca ardışık tek ajanlar kullanılır. Son evre hastalarda paklitaksel, dosetaksol, 5-florourasil, metotreksat, vinorelbin, mitomisin C ve prednizon kullanılan ajanlardır. Randomize çalışmalar değerlendirildiğinde, kemoterapinin kombinasyon olarak kullanımı tek ajan olarak kullanımına göre daha iyi bir cevap elde edilmesi, daha uzun bir hastaliksız sağkalım ve orta düzeyde bir genel sağkalım avantajı sağladığı bildirilmiştir (108). Ancak kombinasyon rejimleri daha toksiktir (109).

## **Meme Kanseri Tedavisinde Klinikte Kullanılıp, Tezde Sitotoksisite Deneylerinde de Kullanılan İlaçlar**

**Epirubisin:** Kemoterapide kullanılan antrasiklin temelli bir ilaçtır. Epirubisinin etki mekanizması, DNA'ya bağlanabilmesinden kaynaklanmaktadır (110). Hücre kültürü çalışmaları, epirubisinin süratle hücreye geçtiğini, nükleusta lokalize olarak DNA, RNA sentezini ve mitozu inhibe ettiğini göstermiştir. Aynı zamanda topoizomerez II enzimini inhibe ederek hücre ölümüne de neden olmaktadır (111). Epirubisin hücre membranlarına ve plazma proteinlerine bağlanabilir ve sitotoksik etki gösterebilir. Bununla birlikte serbest radikallerin üretimine neden olarak DNA ve hücre hasarlarına neden olabilmektedir (112). Başlıca meme kanseri olmak üzere farklı kanser tiplerinde kemoterapi rejiminde kullanılmaktadır (113).

**Doksozobisin:** İntravenöz yolla verildikten sonra vücutta yaygın olarak dağılır. Doksozobisinin doz sınırlayıcı yan etkisi kemik iliği supresyonudur. Yan etkileri total alopesi, bulantı, kusma, stomatittir. Doksozobisinin dikkat edilmesi gereken en önemli toksisitesi doza bağımlı olarak görülen kardiyotoksisitedir.

Antrasiklinler direkt olarak hücre membranlarının yapısını bozarak, DNA yapısına girerek, DNA Topoizomerez II'yi inhibe ederek ve serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olarak sitotoksik etki göstermektedir (114,115).

**Dosetakso:** Mikrotübüler depolimerizasyon inhibitörüdür (116,117). Mitoz zehiri olarak bilinirler. Siklusun M dönemine özgü ilaçlardır. B tübülün proteinine bağlanırlar ve tübülün proteininin polimerizasyonunu stimüle ederler. Böylece mikrotübül oluşumunu arttırırlar ve fonksiyonel olmayan mikrotübül sentezi oluşur (118). Yan etkileri paklitaksele benzer myelosüpresyon ve ciddi sıvı retansiyonuna neden olur (116,28).

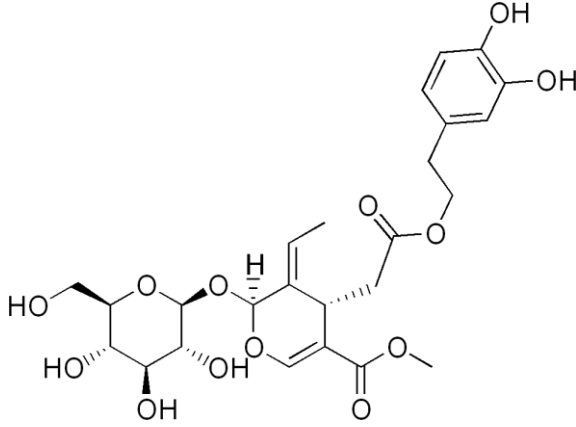


## Zeytin Yaprağı Ekstraktı

Epidemiyolojik alışmalar ve hayvan deneyleri, bazı besinsel bileşiklerin çeşitli kanserlerin insidans hızlarında rol oynadığını ortaya çıkarmıştır. Bilinen tüm insan kanserlerinin üçte biri besinlerin özel bileşikleri ile ilgili olabilir (119,120). Bunun için pek çok araştırma grubu kanser süreçleri üzerinde besinsel bileşenlerin etkilerini araştırmaktadırlar ve besinsel yağların kolon, meme ve prostat kanser riskini artırdığını belirtmektedirler (121). Ayrıca, kardiyovasküler hastalıklar ve kolon ve meme gibi kanserlerin insidansı Akdeniz Bölgesi'nde Avrupa'ya göre daha düşük tespit edilmiştir (122).

Zeytin ağacı yaprağının sağlığa yararları bilinmekle beraber çeşitli yerlerde ilaç olarak kullanılmıştır. Doğal zeytin yaprağı ve zeytin yaprağı özü, anti-aging, immün sistem güçlendirici ve antibiyotik olarak pazarlanmaktadır (123).

Zeytin yaprağı önemli ölçüde fenolik bileşik içerir. Başlıca fenolik bileşikler; sekoiridoidler, flavonoidler, fenolik asitler ve lignanlardır. Oleuropein (OL) sekoiridoid grubunda yer alan önemli bir fenolik bileşiktir (124). OL ve metaboliti hidrokstitirizol (HT) *in vivo* ve *in vitro* antioksidan aktiviteye sahiptir ve zeytinyağının acı ve keskin tadını verir (125). Zeytin ağacı meyvesinin büyüme fazında net ağırlığın yaklaşık %14'ne kadar ulaşır, (126) sonra miktarı giderek azalır. Zeytinyağının fenolik bileşiklerinin antioksidan aktivitesi ve özellikle OL ve yan ürünü HT birçok deneysel modelde çalışılmıştır. OL ve HT'n antioksidan aktivitesi hücresel modeller ve hayvanlar üzerinde de gösterilmiştir (127,128). Zeytin yaprağı vücudu serbest radikallerin etkisinden korur. Son çalışmalarda zeytin yaprağı antioksidanlarının karaciğer, prostat, meme gibi kanserlerin tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (129,130). Son epidemiyolojik çalışmalarda fenolik bileşiklerden zengin zeytinyağının azalmış kardiyovasküler risk, nörodejeneratif hastalık ve kanser ile korele olduğu gösterilmiştir (130-135).



**Şekil-5:** Oleuropein'in molekül yapısı

Tezde kullanılan ve etil alkol ile distilasyon yöntemi ile elde edilen zeytin yaprağı ekstraktında (ZYE) % 20 oranında oleuropein bulunmaktadır (Kale Naturel Bitkisel Ürün Gıda Kozmetik ve Tarım Ürünleri Dış Ticaret ve Sanayi Limited Şirketi- Balıkesir).

OL ve iki ana metabolitinin (hidroksitirizol ve elenolik asit) toksisitesini değerlendirmek için çeşitli çalışmalar yapılmış ve çeşitli hayvan türlerinde toksik olmadığı bulunmuştur (136-138). OL'in akut toksisite çalışmalarında farelerde 1000 mg/kg'a kadar lethal ya da yan etki gözlenmemiştir (136).

Sızma zeytinyağının öne sürülen anti-tümör özellikleri, hem oleik asidin yüksek içeriğinden hem de minör antioksidan bileşenlerinden (hidroksitirizol, oleuropein, kafeik asit vb.) dolayı oksidatif DNA hasarından koruyucu etkisiyle ilişkilidir (139,140)

Besinsel yağ alımı nedeniyle membranın fizikokimyasal özelliklerinin değişimi membran lipidlerince üretilen biyoaktif moleküllerin kompozisyonunu etkileyebilir. Besinsel lipidler ayrıca Ras proteinlerinin aktivasyonunu da etkileyebilir (119,120) Bu proteinler büyüme, farklılaşma ve apoptozisi kapsayan hücre fonksiyonlarının kritik düzenleyicileridir. Yüksek oranda sızma zeytinyağı diyeti ile meme kanseri üzerinde yapılmış bir deneysel çalışma ile Ras aktivasyonu ayarlanmasında ve GTP bağlanmış (aktif) Ras seviyesinde azalma görülmüştür. Bu şekilde zeytinyağı tabanlı beslenmenin kanser üzerindeki değiştirici etkisinin Ras aktivasyonu ve Ras-bağımlı sinyaller tarafından değiştirilerek uygulanabileceği öne sürülmüştür.

Meme kanseriyle yapılan deneysel bir çalışmada yüksek zeytinyağı diyetinin ErbB ailesinin gen ekspresyonunu değiştirici etkisi olduğu bulunmuştur (121). Ayrıca yüksek zeytinyağı karsinogenez üzerine koruyucu etkisiyle birlikte, karsinogenez oranını azaltmaya da yardımcı olur. Yağ asitlerinin birkaç nükleer proteini direkt ya da indirekt olarak regüle ettiği de bildirilmiştir. Ayrıca tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonu da yağ asitleri tarafından regüle edilir. Dahası, besinsel lipidlerin baskılayıcı genler olan BRCA-1 ve BRCA-2'nin ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir (122). Besinsel yağ asitleri hücre-hücre adezyon moleküllerinin (E-kaderin) ekspresyonundaki değişiklikleri indükler. Farklı kanser hücre soylarında (akciğer, meme, kolon, melanoma, karaciğer vb.) ę-linolenik asit, E-kaderin upregülasyonu ile ilişkilidir. E-kaderin ekspresyonunun yüksek seviyeleri ę-linolenik asitin antikanser özellikleri ile uyumlu olarak in vitro invazyon azalması ve agregasyon artışı ile ilişkilidir (141). Kolon adenokarsinoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada polifenollerin COX-2 inhibisyonu yaparak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği görülmüştür (142).

Bizim bu çalışmadaki amacımız ZYE'nin tek başına ve anti-kanser ilaçlarla kombinasyonunun meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini araştırmaktı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. Ticari olarak Amerika Hücre Kültür Koleksiyonunda satılan fakat bizim Prof. Dr. Ayhan Bilir'den (İstanbul) edindiğimiz MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre soyları sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Kriyovialin içindeki hücre süspansiyonu 5 ml besiyeri içeren 15 ml'lik steril polipropilen konik dipli tüpe yavaşça aktarıldı. Tüp 800 rpm'de 5 dk santrifüj (Hettich Rotina 35R, Almanya ) edildikten sonra üst sıvı kısmı atıldı. Hücre pelleti 1 ml hücre besiyeri içerisinde iyice karıştırılarak süspansiyon haline getirildikten sonra üzerlerine 4 ml besiyeri eklendi. 5 ml'lik hücre süspansiyonları 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabına (25 cm<sup>2</sup>, Tissue culture flasks, TTP, İsviçre) aktarıldı. 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde (Sanyo, Japonya) inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün hücre besiyeri ortamı yenilenecek hücrelerin büyümeleri sağlandı. Kültür kabı her gün mikroskop (Inverted microscope, CKX41, Olympus, Almanya) altında kontrol edildi ve hücrelerin büyük oranda konfluent olduklarında tripsinizasyon işlemi ile daha büyük hacimli 75 cm<sup>2</sup> kültür kaplarına (75 cm<sup>2</sup>, Tissue culture flasks, TTP, İsviçre) aktarıldı. Bu şekilde hücrelerin istenilen sayıya ulaşmaya kadar çoğalmaları sağlandı. Hücre kültürü büyütme ve pasaj işlemlerinin tümü laminar akım kabinlerinde (Esco Airstream Class II Biological Safety Cabinet, Singapur) gerçekleştirildi.

### Kullanılan Hücre Soyları

#### 1. MDA-MB-231 Hücre Soyu

- İnsan epitelyal meme adenokarsinomu hücre soyu
- Östrojen reseptörü (-)
- Epidermal growth factor (EGF) (+)
- Transforming growth factor alpha (TGF alpha) (+)
- E-kaderin (-)
- Kaspaz 2: (+), Kaspaz 3: (+)

- Plevral efüzyondan elde edilmiştir.
- Yüksek oranda invazif

## **2. MCF-7 Hücre Soyu**

- İnsan epitelyal meme adenokarsinomu hücre soyu
- Östrojen reseptörü (+)
- Kaspaz 2: (+/-), Kaspaz 3: (-)
- Plevral efüzyondan elde edilmiştir.
- Daha az oranda invazif

### **Kullanılan Besiyerleri, Sıvılar ve Hücrelerin Üretilmesi**

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre soyu için RPMI 1640 besiyeri (PAA, Avusturya) kullanıldı. İçerisine % 5 Fötal sığır serumu (PAA, Avusturya) ve % 1 Penisilin-Streptomisin (Biochrom AG, Berlin) ilave edildi.

Hücre kültür kaplarına ekilen hücreler besiyeri içerisinde % 5'lik CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 37°C'de kültüre edildi.

### **İlaçların hazırlanması**

Epirubisin (Farmorubicin®, Carlo Erba, İtalya), doksorubisin (Doxo Teva®, Pharmachemie B. V, Hollanda) ve dosetaksol (Taxotere® flakon, Sanofi-Aventis Farma, Türkiye) antikanser ilaçları Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kemoterapi İlaç Hazırlama Ünitesi'nden temin edildi. Her bir ilaç, önceden tanımlanan Test İlaç Konsantrasyonu (TİK) olarak belirlenen altı farklı konsantrasyonda hazırlandı. TİK, farmakokinetik ve klinik değerlendirme bilgileri ile belirlenmiştir (143). Yaklaşık plazma ilaç konsantrasyonu olarak % 100 TİK tanımlanmıştır (144). Böylece % 100 TİK değeri (µg/ml) ilacın plazma pik dozuna karşılık gelmiştir.

Hücre kültürü deneylerinde ilaç konsantrasyonları: % 200, % 100, % 50, % 25, % 12.5 ve % 6.25 TİK dozlarında kullanıldı. Epirubisin % 100 TİK değeri 0.5 µg/ml, doksorubisin % 100 TİK değeri 0.5 µg/ml, dosetaksol % 100 TİK 11.3 µg/ml olarak belirlendi.

### **Uygulanan İlaç Grupları**

1. Kontrol Grubu (ilaçsız grup)
2. Sadece ZYE içeren grup
3. Sadece anti-kanser ilaç içeren grup

- Epirubisin
- Doksorubisin
- Dosetaksol
- 4. Antikanser ilaç + ZYE grubu
- Epirubisin + ZYE
- Doksorubisin + ZYE
- Dosetaksol + ZYE

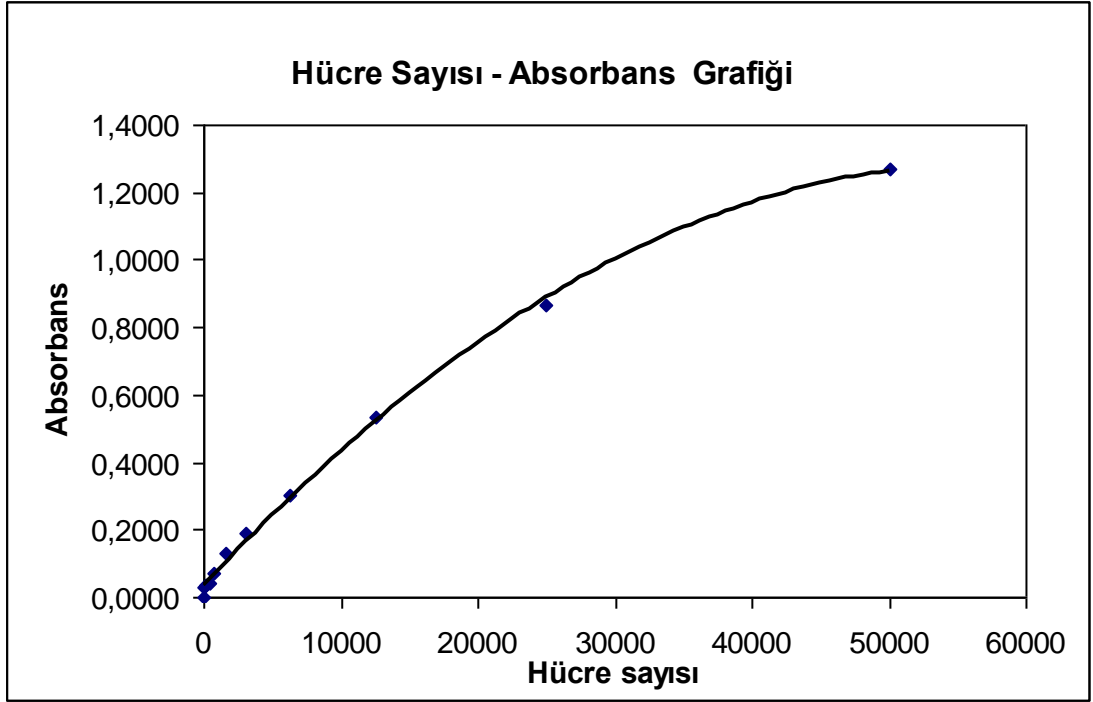
#### **Zeytin yaprağı ekstraktının toksik dozunun belirlenmesi:**

Kale Naturel Bitkisel Ürün Gıda Kozmetik ve Tarım Ürünleri Dış Ticaret ve Sanayi Limited Şirketi'nden (Balıkesir) temin edilen ZYE uygulama konsantrasyonları daha önce yayınlanmış veriler (145) ve zaman-doz yanıt deneyleri ışığında belirlendi. Besiyeri içinde hazırlanan stok ekstraktlar filtre (0.2 µm Orange Scientific, Belçika) edilerek steril hale getirildi. Belirlenen dozlarda MTT ve ATP metodu ile sitotoksisite çalışıldı.

#### **Metiltiazoltetrazolium (MTT) metodu**

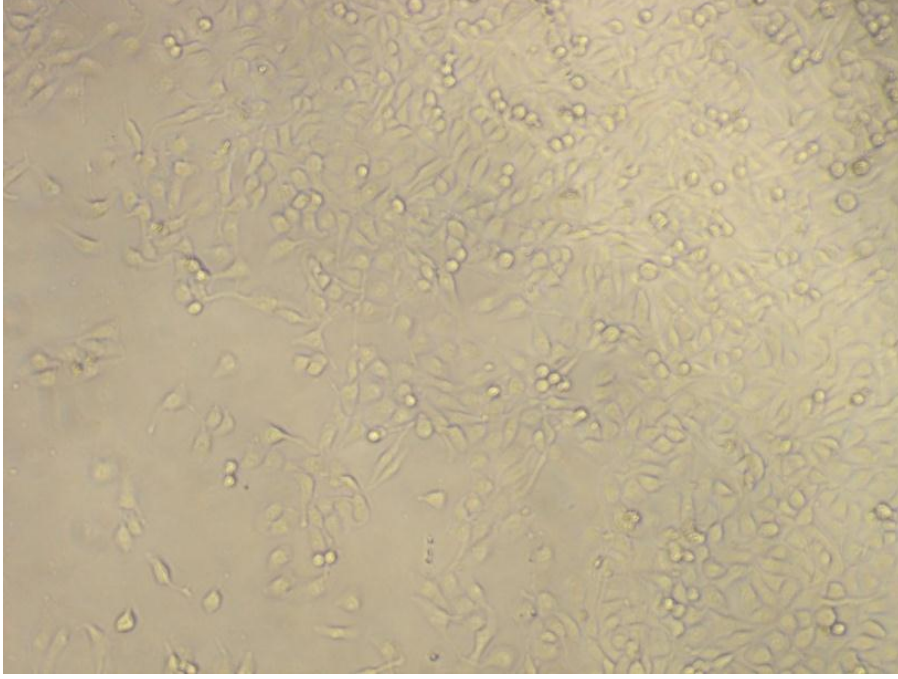
MTT metodu, hücrelerdeki dehidrogenaz aktivitesini ölçen kolorimetrik bir yöntemdir. Total dehidrogenaz aktivitesi ile hücre sayısı arasında doğru ilişki olduğu ilk kez Mossmann ve ark. tarafından gösterilmiş (146) ve günümüze kadar hem proliferasyon hem de sitotoksisite deneylerinde yaygın olarak kullanılmıştır.

Farklı sayılarda (0-50.000 hücre/kuyucuk) MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat sonra MTT testiyle verdiği absorbanslar ölçüldü. Böylece total dehidrogenaz aktivitesiyle hücre sayısı arasında doğrusal ilişki olduğu belirlendi (Şekil-6). Alınan sonuçlara göre uygun sayıda hücreler sitotoksisite testlerinde kullanıldı.

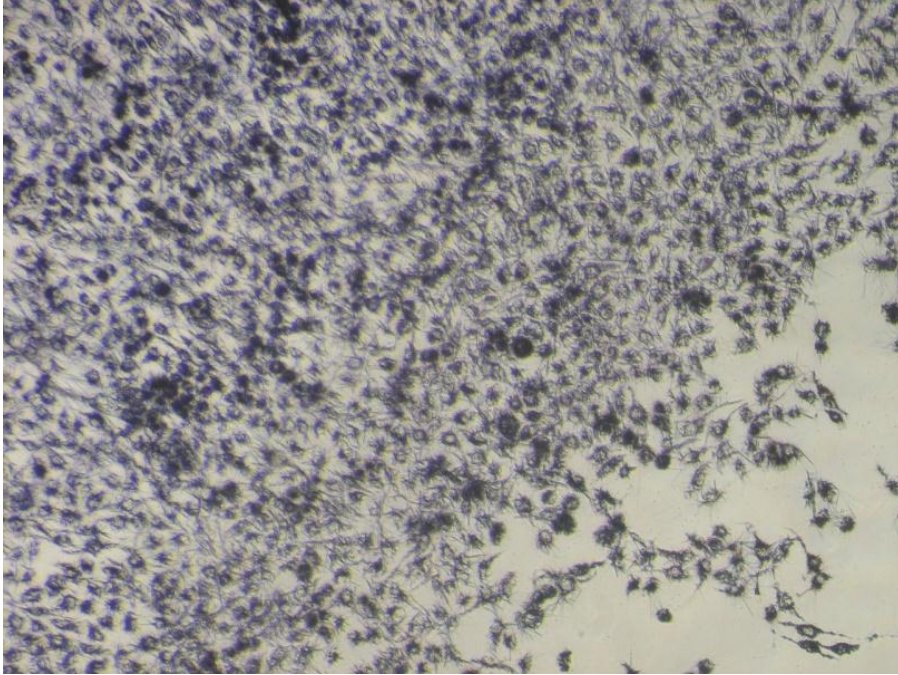


**Şekil-6:** MTT metodu ile MDA-MB-231 hücrelerinin 570 nm'de verdikleri absorbans değerleri.

Hücrelerde ilaç uygulamalarından sonra olabilecek canlılık oranlarını değerlendirebilmek amacıyla pozitif (maksimum canlılık) ve negatif (minimum canlılık) kontrol hücreleri kullanıldı. (Şekil-7 ve 9)

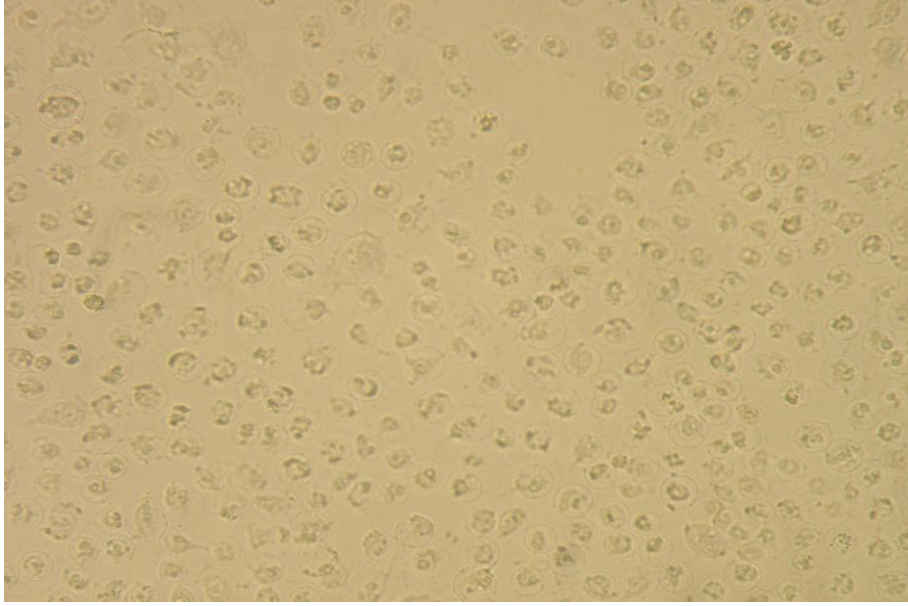


**Şekil-7:** MTT testi uygulamasından önce MCF-7 hücrelerinin faz kontrast mikroskobik görünümü. MO grubu (maksimum yaşam, pozitif yaşam kontrolü, ilaç uygulanmamış kontrol hücre grubu).

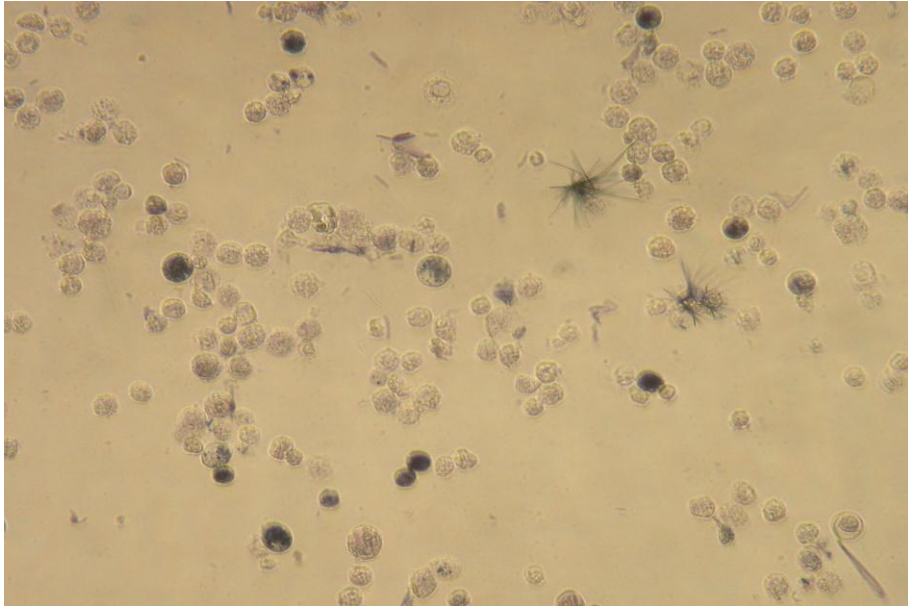


**Şekil-8:** MCF-7 hücrelerinin MTT testi uygulamasından sonra oluşan formazon kristallerinin faz kontrast mikroskobik görünümü. MO grubu (maksimum yaşam, pozitif yaşam kontrolü, ilaç uygulanmamış kontrol hücre grubu).





**Şekil-9:** MDA-MB-231 hücrelerinin total hücre öldürücü ajan (sodyum azid) sonrası MTT testi uygulamasından önce faz kontrast mikroskopik görünümü. M1 grubu (minimum yaşam, negatif kontrol).



**Şekil-10:** MDA-MB-231 hücrelerinin total hücre öldürücü ajan (sodyum azid) sonrası MTT testi uygulamasından sonra oluşan formazon kristallerinin faz kontrast mikroskopik görünümü. M1 grubu (minimum yaşam, negatif kontrol).

Bu yöntemde çeşitli dozlarda kemoterapötikler ve ZYE 100 µl içerisinde olacak şekilde 96 kuyucuklu düz hücre kültür kaplarına ( Tissue Culture Testplates, 96 wells, Orange Scientific, Belçika) uygulandı. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri sayılarak 5.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde

ilaçların üzerine ekildi. 72 saat 37°C, % 5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

72. saatlik inkübasyonun sonunda tüm kuyucuklara MTT solüsyonu (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, M5655, Sigma, ABD), PBS (Sigma, Almanya) (fosfatlı tuzlu tampon) içerisinde (5 mg/ml, pH:7.2) 20 µl olacak şekilde ilave edilerek karanlıkta 37°C, % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 4 saat inkübe edildi.

İnkübasyonun sonunda MO'da (ilaç uygulanmamış kontrol hücre grubu, maksimum yaşam) çok fazla sayıda, MI'da (minimum yaşam) ise birkaç tane olmak üzere koyu mavi renkli formazon bileşikler (Şekil-8 ve 10) meydana geldi. Oluşan formazon bileşiklerini çözünür hale getirebilmek için bütün kuyucukların üzerine Sodyum Dodecyl Sülfat (SDS) (Applichem, Almanya) solüsyonundan (0.01 N HCl'ü, % 10'luk SDS tamponu distile su içinde) 100 µl olacak şekilde eklendi. 18 saat, 37°C, % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi.

Oluşturdukları renk şiddeti spektrofotometre (FLASHScan S12 Analytik Jena AG, Almanya) ile 570 nm dalga boyunda ölçüldü.

Aynı sayıda ekilmiş ve hiç ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerindeki (MO) renk şiddeti ile tedavi uygulanmış hücrelerdeki renk şiddeti oranlanarak tedaviye maruz bırakılmış hücrelerdeki yaşam (canlılık) oranı (yüzdesi) hesaplandı.

#### **% Canlılık hesabı:**

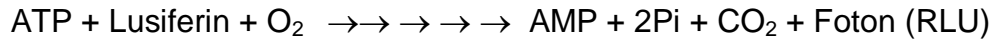
Yaşayan hücreler koyu mavi formazon kristalleri oluştururlar, buna karşılık ölen hücrelerde bu kristaller gözlenmez. Tedavi edilen hücrelerin canlılıkları (Örnek C) ilaç almamış kontrol hücreleri referans alınarak hesaplandı ve bu değer % 100 canlılık (Maksimum canlılık, MakC) olarak belirlendi. 1 mM Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) uygulanan hücreler, minimum canlılık seviyesinin (Minimum canlılık, MinC) hesaplanmasında referans olarak alındı. Tüm bu değerler ile aşağıdaki formül kullanılarak hücrelerde tedavi süresi sonunda oluşan % canlılık oranları hesaplandı.

$$\text{Canlılık (\%)} = [100 \times (\text{ÖrnekC} - \text{MinC}) / (\text{MakC} - \text{MinC})].$$

## ATP Canlılık Testi

ATP testi hücre içerisindeki intrasellüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanan yüksek duyarlılığa sahip bir yöntemdir. Metodun prensibi canlı hücrelerdeki ATP'nin lusiferin ile reaksiyonunu takiben ortaya çıkan luminesan ışımının ölçümüne dayanmaktadır. Oluşan ATP miktarı canlı hücre sayısı ile direkt orantılıdır (143).

### *Lusiferaz*



96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kemoterapötikler ve ZYE konulduktan sonra hücreler 5.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. 72 saatlik inkübasyonu takiben ATP ölçümü ATP kiti (Sigma, FLASCH, Almanya) ile gerçekleştirildi. Bunun için önce 150 µl besiyeri alınıp atıldı ardından üreticinin önerileri doğrultusunda tümör hücrelerinin içeriğindeki ATP'nin ortaya çıkarılması için kuyucuk başına 50 µl olacak şekilde kit içerisinde bulunan tümör hücre ekstraksiyon ayırıcı ilave edildi. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyonu takiben 50'şer µl alınıp luminometrik ölçüm için uygun olan beyaz renkli plaklara (Microfluor 2 white, flat bottom 96 well microtiter plates, Thermolab Systems, İngiltere) aktarıldı. Üzerlerine 50 µl luciferin-luciferaz karışımı eklendikten hemen sonra oluşan kemiluminesans reaksiyonu ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde ayarlanmış bulunan luminometre (FLX800 Mikroplak luminesans ve floresans okuyucu; BioTek, ABD) ile ölçüldü. Rölatif ışık ünitesi (RLU) olarak elde edilen luminesans değerler, özel bir yazılım programı yardımıyla (DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Germany) tümör hücrelerinin % büyüme inhibisyonları şekline dönüştürüldü.

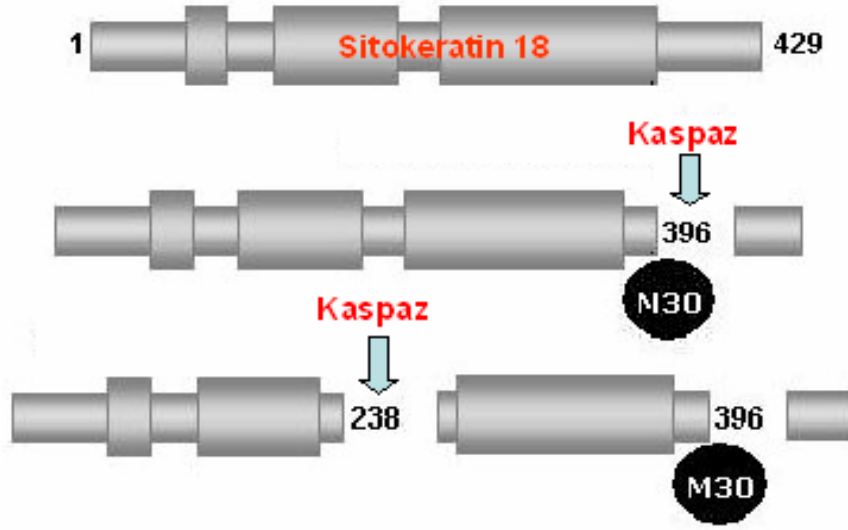
## M30 Antijen Metodu

Apoptosis esnasında hücre iskeletinin önemli bir proteini olan sitokeratin 18 (CK18) sadece apoptotik hücrelerde aktifleşen bir enzim grubu olan kaspazların etkisiyle kırılarak kırılmış CK18'i (CK18-Asp396)

oluşturmaktadır (147). M30 monoklonal antikor, özellikle CK18'in Asp396'da kırılan fragmanını (M30 antijen) tanıyarak CK'lerin apoptotik bir belirteç olarak kullanımını sağlamaktadır (Şekil-11) (148). Böylece apoptozise özgü bir belirteç olan kırılmış CK18 ELISA yöntemiyle saptanmaktadır. Bu özel CK18'i tanıyan M30 antikoru hücrelerin bulunduğu ortamla temas ettirilirse ve eğer ortamda apoptotik hücreler de varsa, apoptozisin varlığı gösterilmiş olur.

Apoptozise giden hücrelerde ortaya çıkan kaspazla kırılmış sitokeratin 18'in (M30 Antijen), ELISA yöntemiyle saptanması için 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kemoterapötikler ve ZYE tedavileri uygulandıktan sonra hücreler 5.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. 72 saat 37°C, % 5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakıldı

- ▶ Tedaviden 72 saat sonra tüm kuyucuklara Triton X 100 (%10 distile suda) (Sigma-Aldrich, ABD) 10 µl ilave edildi.
- ▶ 10 dakika oda sıcaklığında 600 rpm'de çalkalayıcıda (Heidolph Titramax 1000, Heidolph Instrumensts GmbH & Co.KG, Almanya) inkübasyona bırakıldı.
- ▶ Kuyucukların içeriği ependorflara toplandı.
- ▶ 2000 rpm'de 30 sn santrifuj (Minispın plus, Eppendorf, Almanya) edilip M30 Apoptosense ELISA (PEVİVA, İsveç) kit prospektüsüne uygun olarak çalışıldı.
- ▶ Süpernatantlar kitin içinden çıkan striplere 25 µl pipetlendi.
- ▶ Üzerlerine 75 µl "Horseradish peroxidase" (HRP) konjugat eklendi.
- ▶ 4 saat 600 rpm'de oda sıcaklığında inkübe edildi.
- ▶ 250 µl yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
- ▶ 200 µl TMB substratı ilave edildi. 20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi.
- ▶ Reaksiyonu durdurmak için 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 100 µl stop çözeltisi ilave edildi
- ▶ Oluşan renk şiddeti spektrofotometrik olarak 450 nm'de (FLASHScan S12, Analytik Jena AG, Almanya) okundu.
- ▶ Hesaplama standart eğri grafiği kullanılarak yapıldı.
  - Absorbanslar üniteye çevrilerek (U/L) M30 antijen değerleri belirlendi.



**Şekil-11:** Sitokeratin 18'in kaspazlar ile kırılması ve M30 antikorunun bu bölgeleri tanıması.

### Western Blotting

MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre soyları yeterli miktarda üretildikten sonra ilaç uygulaması için 75 cm<sup>2</sup>'lik flaslara ekim yapılır. Hücreler %70-80 doluluk oranına ulaştıklarında 1. flask kontrol, 2. flask ZYE (50 ug/ml), 3. flask epirubisin % 25 TİK, 4. flask epirubisin + ZYE (% 25 TİK+ 50 ug/ml), 5. flask dozetaksel % 25 TİK, 6. flask dozetaksol + ZYE (% 25 TİK+ 50 ug/ml) olmak üzere ilaç uygulanır. 37°C de % 5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 30 saatlik inkübasyon süresinin sonunda hücreler lize edilir.

#### Hücre lizisi:

- Flasklar etüvden çıkarıldıktan sonra flaslardaki mediumlar 50 ml'lik falkona toplanır.
- Falkonlar laminer akım kabininde buz üstünde bekletilir.
- Flasklara 10 ml soğuk PBS eklenir.
- “Scraper” ile hücreler kaldırılır, falkona aktarılır.
- 5 dakika +4<sup>0</sup>C'de 1000 g santrifüj yapılır.
- Süpernatantları atıldıktan sonra falkonlara 0.5 ml lizis solüsyonu eklenir.

Lizis solüsyonu hazırlanması: 3ml lizis buffer (RIPA lysis buffer, sc-24948 (Santa Cruz, ABD)) için 30 µl PMSF (200 mM), 30 µl sodyum ortovanadat (100 mM), 45 µl proteaz inhibitör kokteyl eklenir. Solüsyon karanlıkta hazırlanır ve eklenir.

-Falkonlar karanlıkta 30 dakika bekletilir ve 10 dakikada bir karıştırılır.

-Süre bitiminde 1.5 ml'lik ependorflara solüsyonlar aktarılır.

-10 dakika 10000 g de +4 °C'de santrifüj yapılır.

-Süpernatantlar tüplere aktarılır ve -20°C'de saklanır.

#### Protein miktarı tayini:

-QuantiPro™ BCA Assay kit kullanılır.

-1 mg/ml BSA (bovine serum albümin, Amresco, ABD) solüsyonu hazırlanır.

-Standart eğri grafiği hazırlamak için 96 kuyucuklu plate'e 100 µl BSA solüsyonu konularak distile su ile seri dilüsyon yapılır.

-Hazırlanan örneklerden 10 µl alıp üzerine 90 µl distile su koyulur.

-Kör için 100 µl distile su koyulur.

-Üzerlerine 200 µl çalışma solüsyonu eklenir.

Çalışma solüsyonu hazırlanması: 25 birim "QuantiPro™" tamponu, 25 birim "Quantipro BCA", 1 birim "copper(II) sulfat solution" karıştırılır.

-20 dakika 37°C'de inkübe edilir.

-Luminometrede 570 nm'de ölçüm yapılır.

-Sonuçlara göre standart eğri grafiği çizilir ve örneklerin protein miktarı belirlenir.

#### Elektroforez:

-Yükleme için örneklerden 30 µg protein olacak şekilde hazırlanır.

-Her bir örnek için hacimce % 65 örnekten, %25 NuPAGE LDS sample buffer (4x), % 10 NuPAGE reducing agent (10x) karıştırılır.

-NuPAGE Novex Bis-Tris hazır mini jel elektroforez tankına yerleştirilerek üzerine yaklaşık yarım litre NuPAGE MES running buffer ve 500 µl NuPAGE antioxidant eklenir.

-Proteinler 7 dakika 95 °C'de denatüre edilir.

-Örnekler ve marker (Amersham High Range Rainbow marker, ABD) jele yüklenir.

-45 dk 150 V elektroforez yapılır.

Membrana transfer:

-İnvitrogen iBlot™ Dry Blotting System kullanılır. Cihazla birlikte iBlot™ Gel Transfer Stacks, Regular (Nitrocellulose) kiti kullanılır.

-(20 Volt) 8 dakika boyunca transfer gerçekleştirilir.

-Burada, alttan üste doğru sandviç şeklinde bileşenler üst üste getirilir.

-Sırasıyla (alttan üste): bakır anot, nitroselüloz membran, jel, filtre kağıdı (ultrasaf su ile ıslatılır), bakır katot, sünger bulunur.

-Transferin ardından membranın sol üst köşesi kesilerek işaretlenir.

-Gece boyunca soğuk odada TBS-T içinde bekletilir.

TBS-T hazırlanması: %0.05 (v/v) Tween 20 TBS (tris HCl 24.23 gr, NaCl 80.06 gr 800 ml ultrasaf su ile tamamlanır. Saf HCl ile pH'ı 7.6 olduktan sonra Tween 20'den 5 ml eklenir ve ultrasaf su ile 1 litreye tamamlanır.

Deteksiyon:

-Invitrojen, Western Breeze Chemiluminescent Immunodetection System (WB7106) kiti (rabbit) kullanılır. Bloklama, yıkama, ikinci antikor ve substrat çözeltileri kitten kullanılır.

-2 defa 5 dk 50 ml distile su ile ön yıkama yapılır.

-30 dk 10 ml bloklama solüsyonda inkübasyona bırakılır.

-2 defa 5 dk 50 ml distile su ile yıkama yapılır.

-1 saat 10 ml primer antikor (PARP-Cell Signalling) ile inkübasyona bırakılır.

-4 defa 5'er dk 20 ml yıkama solüsyonu ile yıkama yapılır.

-30 dk 10 ml ikinci antikor ile inkübasyona bırakılır.

-4 defa 5'er dk 20 ml yıkama solüsyonu ile yıkama yapılır.

-3 defa 2 dk 20-50 ml distile su ile yıkama yapılır.

-Membranın suyu emdirildikten sonra üzerine 2.5 ml substrat solüsyonu dökülür ve karanlıkta 5 dk bekletilir.

-Görüntüleme cihazında (Fusion FX-7) deteksiyon yapılır.

-İşlemden sonra membran +4 °C'de TBS-T içinde saklanabilir.

-Kaspaz-3 (Cell signalling) için yapılacak deteksiyon için önce stripping yapılır.

Stripping: TBS-T dökülür üzerine 15 ml PIERCE stripping buffer eklenir.

- Alüminyum folyoyla kapatılarak 15 dk inkübasyona bırakılır.
- 3 defa 10 dk çalkalayıcıda TBS-T ile yıkama yapılır.
- Deteksiyon işlemi kaspaz-3 için tekrarlanır.
- Tekrar  $\beta$ -aktin için stripping yapılır.
- 30 dk %5 BSA (Amresco, ABD) (TBS-T içinde hazırlanır)
- Yıkama yapılır.
- Yıkama: 3 defa, 2 dakika TBS-T ile elde çalkalama  
10 dakika çalkalayıcı üzerinde TBS-T ile yıkama  
3 defa, 2 dakika TBS-T ile elde çalkalama  
10 dakika çalkalayıcı üzerinde TBS-T ile yıkama  
3 defa, 2 dakika TBS-T ile elde çalkalama
- Primer antikör TBS-T içinde hazırlanan %5 BSA içinde 1:200 dilüsyonda hazırlanır. (Santa Cruz  $\beta$ -aktin (Mouse))
- Yıkama yapılır.
- İkinci antikorda (Amershan RPN-2108 kitinden 1:5000 dilüsyonda hazırlanır) 1 saat inkübasyona bırakılır.
- Yıkama yapılır.
- “Amersham RPN-2108 ECL Western Blotting Analysis System” kitinden deteksiyon solüsyonu 1 ve 2’den 3’er ml karıştırılır ve membran üzerinde 5 dk karanlıkta bekletilir.
- Görüntüleme cihazında deteksiyon yapılır.

## **RT-PCR**

### **High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Almanya) Kullanılarak Hücre Kültürü Örneklerinden Total RNA İzolasyonu:**

1. 6 kuyucuklu platelere her kuyuda  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde 1 ml hücre süspansiyonu ekilir.
2. Hücrelerin üzerine 1 ml içinde uygulanacak olan ilaçlar eklenir. (ZYE 50  $\mu$ g/ml, epirubisin % 25 TİK, epirubisin % 25 TİK+ ZYE 50  $\mu$ g/ml)
3. 14 saatlik tedavi süresi sonunda, kontrol süpernatantları aspire edilir. Tedavi süpernatantları etiketli tüplere (buz içerisinde tutulan 15 mL’lik



tüpler) aktarılır. Aktarım sonrası tüm kuyular 1mL PBS içerisinde “scraper” ile kazınır ve tüplere toplanır. Kuyular 1 mL PBS ile tekrar yıkanır ve tekrar falkonlara toplanır.

Tüm bu aşamalar buz üzerinde gerçekleştirilir.

4. Hücreler 4°C’de 800 rpm 4 dk santrifüj edilir.

5. Santrifüjden çıkan tüplerin süpernatantları uzaklaştırıldı. Pellet 200 µL PBS ile süspansiyon haline getirilir.

6. 400 µL Lysis/Binding Buffer eklenir ve karıştırılır.

7. Örneği High Pure Filtre Tüpüne aktarmak için:

- Bir adet filtre tüp, “collection” tüpüne yerleştirilir
- Tüm örnek (maksimum 700 µL) filtre tüpe pipetlenir.

8. Filtre tüp 8000 g’de 15 saniye santrifüj edilir.

9. Santrifüj sonrası filtre tüp “collection” tüpten ayrılır, sıvı uzaklaştırılır ve tekrar filtre tüp ile “collection” tüp bir araya getirilir.

10. Her örnek için; 90 µL DNaz inkübasyon tamponu steril eppendorf tüpüne pipetlenir ve 10 µL DNaz I eklenir, karıştırılır ve hazırlanan bu karışım (100 µL solüsyon) filtre tüpe pipetlenir. +15 - +25°C’de 15 dk. inkübe edilir.

11. Filtre tüpe 500 µL yıkama tamponu I eklenir ve 8000 g’de 15 saniye santrifüj edilir. “Collection” tüpünde kalan sıvı uzaklaştırılır ve tekrar filtre tüp, “collection” tüpüne yerleştirilir.

12. Filtre tüpe 500 µL yıkama tamponu II eklenir ve 8000 g’de 15 saniye santrifüj edilir. “Collection” tüpünde kalan sıvı uzaklaştırılır ve tekrar filtre tüp, “collection” tüpüne yerleştirilir.

13. Filtre tüpe 200 µL yıkama tamponu II eklenir ve yıkama tamponu uzaklaştırmak için maksimum hızda (yaklaşık olarak 13.000 g) 2 dk. santrifüj edilir.

14. “Collection” tüp uzaklaştırılır ve filtre tüp, 1,5 mL temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir.

15. RNA eldesi için:

- Filtre tüpe 50 µL Elüsyon tamponu eklenir.
- Tüp 8000 g’de 2 dk. santrifüj edilir.

- Mikrosantrifüj tüp RNA içermektedir. Ya direkt olarak RT-PCR'da kullanılır ya da sonraki analizler için -80 °C'de saklanır.

### **Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Almanya)**

#### **Kullanılarak RNA'dan cDNA Sentezi**

- 1) Kullanımdan önce tüm solüsyonların çözülmesi beklenir ve kısa bir santrifüj yapılır. Tüm prosedür boyunca solüsyonlar buz üzerinde tutulmalıdır.
- 2) Steril DNAase RNAse free, PCR tüpleri buz üzerine konulur ve Template-Primer karışımı (1. karışım) tüp içerisinde hazırlanır.

**Tablo-1:** Template-primer karışım hazırlanması

Template-Primer Karışım (1 reaksiyon için)		
İçerik	Hacim	Final Konsantrasyonu
Total RNA	değişken	5 µg alınmalı (1pg = 1µg)
Random Heksamer Primer	2 µL	60 µM
Su, PCR saflıkta	değişken	Total hacmi 11.4 µL olacak şekilde değişir
Total hacim: 11.4 µL		

- 3) 65 °C'de 10 dk. programlı PCR'a konulur (RNA'da oluşabilecek ipler açılarak lineer halde getirilir). Program bitimine 1-2 sn kala tüpler alınır ve buz üzerine konarak hızla soğutulur.
- 4) PCR 1. Programı çalışırken 2. karışım hazırlanır.

**Tablo-2:** 2. karışım hazırlanması

2. karışım (RT karışım)	Hacim	Final Konsantrasyonu
Transkriptor High Fidelity Reverse Transkriptaz Reaksiyon Tamponu, 5x konsantrasyon	4µL	1x
Protector RNaz İnhibitörü, 40 U/µL	0.5 µL	20 U
Deoksinükleotid karışım, her biri için 10 mM	2µL	Her biri için 1 mM
DTT	1µL	5 mM
Transkriptor High Fidelity Reverse Transkriptaz	1.1µL	10U
Total Hacim: 8.6 µL		

- 5) Hazırlanan bu karışım, PCR'dan çıkan 1. karışım olan tüplerin üzerine eklenir, pipetaj yapılarak buz üstüne alınır.

6) Hazırlanan tüpler ikinci aşama için PCR'a konulur. (cDNA 2. Program)  
(29 °C'de 10 dk, 48 °C'de 60 dk ve denatürasyon için 85 °C'de 5 dk.)

7) Program bittikten sonra cDNA PCR'dan alınarak +4 °C'de bekletilebilir.

### **RealTime Ready Human Apoptosis Panel 96 (RT-PCR**

#### **Protokolü):**

1) RT-PCR karışım hazırlanır

**Tablo-3:** RT-PCR karışım hazırlanması

<b>İçerik</b>	<b>Hacim</b>	<b>Final Konsantrasyonu</b>
Su, PCR-safılıkta	480µL (528µL)	-
LightCycler 480 Probe Master, 2x konsantrasyon	960µL (1.056µL)	1x
Total hacim: 1.440µL (1.584µL)		

Bu karışım vorteks olmadan, pipetle karıştırılır. 15 µL bu karışımdan 96 kuyucuklu plate'in H12 kuyucuğuna konulur. Üzerine 5 µL RNA (untranscribed RNA) konulur (Transkripsiyon kontrolü için, negatif kontrol).

2) Toplam 60 µL cDNA elde edilir.

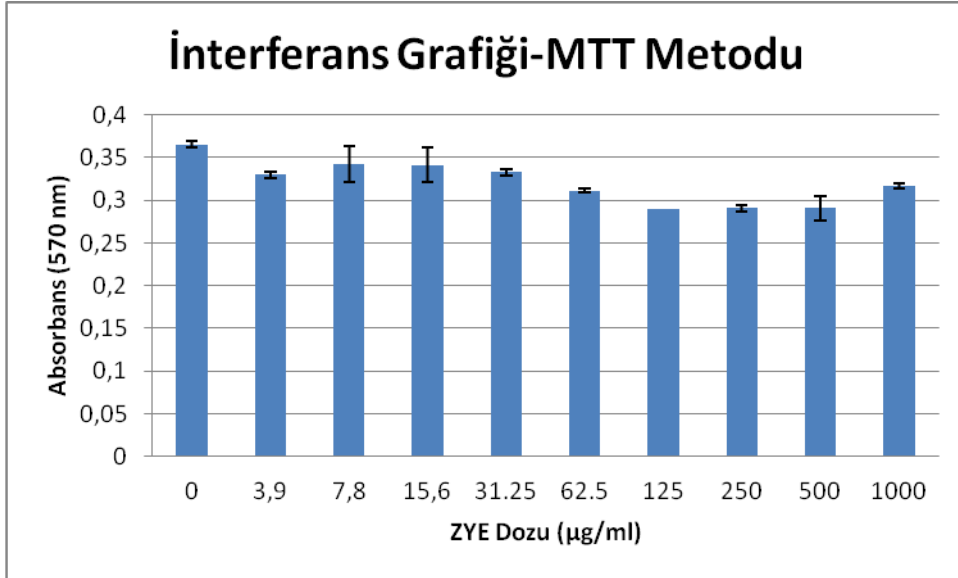
463 µL su + 1056 µL Prob Master + 60 µL cDNA karıştırılır ve her kuyucuğa (H12 hariç) 20 µL konulur. Üzeri buharlaşmaması için kapatılır ve kısa bir spin yapıldıktan sonra RT-PCR'a konulur.

### **İstatistiksel Analiz**

Çalışmanın analizleri SPSS 16.0 paket programında yapıldı. Sürekli değişkenler ortalama ve standart sapma ile verildi. Yüzde canlılık değerlerinin ilaç ve doz gruplarına göre karşılaştırmaları One Way Anova ve ilaç-doz etkileşiminin önemliliği eşleştirilmiş t testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırma testi olarak LSD testi kullanıldı. Çalışmada p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

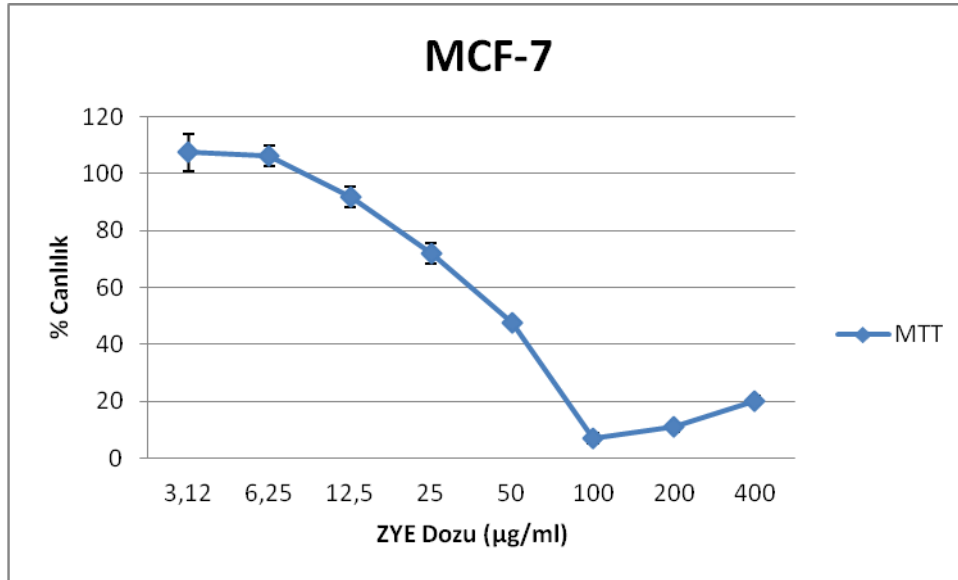
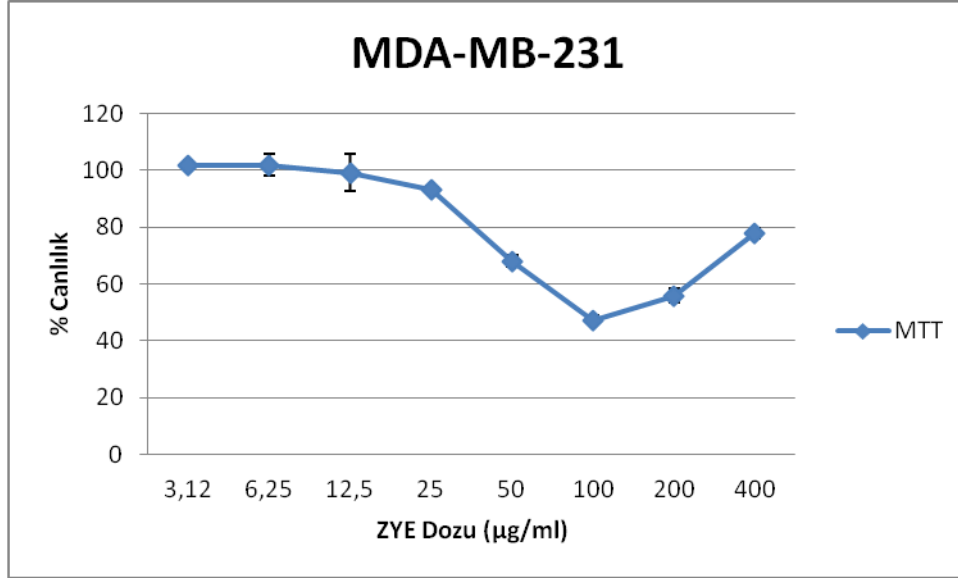
### 1. Zeytin Yapağı Ekstresinin MTT Metodu ile İnterferansının Değerlendirilmesi



**Şekil-12:** Hücresiz ortamda zeytin yapağı ekstresinin 0-1000 µg/ml dozları arasındaki MTT metoduyla saptanan absorbans değerleri

Sitotoksosite deneylerine başlamadan önce hücresiz ortamda ZYE'nin 0-1000 µg/ml dozlarında MTT metodu ile interferans gösterip göstermediğini saptamak için deney yapıldı. Çünkü interferans yalancı pozitif (yalancı canlılık) sonuçların alınmasına neden olmaktadır. İnterferans saptanmadığı için sitotoksosite deneylerine MTT metodu ile devam edildi.

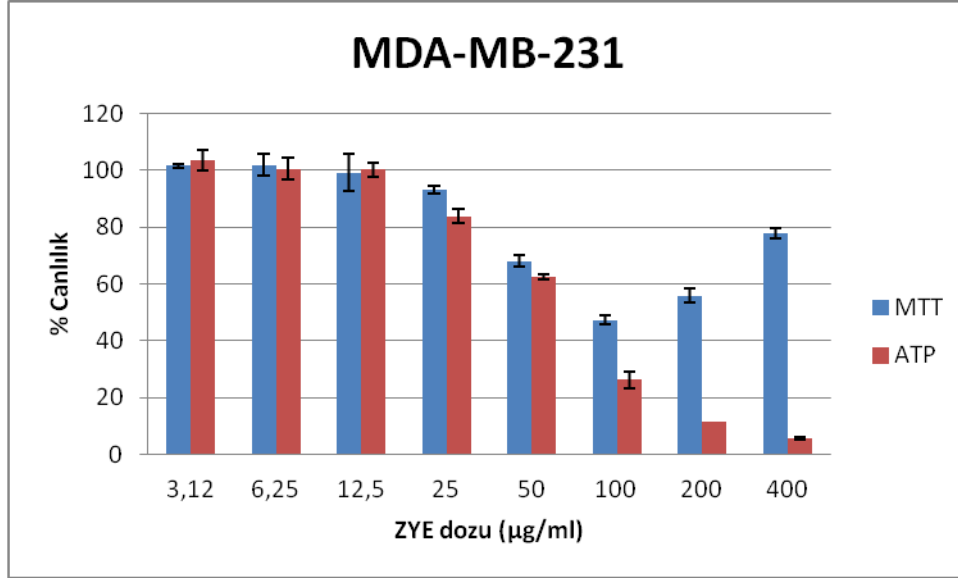
## 2. Sitotoksitenin Değerlendirilmesi (MTT Metodu)



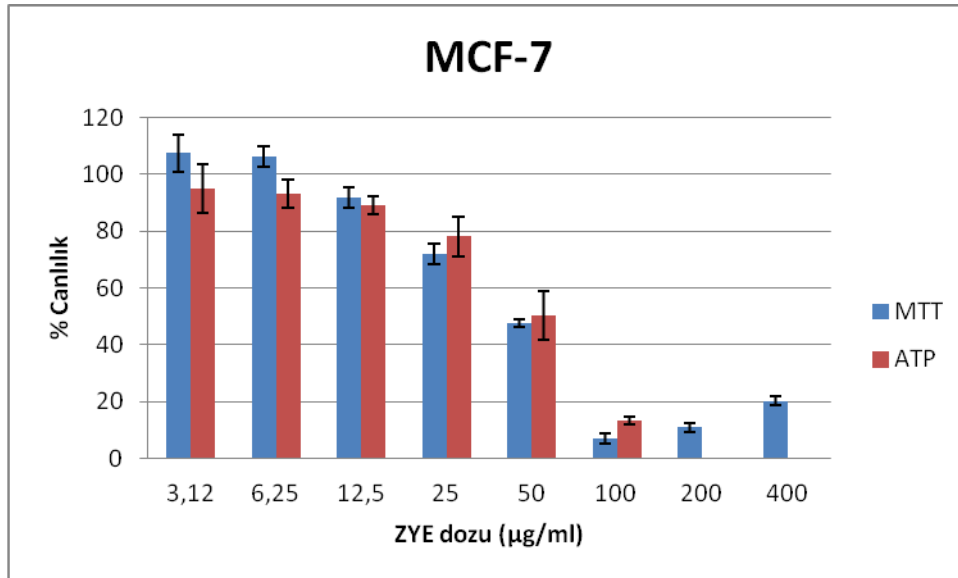
**Şekil-13:** MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre soylarında ZYE'nin 72 saatlik uygulama sonrası 3.12-400 µg/ml dozları arasındaki MTT metoduyla saptanan doz-% canlılık eğrisi

MTT metodunda ZYE'nin hücre ortamda interferans göstermediği halde hücreli ortamda yüksek dozlarının mikroskopik görüntülerinde ölüm gözlenmesine rağmen % canlılıkları olması gerekenden yüksek tespit edilmiştir. Bu nedenle yüksek dozlarda olası bir interferans riskine karşı sitotoksite deneylerine ATP metoduyla devam edilmiştir.

### 3. ATP ve MTT Metodlarının Karşılaştırılması



**Şekil-14:** ZYE'nin 72 saatlik uygulama sonrası MDA-MB-231 hücre soyundaki sitotoksitesinin MTT ve ATP metodları ile karşılaştırılması



**Şekil-15:** ZYE'nin 72 saatlik uygulama sonrası MCF-7 hücre soyundaki sitotoksitesinin MTT ve ATP metodları ile karşılaştırılması

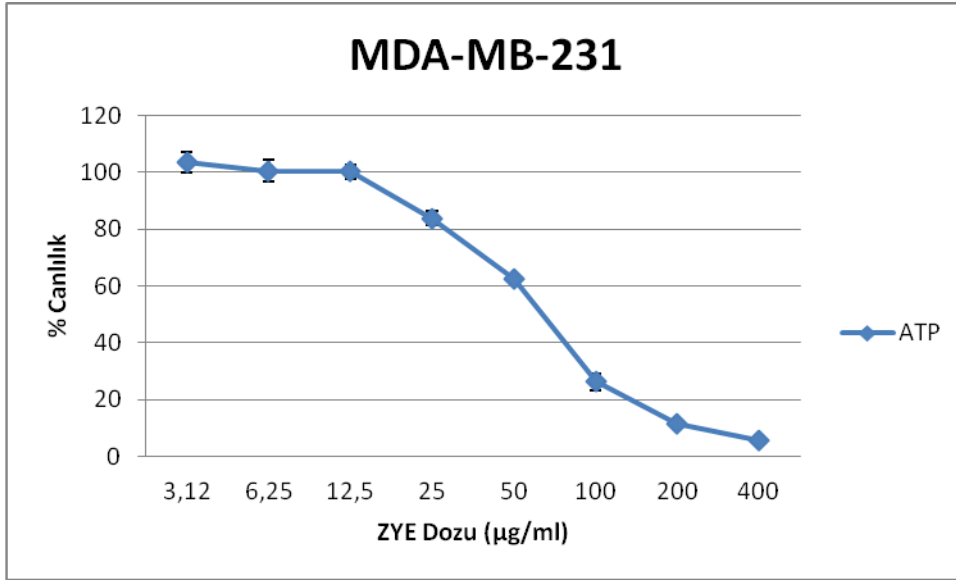
ZYE'nin 72 saatlik uygulama sonrası MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre soylarındaki sitotoksitesinin MTT ve ATP metodları ile karşılaştırılmıştır. ZYE'nin 200 ve 400 µg/ml dozlarında MTT metodunda canlılık saptanırken ATP metodunda ölüm olduğu görülmektedir. ATP metodu sonuçları mikroskop görüntülerini desteklediğinden MTT metoduna göre daha güvenilir

bulunmuştur. Fakat 100 µg/ml'nin altındaki dozlarda iki yöntem açısından fark olmadığı görülmektedir.

#### 4. Sitotoksitenin Değerlendirilmesi (ATP metodu)

##### 4.1. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Soyunda

##### 4.1.1. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinin Zeytin Yaprığı Ekstresine Verdiği Yanıt

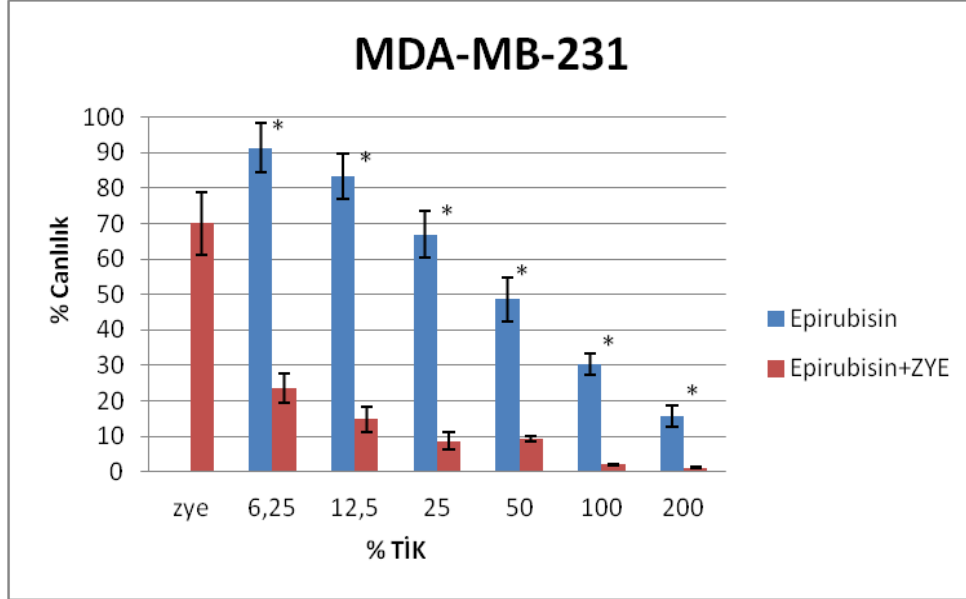


**Şekil-16:** MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde 72 saatlik ZYE uygulaması sonrası ATP metoduna göre doz-% canlılık eğrisi.

MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerine, çeşitli konsantrasyonlarda ZYE (0-400 µg/ml) tek başına uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık ATP metodu ile değerlendirildi. IC<sub>50</sub> (Hücre büyümesinin % 50'sini inhibe eden konsantrasyon) belirlendi. 25-400 µg/ml dozlarında kontrole göre anlamlı inhibisyonlar gözlemlendi (p<0.05).

Çalışmanın bundan sonraki deneylerinde yaklaşık IC<sub>50</sub> dozu olan 50 µg/ml ZYE, meme kanseri tedavisinde kullanılan epirubisin, doksorubisin ve dosetaksol ile kombine edilerek kullanıldı. Böylece ZYE ile ilaç kombinasyonlarının etkisi çalışıldı.

#### 4.1.2. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinin Epirubisin ve Zeytin Yaprağı Ekstresine Verdikleri Yanıt



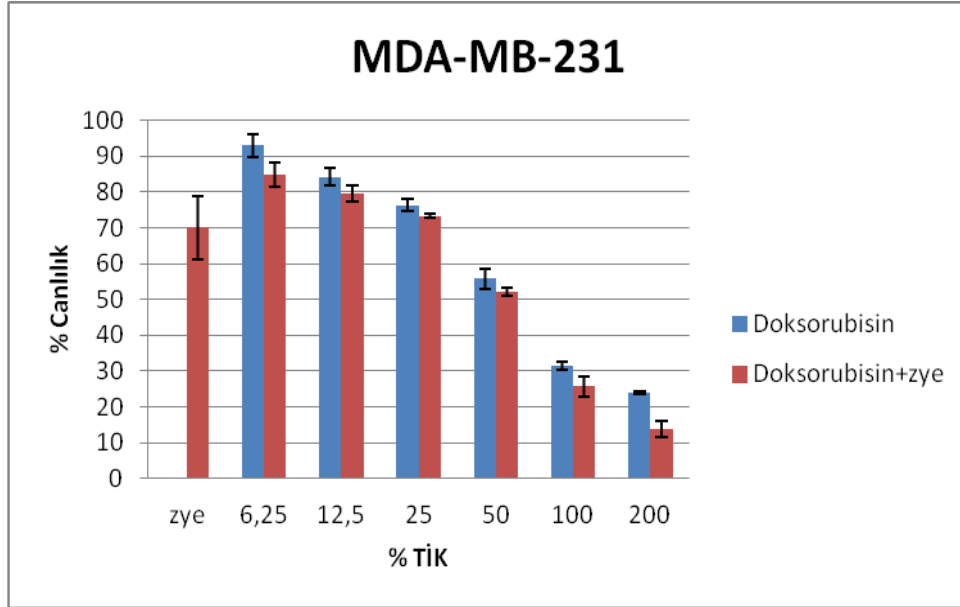
**Şekil-17:** MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerinde 72 saatlik epirubisin ve epirubisin +ZYE uygulaması sonrası ATP metoduna göre doz-% canlılık eğrisi. Test ilaç Konsantrasyon (TİK) değerleri (epirubisin): % 200 TİK: 1 µg/mL, % 100 TİK: 0,5 µg/mL, % 50 TİK: 0,25 µg/mL, % 25 TİK: 0,12 µg/mL, % 12.5 TİK: 0,06 µg/mL, % 6.25 TİK: 0.031 µg/mL, ZYE: 50 µg/mL.  
\*: p<0.05

MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerine çeşitli % TİK dozlarında, epirubisin (% 200, % 100, % 50, % 25, % 12.5, % 6.25 TİK) tek başına ve ZYE (50 µg/ml) ile kombinasyonları uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık MTT metodu ile değerlendirildi.

Epirubisin tek başına uygulanması ile epirubisin + ZYE kombinasyonları karşılaştırıldığında (Şekil-17) aralarındaki farklılık tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.05).



#### 4.1.3. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinin Doksorubisin ve Zeytin Yaprağı Ekstresine Verdikleri Yanıt

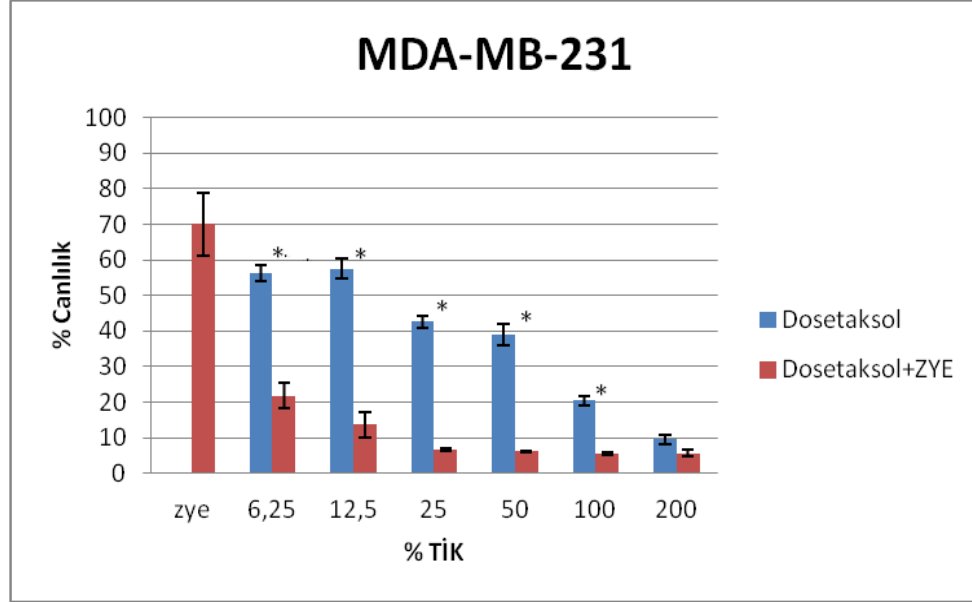


**Şekil-18:** MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerinde 72 saatlik doksorubisin ve doksorubisin +ZYE uygulaması sonrası ATP metoduna göre doz-% canlılık eğrisi. Test İlaç Konsantrasyon (TİK) değerleri (doksorubisin): % 200 TİK: 1 µg/mL, % 100 TİK: 0.5 µg/mL, % 50 TİK: 0.25 µg/mL, % 25 TİK: 0.12 µg/mL, % 12.5 TİK: 0.06 µg/mL, % 6.25 TİK: 0.031 µg/mL, ZYE: 50 µg/mL

MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerine çeşitli % TİK dozlarında, doksorubisin (% 200, % 100, % 50, % 25, % 12.5, % 6.25 TİK) tek başına ve ZYE (50 µg/ml) ile kombinasyonları uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık MTT metodu ile değerlendirildi.

Doksorubisin tek başına uygulanması ile doksorubisin + ZYE kombinasyonları karşılaştırıldığında sitotoksik etkiyi bir miktar arttırmış olmasına rağmen aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0.05$ ).

#### 4.1.4. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinin Dosetaksol ve Zeytin Yaprağı Ekstresine Verdikleri Yanıt



**Şekil-19:** MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerinde 72 saatlik dosetaksol ve dosetaksol +ZYE uygulaması sonrası ATP metoduna göre doz-% canlılık eğrisi. Test ilaç Konsantrasyon (TİK) değerleri (dosetaksol): % 200 TİK: 22.6 µg/mL, % 100 TİK: 11.3 µg/mL, % 50 TİK: 5.65 µg/mL, % 25 TİK: 2.8 µg/mL, % 12.5 TİK: 1.4 µg/mL, % 6.25 TİK: 0.7 µg/mL, ZYE: 50 µg/mL \*: p<0.05

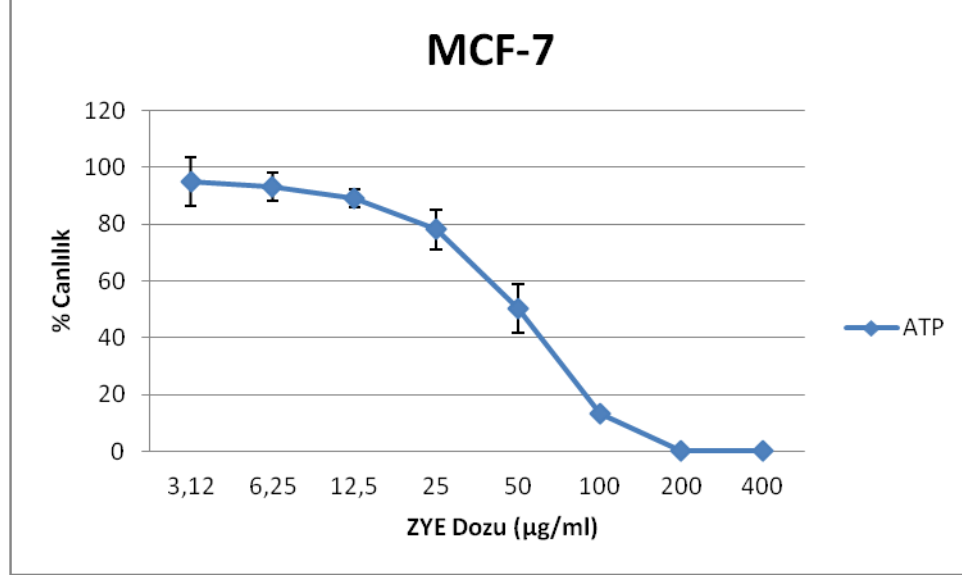
MDA-MB-231 İnsan meme kanseri hücrelerine çeşitli % TİK dozlarında, dosetaksol (% 200, % 100, % 50, % 25, % 12.5, % 6.25 TİK) tek başına ve ZYE (50 µg/ml) ile kombinasyonları uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık MTT metodu ile değerlendirildi.

Dosetaksol tek başına uygulanması ile dosetaksol + ZYE kombinasyonları karşılaştırıldığında % 200 TİK dozu hariç aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.05 ). % 200 TİK dozunda farklılık bulunmaması her iki durumda da maksimum hücre ölümü gerçekleşmiş olmasına bağlandı.

## 4.2. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Soyunda

### 4.2.1. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinin Zeytin Yapağı

#### Ekstresine Verdiği Yanıt

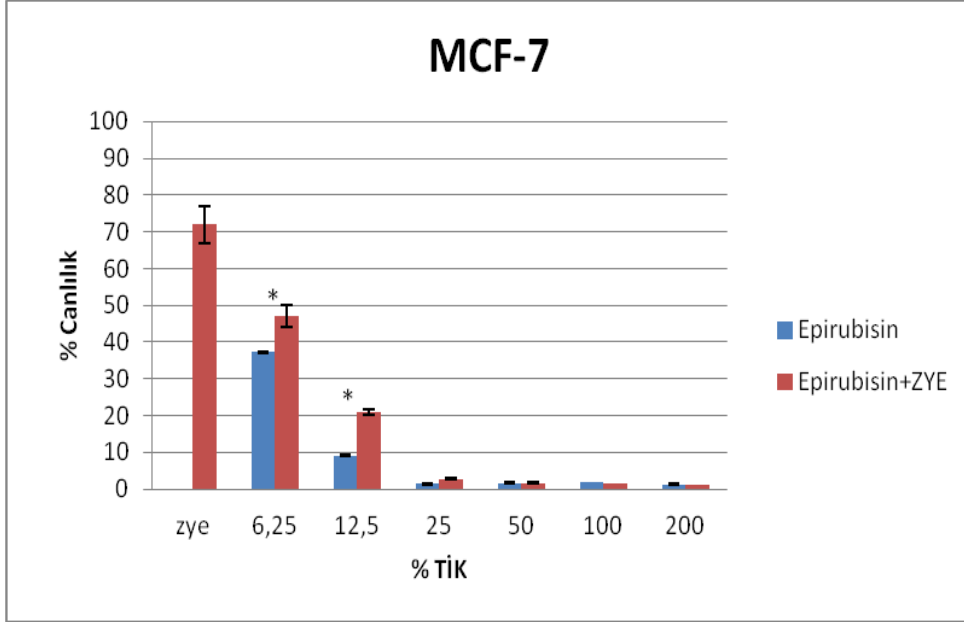


**Şekil-20:** MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde 72 saatlik ZYE uygulaması sonrası ATP metoduna göre doz-% canlılık eğrisi.

MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine, çeşitli konsantrasyonlarda ZYE (0-400 µg/ml) tek başına uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık ATP metodu ile değerlendirildi. IC<sub>50</sub> (Hücre büyümesinin % 50'sini inhibe eden konsantrasyon) belirlendi. 12.5-400 µg/ml dozlarında kontrole göre anlamlı inhibisyonlar saptandı (p<0.05).

Çalışmanın bundan sonraki deneylerinde yaklaşık IC<sub>50</sub> dozu olan 50 µg/ml ZYE, meme kanseri tedavisinde kullanılan epirubisin, doksorubisin ve dosetaksol ile kombine edilerek kullanıldı.

#### 4.2.2. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinin Epirubisin ve Zeytin Yaprağı Ekstresine Verdikleri Yanıt

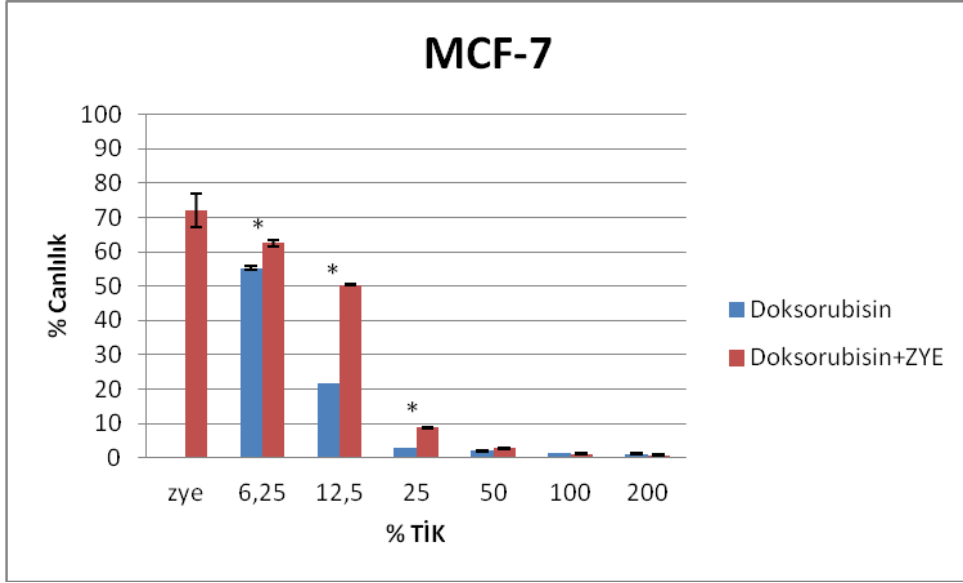


**Şekil-21:** MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde 72 saatlik epirubisin ve epirubisin +ZYE uygulaması sonrası ATP metoduna göre doz-% canlılık eğrisi. Test ilaç Konsantrasyon (TİK) değerleri (epirubisin): % 200 TİK: 1 µg/mL, % 100 TİK: 0.5 µg/mL, % 50 TİK: 0.25 µg/mL, % 25 TİK: 0.12 µg/mL, % 12.5 TİK: 0.06 µg/mL, % 6.25 TİK: 0.031 µg/mL, ZYE: 50 µg/mL, \*: p<0.05

MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine çeşitli % TİK dozlarında, epirubisin (% 200, % 100, % 50, % 25, % 12.5, % 6.25 TİK) tek başına ve ZYE (50 µg/ml) ile kombinasyonları uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık MTT metodu ile değerlendirildi.

Epirubisin tek başına uygulanması ile epirubisin + ZYE kombinasyonları karşılaştırıldığında % 6.25 - % 12.5 TİK dozlarının aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmakla beraber (p<0.05) epirubisin + ZYE kombinasyonunun % canlılığı MDA-MB-231'dekininki tam tersine arttırdığı görüldü. Diğer dozlarda her iki durumda da zaten maksimum ölüm gerçekleştiğinden aralarında fark gözlenmemiştir.

#### 4.2.3. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinin Doksorubisin ve Zeytin Yaprağı Ekstresine Verdikleri Yanıt

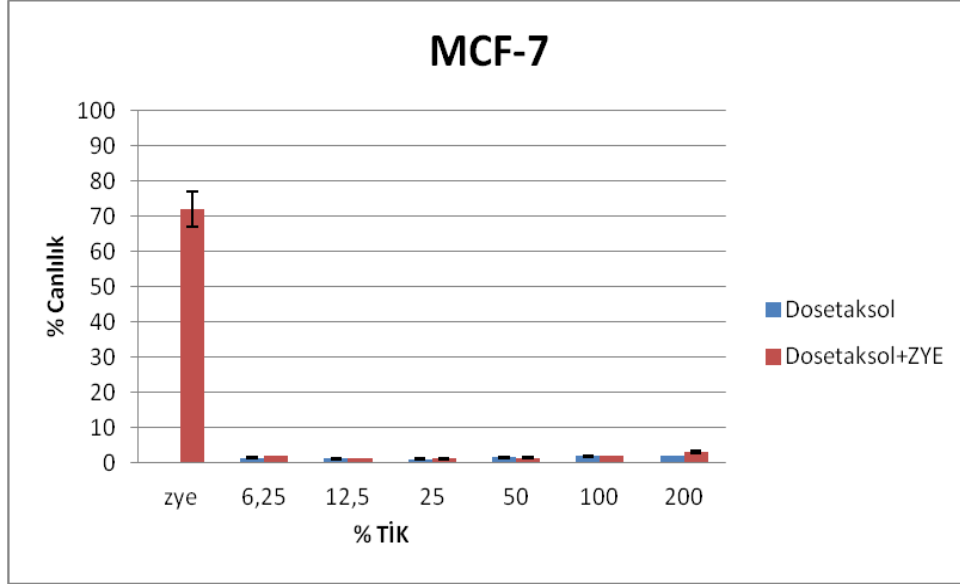


**Şekil-22:** MCF-7 insan meme kanser hücrelerinde 72 saatlik doksorubisin ve doksorubisin + ZYE uygulaması sonrası ATP metoduna göre doz-% canlılık eğrisi. Test ilaç Konsantrasyon (TİK) değerleri (doksorubisin): % 200 TİK: 1 µg/mL, % 100 TİK: 0.5 µg/mL, % 50 TİK: 0.25 µg/mL, % 25 TİK: 0.12 µg/mL, % 12.5 TİK: 0.06 µg/mL, % 6.25 TİK: 0.031 µg/mL, ZYE: 50 µg/mL, \*: p<0.05

MCF-7 İnsan meme kanseri hücrelerine çeşitli % TİK dozlarında, doksorubisin (% 200, % 100, % 50, % 25, % 12.5, % 6.25 TİK) tek başına ve ZYE (50 µg/ml) ile kombinasyonları uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık MTT metodu ile değerlendirildi.

Doksorubisin tek başına uygulanması ile doksorubisin + ZYE kombinasyonları karşılaştırıldığında % 6.25 - % 12.5 - % 25 TİK dozlarında doksorubisin + ZYE kombinasyonunun % canlılığı epirubisinde olduğu gibi arttırdığı görüldü (p<0.05).

#### 4.2.4. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinin Doksetaksol ve Zeytin Yaprağı Ekstresine Verdikleri Yanıt



**Şekil-23:** MCF-7 insan meme kanser hücrelerinde 72 saatlik dosetaksol ve dosetaksol + ZYE uygulaması sonrası ATP metoduna göre doz-% canlılık eğrisi. Test İlaç Konsantrasyonu (TİK) değerleri (dosetaksol): % 200 TİK: 22.6 µg/mL, % 100 TİK: 11.3 µg/mL, % 50 TİK: 5.6 µg/mL, % 25 TİK: 2.8 µg/mL, % 12.5 TİK: 1.4 µg/mL, % 6.25 TİK: 0.7 µg/mL, ZYE: 50 µg/mL

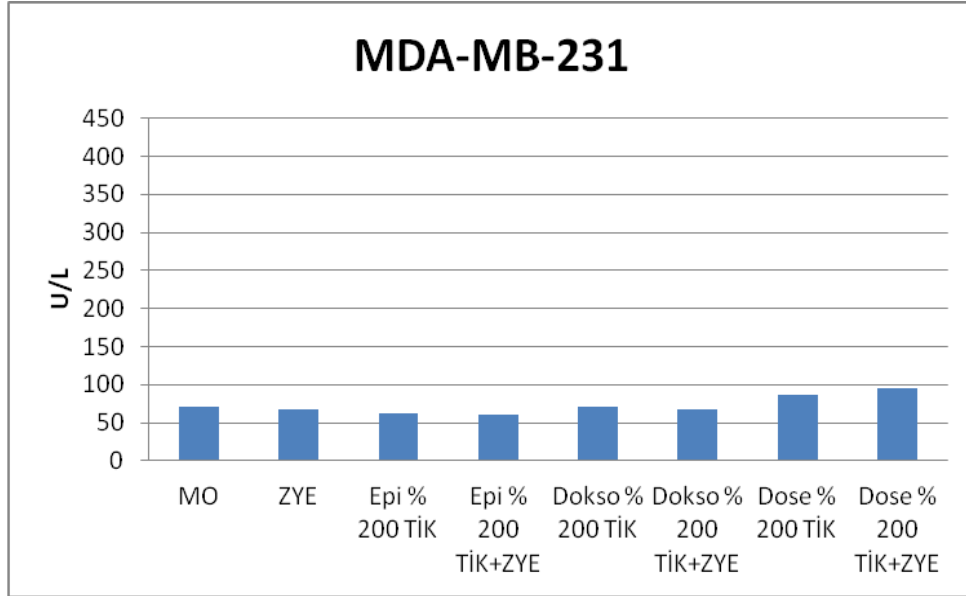
MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine çeşitli % TİK dozlarında, dosetaksol (% 200, % 100, % 50, % 25, % 12.5, % 6.25 TİK) tek başına ve ZYE (50 µg/ml) ile kombinasyonları uygulandı. Uygulanan tedaviden 72 saat sonra % canlılık MTT metodu ile değerlendirildi.

Doksetaksol tek başına uygulanması ile dosetaksol + ZYE kombinasyonları karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p > 0.05$ ). Bunun nedeni uygulanan tüm dozlarda ve gruplarda zaten maksimum hücre ölümünün gerçekleşmiş olmasıdır.

Buraya kadar, sonuç olarak ilaçların ZYE ile kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde ölüm oranını daha da arttırır iken MCF-7 hücrelerinde tam tersine ölümden koruyucu etki gösterdiği bulundu.

## 5.M30 Antijen Metoduyla Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi

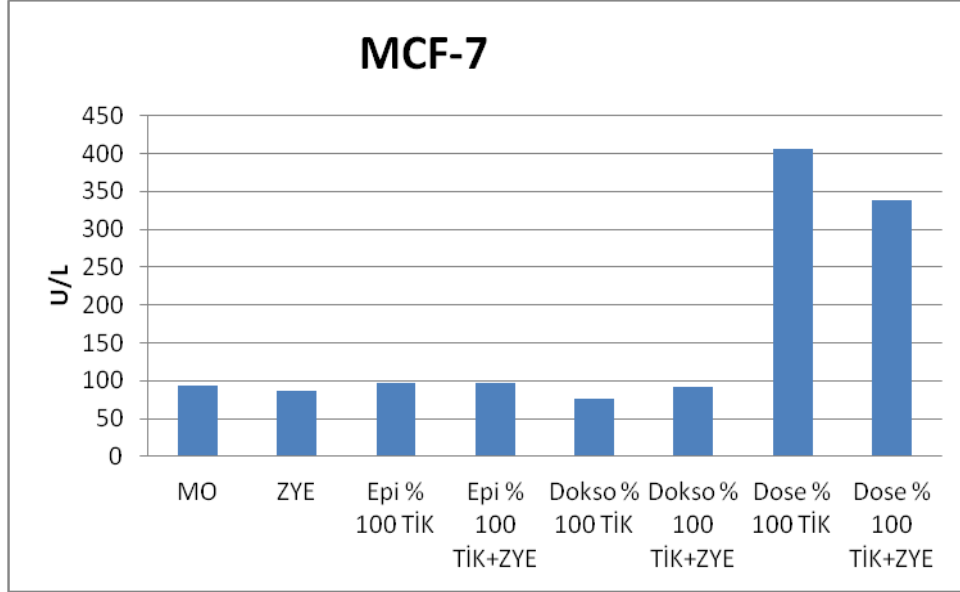
### 5.1.MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Soyunda Epirubisin, Doksorubisin, Dose, ve Zeytin Yaprığı Ekstresi Uygulaması



**Şekil-24:** MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde 72 saatlik epirubisin, doksorubisin, dose, ve ZYE uygulaması sonrası kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30 Antijen) düzeyleri. MO: yaşam için pozitif kontrol, ZYE: Zeytin yaprağı ekstresi 50 µg/ml, Epi % 200 TİK: Epirubisin % 200 TİK: 1 µg/mL, Dokso % 200 TİK: Doksorubisin % 200 TİK: 1 µg/mL, Dose % 200 TİK: Dose % 200 TİK: 22.6 µg/mL

Şekil-24'te görüldüğü gibi kullanılan hiçbir dozda veya ilaçta MO (kontrol) grubuna göre anlamlı M30 artışı izlenmedi. Oysa, bu dozlarda hücre ölümü mikroskopik değerlendirmede net olarak görülmekteydi. Bu bulgu, ölümün apoptozis ile değil nekrozis ile gerçekleştiğini düşündürmektedir.

## 5.2. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Soyunda Epirubisin, Doksorubisin, Doksetakso ve Zeytin Yaprağı Ekstresi Uygulaması

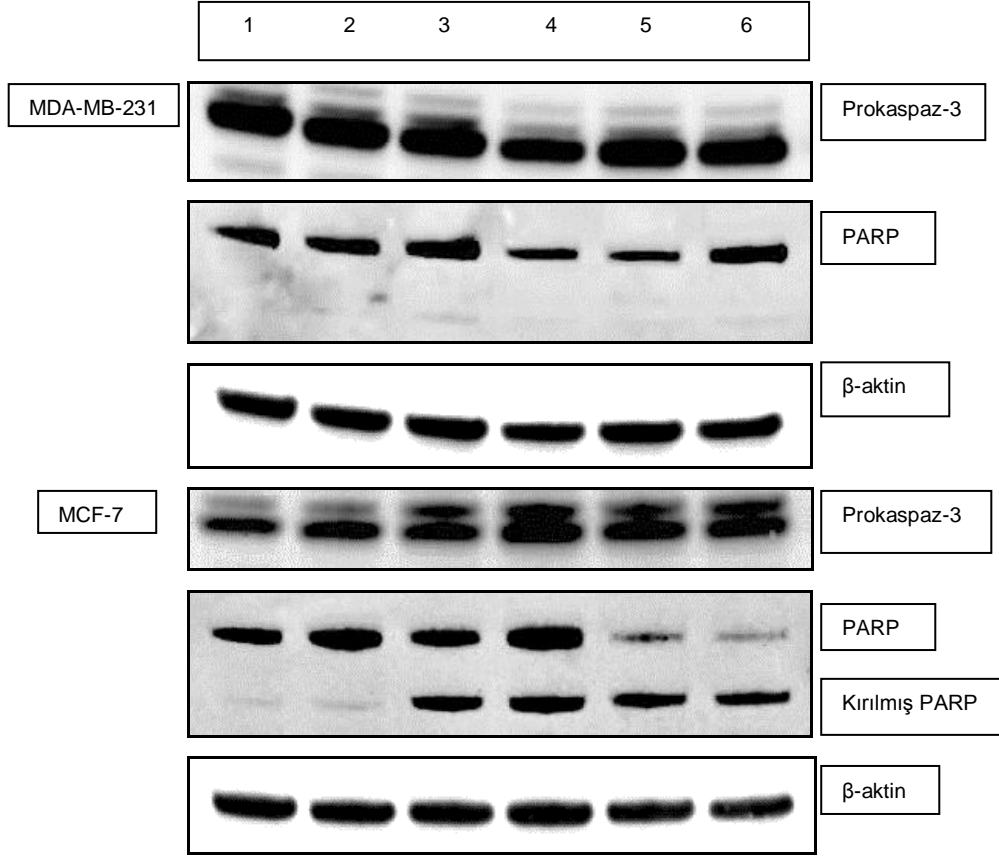


**Şekil-25:** MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde 72 saatlik epirubisin, doksorubisin, dosetakso ve zeytin yaprağı ekstresi uygulaması sonrası kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30 Antijen) düzeyleri. MO: Maksimum yaşam, ZYE: Zeytin yaprağı ekstresi 50 µg/ml, Epi % 100 TİK: Epirubisin % 100 TİK: 1 µg/mL, Dokso % 100 TİK: Doksorubisin % 100 TİK: 1 µg/mL, Dose % 100 TİK: Doksetakso % 100 TİK: 22.6 µg/mL

% 100 TİK dosetakso (%337.8) ve % 100 TİK dosetakso +ZYE kombinasyonunda (%265) M30 antijen artışı tespit edilmiştir.



## 6. Western Blotting Sonuçları

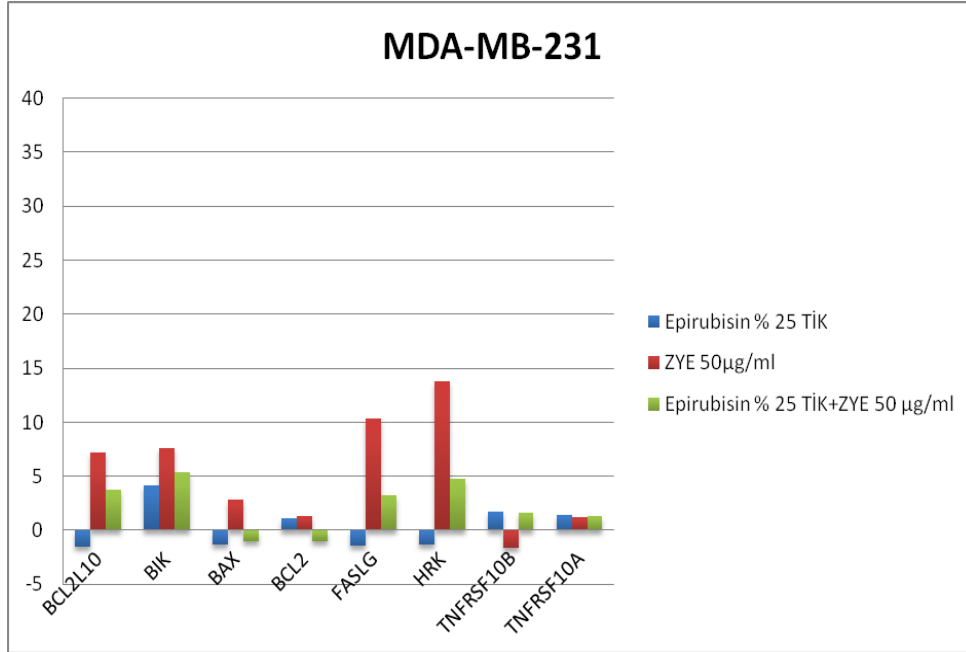


**Şekil-26:** 30 saatlik ilaç uygulaması sonrası western blot yöntemiyle PARP, kaspaz-3 ve β-aktin tayini. 1 – Kontrol, 2 – ZYE (50 ug/ml), 3 – Epirubisin % 25 TİK, 4 – Epirubisin + ZYE (% 25 TİK+ 50 ug/ml), 5 – Dosetaksel % 25 TİK, 6 – Dosetaksel + ZYE (% 25 TİK+ 50 ug/ml), PARP – 116 kDa, kırılmış PARP – 89 kDa, Prokaspaz-3 – 35 kDa

Hücre ölümlerinin apoptozis ile olup olmadığının kontrolü western blot ile PARP kırılması metoduyla çalışıldı. Buna göre, MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre soylarında 30 saatlik ilaç uygulaması sonrası Western blot yöntemiyle PARP kırılması değerlendirildi. MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol, epirubisin, ZYE ve epirubisin + ZYE gruplarında PARP kırılması izlenmemiştir. Bu da MDA-MB-231 hücrelerinin apoptozis ile ölmediğini göstermektedir. MCF-7 hücrelerinde kontrolde ve ZYE uygulaması sonrasında PARP kırılması gözlenmezken, epirubisin ve dosetakselün hem tek başlarına hem de ZYE ile kombinasyonlarında PARP kırılması gözlenmiştir. Bu da MCF-7’de hücre ölümlerinin apoptozis ile gerçekleştiğini göstermektedir.

## 7.Real Time PCR Sonuçları

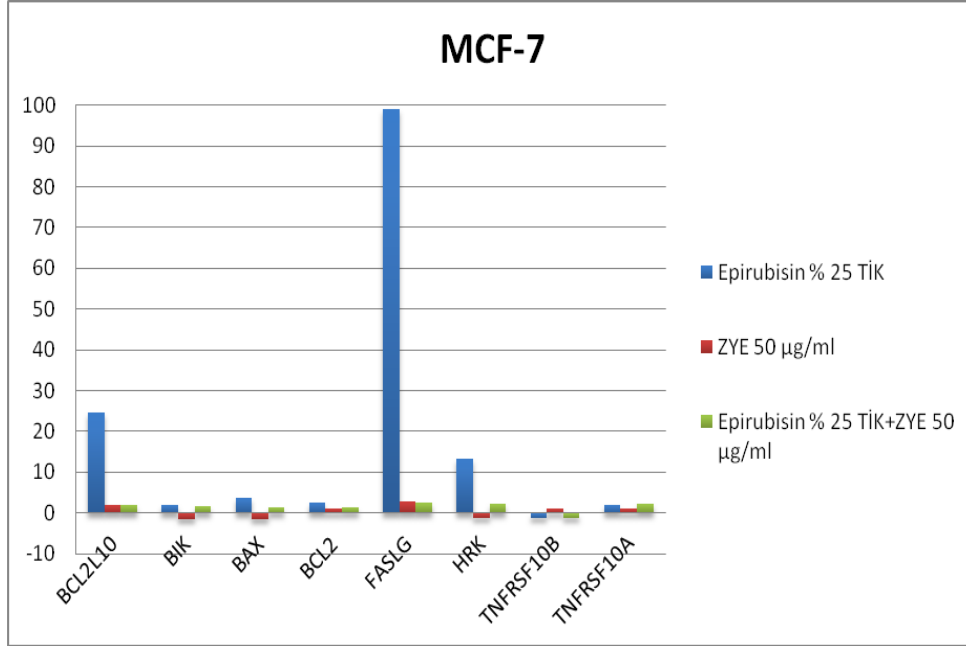
### 7.1. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Soyunda



**Şekil-27:** MDA-MB-231 hücre soyunda 14 saatlik ilaç uygulaması sonrası RT-PCR sonuçları

Gen ekspresyonlarında 3 kattan fazla artışlar, anlamlı artış olarak kabul edilmiştir. ZYE ile anlamlı artışlar sırası ile HRK (proapoptotik), FASLG (proapoptotik), BIK (proapoptotik) ve BCL2L10 (antiapoptotik) gen ekspresyonlarında görülmüştür. Epirubisin ile ZYE kombinasyonunda bu artışların gerilediği saptanmıştır (Şekil-27).

## 7.2. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Soyunda



**Şekil-28:** MCF-7 hücre soyunda 14 saatlik ilaç uygulaması sonrası RT-PCR sonuçları

Epirubisin ile anlamlı artışlar sırası ile FASLG (proapoptotik), BCL2L10 (antiapoptotik), HRK (proapoptotik) ve BAX (proapoptotik) gen ekspresyonlarında görülmüştür. Epirubisin ile ZYE kombinasyonunda gen ekspresyonlarında anlamlı artışlar saptanmamıştır. Üstelik epirubisinin tek başına FASLG'da yarattığı aşırı artışın, kombinasyon halinde dramatik azaldığı görülmektedir. Bu azalma ZYE'nin MCF-7 hücrelerinde sitotoksiteyi azaltıcı etkisi (Şekil-21 ve 22) ile uyumlu bulunmuştur.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Akdeniz diyeti sebze, meyve ve balık açısından zengin, sağlıklı bir diyet modeli olarak bildirilmiştir. Bu diyetle ağırlıklı olarak zeytinyağı tüketimi doymuş yağ asitlerinden fakir, tekli doymamış yağ asitlerinden zengin bir içerik sunar.(149,150) Biyoaktif fitokimyasallardan zengin içeriğiyle yüksek koruyucu potansiyel gösterir ve epidemiyolojik çalışmalar kardiyovasküler hastalıklar ve kansere karşı koruyucu etkisi olduğuna dair kanıtlar sunmaktadır.(151,152) Epidemiyolojik çalışmalar Akdeniz diyeti tüketen kişilerde bazı kanser tiplerinin özellikle meme, deri ve kolon kanserinin diğer populasyonlardan daha düşük insidansı olduğunu göstermektedir (153). Zeytin yaprağı ekstrelerinin antikanser, antioksidatif, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal aktiviteleri olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (154-157). Polifenollerin özellikle oleuropeinin doğal kaynağı olan zeytin yaprağı ekstreleri sağlık için potansiyel faydalı kabul edilmektedir. Ayrıca zeytin yaprağı ve sızma zeytinyağından gelen fenolik karışımın ana bileşeni olarak kullanılan OL'in bazı meme kanseri hücre hatlarına (MCF-7, SKBR3) karşı antiproliferatif etkileri gösterilmiştir (135,145,158,169). Antioksidan olarak polifenoller, hücreleri oksidatif hasara karşı korur ve son derece etkili kemopreventif ajanlar gibi hareket ederler (160-162). OL zeytindeki en fazla fenolik bileşik olarak kanser hücrelerinin büyümesini, motilitesini ve invazivliğini inhibe eder (129). OL direkt antitümör etkiler yapar ve kanser gelişiminin çeşitli aşamalarında etkili yeni bir sınıf anti-kanser bileşik olarak düşünülmektedir (129). Fenollerin farklı hücre içi etkileşimlerle tümör hücrelerinde apoptozis indüksiyonu ve proliferasyon inhibisyonu yaparak kanser hücresi gelişimini yavaşlatması mümkündür (162).

Bizim çalışmamızda MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre soyları kullanılarak ZYE ve meme kanseri kemoterapisinde kullanılan epirubisin, doksorubisin ve dosetaksol ile kombinasyonlarının sitotoksik etkileri değerlendirildi. Yaptığımız literatür taramasında ZYE'nin kemoterapi ilaçları ile kombinasyon çalışmasına rastlamadık.

Jaouad ve ark.'nın (163) yaptıkları bir çalışmada HL60 (İnsan promiyelositik lösemi hücreleri) hücrelerine 72 saat süreyle ZYE, OL ve luteolin ile tedavi uygulanmış ve trifan mavisi canlılık testi ile konsantrasyon bağımlı olarak tümör hücre canlılığının azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada OL IC<sub>50</sub> dozu 170 µM bulunmuştur. DNA fragmentasyon deneyi ile hücre ölüm tipine baktıklarında OL (40-640 µM) ile tipik bir DNA fragmentasyonu gözlenmemiştir. Hücreler DNA degradasyonu olmadan da apoptotik uyarı sonucu ölebilirler. Akridin orange ve etidyum bromid boyamasında her üç kimyasalın da apoptozis yoluyla etki ettikleri gösterilmiştir.

Stefania ve ark.'nın (164) T-47D ve MCF-7 insan meme kanseri hücre soylarında OL ve asetillenmiş türevleri ile yaptıkları bir çalışmada T-47D hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrası trifan mavisi canlılık testi ile doz bağımlı (1-100 µM) hücre proliferasyonunun inhibisyonu gözlenmiştir. MCF-7 hücrelerinde OL etkisi görülmezken sadece asetillenmiş türevlerinin inhibisyon etkisi gözlenmiştir. Bu çalışmada OL'in asetillenmiş türevlerinin serbest haline göre, meme kanseri hücre proliferasyonu inhibisyonu ve antioksidan olarak daha güçlü etki gösterdikleri saptanmıştır. Akım sitometri ile yapılan hücre siklusu analizlerinde T-47D hücrelerinde OL ve asetillenmiş türevlerinin G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazında minimal blok yaptıkları, MCF-7 hücrelerinde ise sadece 2 asetillenmiş türevinin G<sub>2</sub>/M fazında blok yaptıkları gösterilmiştir (72 saat 100 µM).

SW-620 insan kolon adenokarsinoma hücre soyunda MTT metoduyla 10 µM dozdan itibaren OL'in 72 saatlik tedavisinde antiproliferatif etkisi bulunmuştur (165). HT-29 hücre dizisinde ise 72 saatlik OL tedavisi sonrası antiproliferatif etki saptanmamıştır. Bu farklılığı SW-620 hücrelerinin K-ras mutasyonu olmasına (166) böylece apoptozis indüksiyonuna hassas olmasına bağlamışlardır (165).

Zouhaier ve ark.'nın (167) MCF-7 insan meme kanseri hücre soyunda yaptıkları bir çalışmada ZYE'nin hücreleri doz bağımlı bir şekilde inhibe ettiği nötral kırmızı birikim testi ve MTT metoduyla gösterilmiştir. ZYE'nin insan meme adenokarsinoma hücrelerini G1 fazında durdurduğu hücre siklusu analizi ile saptanmıştır (48 saat 2000-2400-2800 µg/ml). 'Western blotting'

analizlerinde 2200 µg/ml ZYE'nin 48 saat sonrasında siklin D1 ekspresyonunda azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Bu azalmış ekspresyon (peptidil-prolil izomeraz) Pin1'in azalmasının sonucu olduğunu belirtmişlerdir. Pin1'in siklin D1 ekspresyonunu transkripsiyon faktör c-jun aracılığıyla kontrol ettiği ve c-jun ekspresyonunun ZYE tedavisi sonrası arttığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda ZYE'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre soylarında ATP metoduyla doz bağımlı olarak tümör hücre canlılığını azalttığını tespit ettik. MDA-MB-231 hücre soyunda epirubisin ve dosetaksolün tek başlarına kullanımı ile ZYE ile kombinasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ( $p<0.05$ ). Bu durum kemoterapötik ilaçların istenmeyen yan etkilerinden korunmada önemli olabilir. Çünkü düşük dozların ZYE ile kombinasyonunun etkili sitotoksik yanıtlara neden olduğu görüldü. Özellikle MDA-MB-231 hücre soyunun invaziv karakterli olduğu göz önüne alındığında bu önem daha da artmaktadır. Fakat MDA-MB-231'deki etkiye zıt olarak MCF-7 hücrelerinde ZYE ile kombinasyon tedavisinin tümör hücre canlılığını arttırdığını tespit ettik. ZYE'nin, MCF-7 hücrelerinde epirubisin ile kombine edildiğinde epirubisinin etkinliğini azalttığı görüldü. ZYE'nin bu etkisi gen ekspresyonu çalışmasında da doğrulanmıştır. Nitekim epirubisin ile 100 kat artan FasLG ekspresyonu (apoptosis artışı), ZYE ile kombine edilmesi halinde dramatik azalmıştır.

ZYE'nin her iki hücre soyunda sitotoksik etki göstermesine rağmen yaptığımız M30 antijen deneyinde apoptosis belirteci olan M30 düzeylerini arttırmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar da sitotoksik etkinin apoptozisten değil nekrozisten kaynaklandığını düşündürmektedir. Nitekim Western blot analizlerinde ne MCF-7 ne de MDA-MB-231 hücrelerinde diğer bir apoptosis belirteci olan kırılmış PARP gözlenmedi. Böylece ZYE'nin tek başına etkisinin nekrosis ile gerçekleşmekte olduğunu düşünmekteyiz. MDA-MB-231 hücrelerinde epirubisin ve dosetaksolün tek başlarına ve ZYE ile kombinasyonlarında kırılmış PARP gözlendi. Bu bulgu epirubisin ve dosetaksolün apoptozis ile ölüme yol açtığını göstermektedir. Ayrıca her iki hücre soyunda da prokaspaz-3 tespit edilmesine rağmen diğer bir apoptozis

belirteci olan aktif kaspaz-3'e rastlanmadı. MCF-7 hücrelerinde normalde kaspaz-3 eksikliği olduğu bilinmektedir (168). Bununla birlikte birçok araştırmada da MCF-7 hücrelerinde kaspaz-3 varlığı gösterilmiştir (169-177). O yüzden bu bulgu MCF-7 için sürpriz olmamıştır. Fakat MDA-MB-231'de bulunmamış olması ölümlerin nekrotik karakterde olduğunu göstermektedir. Nitekim MDA-MB-231'de PARP kırılması da gözlenmemiştir. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında ZYE'nin hücreleri MDA-MB-231'de apoptozis ile öldürmediğini göstermektedir. Muhtemelen ölüm nekrozis ile gerçekleşmektedir. RT-PCR sonuçlarına bakıldığında MDA-MB-231 hücrelerinde 14 saatlik ilaç uygulaması sonrası ZYE ile antiapoptotik olan BCL2L10, proapoptotik olan BIK, FASLG ve HRK genlerinde artış olduğu saptandı. Fakat bu artış miktarları muhtemelen apoptozis için yeterli olmadı. Yani biyolojik bir anlamlılık ifade etmemektedir. MCF-7 hücrelerinde de apoptozis ile uyumlu bir gen ekspresyon artışına rastlanmadı. Gen düzeyindeki bu bulgular da ayrıca MCF-7 hücrelerinde ZYE'nin neden olduğu ölüm modunun apoptozis ile gerçekleşmediğini doğrulamaktadır. Epirubisin ile anlamlı artışlar sırası ile FASLG (proapoptotik), BCL2L10 (antiapoptotik), HRK (proapoptotik) ve BAX (proapoptotik) gen ekspresyonlarında görülmüştür. Epirubisin ile ZYE kombinasyonunda gen ekspresyonlarında artış saptanmamıştır. Bu da ZYE'nin MCF-7 hücrelerinde epirubisinin etkisini bozduğunu göstermektedir.

Zeytinyağı polifenollerinin östrojen ve antagonisti tamoksifen gibi hidroksil grubu olan aromatik halkası mevcuttur. Bu özellik potansiyel olarak gözlenen antiöstrojenik etkiden sorumlu olabilir (178). HT ve OL'nin 10-75 µM dozlarında kullanımında [<sup>3</sup>H]timidin bağlanma testi ile östrojenin indüklediği proliferasyonun doz bağımlı inhibisyonu saptanmıştır. Aynı zamanda OL'nin östrojenin indüklediği ERK1/2 aktivasyonunu bloke ettiği de gösterilmiştir (159). Bu bulgular bizim çalışmamızda MCF-7 hücrelerinde OL'in epirubisinin sitotoksik etkisini neden bozduğunu da açıklayabilir. Çünkü proliferasyonu azalmış hücrelerin ölümü de zorlaşır. Bilindiği gibi anti-kanser ilaçlar proliferasyonu hızlı hücrelerde etkindirler.

MCF-7, SKBR3 ve JIMT-1 meme kanseri hücre dizilerinde ZYE'nin 10-1000 µg/ml dozları arasında yapılan bir çalışmada 72 saat sonrasında MTT metoduyla doz bağımlı inhibisyon görülmüştür (179).

Aköz zeytin yaprağı kurutulmuş ekstraktı "AOLE" (209, 178, 66 µg/mL) ve metanol zeytin yaprağı ekstraktı "MOLE"nin (174, 510, 175 µg/mL) MCF-7, T-24 (insan üriner mesane karsinomu) ve BBCE (insan endotelial hücreleri) hücrelerinde proliferasyon inhibisyonu yaptığı saptanmıştır (158).

MCF-7 hücrelerinde 48 saat % 0.1 ZYE tedavisi sonrası kanser hücresi proliferasyonunun kontrol hücrelerine göre % 60 inhibe olduğu gösterilmiştir. OL ve HT ile zaman ve konsantrasyon bağımlı olarak hücre inhibisyonu gözlenmiştir. MCF-7 hücrelerinde 3, 6 ve 12 saatlik 200 µg/mL OL ya da 50 µg/mL HT tedavisi sonrası multikaspaz deneyi yapılmıştır. Her iki ajanın da kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında kaspaz aktivasyonunu zaman bağımlı olarak indüklediği saptanmıştır. MCF-7 hücrelerinin OL ve HT ile tedavisi sonrası apoptotik hücre ölümü hücre siklusunun G1 fazında bloke edilmesiyle saptanmıştır. MCF-7 hücreleri 100 µg/mL OL ve 25 µg/mL HT ile tedavi edilmiş. 24 saat sonrasında OL'de % 41.1, HT'de % 45.7 G1 fazında hücre siklusu arresti bulunmuştur (145). Bu bulgular bizim bulgulara terstir. Muhtemelen ekstrakt hazırlama yöntemindeki farklılıklar bu duruma neden olabilir.

OL normal insan deri fibroblastları (NL-Fib) ve tümör hücrelerinde (LN-18, zayıf diferansiye glioblastoma; TF-1a, eritrolösemi; 786-O, renal hücreli adenokarsinoma; T-47D, meme infiltratif duktal karsinoma-plevral efüzyon; RPMI-7951, deri malign melanoma lenf nodu metastazı; ve LoVo, kolorektal adenokarsinoma-supraklavikular bölge metastazı) % 0.005–0.025 dozlarında 5 günlük tedavi sonrası CellTiter MTS hücre proliferasyon kiti ile hücre proliferasyonlarına bakıldığında doz bağımlı inhibisyon gözlenmiştir. Hücre migrasyon deneyi ile % 0.01 OL ile hücre motilitesinin inhibe olduğu gösterilmiştir (129). Kendiliğinden yumuşak doku sarkomu gelişen İsviçre albino farelerinde yapılan bir deneyde % 1 oleuropein içeren içme suyu verildiğinde tümörde gerileme görülmüştür. OL hücre büyümesini, motilitesini ve invazivliğini inhibe eder. Aktin hücre iskeletinin bozulmasıyla bağlantılı



olarak hücre yuvarlanmasını indüklediği gösterilmiştir (180). OL'in 2 saat içinde canlı hücrelerin aktin iskeletini bozduğu gösterilmiştir.

Rida ve ark.'nın (181) Jurkat lösemik hücre soyunda yaptıkları bir çalışmada Bcl-2, Bax ve p53 proteinlerine Western blot ile baktıklarında ZYE ile bu proteinlerin ekspresyonlarında değişiklik olmadığı görülmüştür. ZYE'nin antiproliferatif etkisini farklı bir apoptotik yolak üzerinden gerçekleştirdiği düşünülmektedir (181). Ya da ölüm modu apoptozis değil nekrozis olabilir.

B16 fare melanoma hücre soyunda 1.25 mg/ml ZYE uygulaması sonrası yapılan RT-PCR analizlerinde kaspaz-3, 8 ve 9'un gen ekspresyonlarında azalma, immüno blot analizinde ise Bcl-2 ve Bcl-XL'de artma, Bcl-XL antagonisti olan p53 ve Bim'de azalma saptamışlardır. ZYE uygulanan hücrelerde aktif kaspaz-3 ekspresyonunun azalmasının Bim ve p53'ün Bcl-2'yi bloke etmesindeki yetersizlik ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (182).

OL kanser ilerlemesinin birçok adımını hedef alan yeni bir sınıf anti-kanser ilaç olarak önerilmektedir. Antioksidan olarak onkogeneze neden olan genetik hasardan hücreleri korur. Anti-anjiogenik olarak tümör progresyonunu önler. Son olarak kanser hücrelerini inhibe ederek tümör gerilemesini sağlar. Tüm bu özelliklerin tek bir moleküldeki eşsiz kombinasyonu, OL aktif kanser ilaçları ile birlikte diyet bileşeni olarak insan çalışmalarında kullanılmaya değer gözükmektedir (129).

Sonuç olarak in vitro sonuçların ümit verici sitotoksik etkiyi telkin etmesi nedeni ile OL'in anti-kanser ajanlarla kombine edilmesi ile ilgili olarak hayvan çalışmalarının yapılmasının faydalı olabileceği düşünülmüştür. Daha önemli olarak, fenotipik farklılığa bağlı olarak OL'in anti-kanser ilaçların etkisini bozabileceği ya da artırabileceği düşünülmüştür.

## KAYNAKLAR

1. Guarneri V, Conte PF. The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004; 1: 149-61.
2. Induced abortion does not increase breast cancer risk. WHO Information Fact Sheets. No:240. <https://apps.who.int/inf-fs/en/fact240.html>. 15.06.2010.
3. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2010. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/acspc-024113.pdf>. 16.10.2011.
4. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı (Epidemiyoloji ve Koruma Şube Müdürlüğü) 2005 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri. [ketem.org/istatistik.php](http://ketem.org/istatistik.php). 15.06.2010.
5. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2011-2012. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-030975.pdf>. 16.10.2011.
6. Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 608: 1-22.
7. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993; 15: 36–47.
8. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet* 2002; 360:187–95.
9. Hartge P, Chatterjee N, Wacholder S, Brody LC, Tucker MA, Struewing JP. Breast cancer risk in Ashkenazi BRCA1/2 mutation carriers: effects of reproductive history. *Epidemiology* 2002; 13: 255–61.
10. Mac Mahon B, Trichopoulos D, Brown J et al. Age at menarche, probability of ovulation and breast cancer. *Int j Cancer* 1982; 29: 13-20.
11. Hoover R, Gray IA, Cole P et al. Menapousal estrogens and breast cancer. *N Engl J Med* 1976; 295: 401-6.
12. Mac Mahon B, Cole P, Lin T. Age of first birth and breast cancer risk. *Bull WHO* 1970; 43: 209-21.
13. Değerli Ü (editör). Meme Kanseri. Genel Cerrahi. 6. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 1998. 288-96.
14. Özışık Y, Baltalı E. Meme kanseri. Yasavul Ü (editör). Hacettepe İç Hastalıkları Kitabı. 2. Baskı. Ankara: Semih Ofset; 2004. 1426-35.
15. Thomas DB. Do hormones cause breast cancer? *Cancer* 1984; 53: 595–604.
16. Reeves G, Beral V, Green J, Gathani T, Bull D. Hormonal therapy for the menopause and breast-cancer risk by histological type: a cohort study and meta-analysis. *Lancet Oncol* 2006; 7: 910–8.
17. Stalsberg H, Thomas D, Noonan E. Histologic types of breast carcinoma in relation to international variation and breast cancer risk factors. WHO

- Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. *Int J Cancer* 1989; 44: 399–409.
18. Collaborative Group on hormonal faktors in breast cancer. Breast cancer and hormonal kontraseptives, collaborative reanalysis of individual data on 53.297 woman with breast cancer and 100.239 women without breast cancer-from 54 epidemiological studies. *Lancet* 1996; 47; 1713-27.
  19. Pike M, Bernstein L, Spicer D. Exogenous hormones and breast cancer risk. In: Neiderhuber J. (ed). *Current Therapy in Oncology*. 1st edition. St. Louis: Decker; 1993. 292-302.
  20. Polyak K. Breast cancer gene discovery. *Expert Rev Mol Med*. 2002; 4: 1-18.
  21. Sayek İ. (editor). *Meme Hastalıkları. Temel Cerrahi*. 1. Cilt. 3. Baskı. Ankara: Güneş kitabevi; 1996. 864-72.
  22. Albain KS, Alfred KC, Clarc DM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials. *J. Natl Cancer inst Monogr* 1994; 16: 35.
  23. Anderson DE. Some characteristics of familial breast cancer. *Cancer* 1971; 28: 1500-4.
  24. Haagensen CD (ed). *Diseases of Breast*. 3rd edition. Philadelphia: WB Saunders; 1986.
  25. Rohan TH; Howe GR, Frienderich CM et. al. Dietary fiber vitamins A, C, and E risk of breast cancer. A cohort study. *Cancer Causes Control* 1993; 4: 29-35.
  26. Kayhan Ö, Özkan N, Malazgirt Z. *Genel Cerrahi*. 1. baskı. Ankara: Hacettepe- Taş Kitapçılık; 1996.
  27. Scmizu Y, Kato H, Schull WJ. Study on mortality of A bomb survivors. *Radit Res* 1990: 121-41.
  28. Manavoğlu O (ed). *Klinik Onkoloji El Kitabı*. 1. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2004. 218-29.
  29. Baquet CR, Commiskey P. Socioeconomic factors and breast carcinoma in multicultural women. *Cancer* 2000; 88: 1256-64.
  30. Claus EB, Risch N, Thompson WD. Autosomal dominant inheritance of early onset breast cancer: implications of risk prediction. *Cancer* 1994; 73: 643-51.
  31. Campbell J.B. Breast Cancer-Race, Ethnicity, and Survival: Aliterature Review. *Breast Cancer Research and Treatment* 2002; 74: 187-92.
  32. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med*. 2007; 356: 227–36.
  33. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiologic studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet* 1997; 350: 1047–59.
  34. Olson JE, Sellers TA, Iturria SJ, Hartmann LC. Bilateral oophorectomy and breast cancer risk reduction among women with a family history. *Cancer Detect Prev*. 2004; 28: 357–60.
  35. Eisen A, Lubinski J, Klijn J, et al. Breast cancer following bilateral oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an international case-control study. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 7491–6.

36. Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, et al. Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med.* 1994; 330: 81–7.
37. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50,302 women with breast cancer and 96,973 women without the disease. *Lancet* 2002; 360: 187–95.
38. Lambe M, Hsieh C, Trichopoulos D, Ekblom A, Pavia M, Adami HO. Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. *N Engl J Med.* 1994; 331: 5–9.
39. McTiernan A, Kooperberg C, White E, et al. For the Women's Health Initiative Cohort Study. Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *JAMA* 2003; 290: 1331–6.
40. McTiernan A. Physical activity and the prevention of breast cancer. *Medscape Womens Health* 2000; 5: E1.
41. Biglia N, Defabiani E, Ponzzone R, Mariani L, Marengo D, Sismondi P. Management of risk of breast carcinoma in postmenopausal women. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11: 69–83.
42. Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353: 229–37.
43. Michels KB, Holmberg L, Bergkvist L, Wolk A. Coffee, tea, and caffeine consumption and breast cancer incidence in a cohort of Swedish women. *Ann Epidemiol.* 2002; 12: 21–6.
44. Keinan-Boker L, Van Der Schouw YT, Grobbee DE, Peeters PH. Dietary phytoestrogens and breast cancer risk. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79: 282–8.
45. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yuan SS, et al. Intake of fruits and vegetables and risk of breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 2001; 285: 769–76.
46. Peeters PH, Keinan-Boker L, Van Der Schouw YT, Grobbee DE. Phytoestrogens and breast cancer risk: review of the epidemiological evidence. *IARC Sci Publ.* 2002; 156: 331–6.
47. Kaye JA, Jick H. Antibiotics and the risk of breast cancer. *Epidemiology* 2005; 16: 688–90.
48. Velicer CM, Heckbert SR, Lampe JW, Potter JD, Robertson CA, Taplin SH. Antibiotic use in relation to the risk of breast cancer. *JAMA* 2004; 291: 827–35.
49. Jacobs EJ, Thun MJ, Connell CJ, et al. Aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer incidence in a large U.S. cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14: 261–4.
50. Terry MB, Gammon MD, Zhang FF, et al. Association of frequency and duration of aspirin use and hormone receptor status with breast cancer risk. *JAMA* 2004; 291: 2433–40.
51. Beral V, Bull D, Doll R, Peto R, Reeves G, for the Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and abortion: collaborative reanalysis of data from 53 epidemiological studies, including 83,000 women with breast cancer from 16 countries. *Lancet* 2004; 363: 1007–16.

52. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, et al., for the Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Alcohol, tobacco and breast cancer—collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer* 2002; 87: 1234–45.
53. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long term follow up. *Histopathology* 1992; 20: 479-89.
54. Frykberg ER. Lobular carcinoma in situ of the breast. *The breast journal* 1999; 5: 296-300.
55. Silverstein M J. Ductal carcinoma in situ of the breast. *Br. Med. J* 1998; 317: 734-39.
56. Singletary SE, Allred C, Ashley P, et al. Revision of the American Joint Committee on cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3628-36.
57. American Joint Committee on Cancer 2010. <http://www.cancerstaging.org/staging/index.html>. 17.10.2011.
58. Tavassoli FA. Normal development and anomalies. In: Tavassoli FA (ed). *Pathology of the Breast*. 1st edition. Connecticut: Appleton & Lange; 1992. 1-24.
59. Leitner SP, Swern AS, Weinberger D, Duncan LJ. Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1a,b NO MO). *Cancer* 1995; 76: 2266-73.
60. Clayton F, Hopkins CL. Pathologic correlates of prognosis in lymph node -positive breast carcinomas. *Cancer* 1993; 71: 1780-9.
61. İlvan Ş. Meme Karsinomu Patolojisi. İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Meme Kanseri Sempozyum Dizisi 2006; 54: 65 – 71.
62. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, et al. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. *J Clin. Oncol* 2001; 19: 3817-27.
63. ESMO. Minimal Clinical Recommendation for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up of primary breast cancer. *Ann. Oncol* 2001; 12: 1047-8.
64. Lapidus RG, Nas SJ, Davidson N. The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998; 3: 85-94.
65. Gulllick WJ, Love SB, Wright C, Barnes DM, Gusterson B, Harris AL, Altman DG. c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br J Cancer* 1991; 63: 434-8.
66. Tuzlalı S, Yavuz E, İlhan R, İplikçi A. Memenin invaziv lobuler karsinomlarında alt tiplerin değerlendirilmesi. *Türk Patol Der* 1994; 10: 85-7.
67. <http://www.genecards.org>. 15.12.2011

68. Middleton LP, Palacios DM, Bryant BR, et al. Pleomorphic lobular carcinoma: morphology, immunohistochemistry, and molecular analysis. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 1650-6.
69. Baines C. The Canadian National Breast Screening Study: A perspective on criticism. *Ann Intern Med* 1994; 120: 326-34.
70. Sicles EA. Findings at mammographic screening on only one Standard projection outcomes analysis. *Radiology* 1998; 208: 471-5.
71. Lawrence WF, Liang W, Mandelblatt JS, et al. Serendipity in diagnostic imaging: magnetic resonance imaging of the breast. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1792-800.
72. Hacıbekiroğlu M. Meme Kanserinde Tümör Marker'lar ve Biyokimyasal Değişimler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Meme Kanseri Sempozyum Dizisi 2006; 54: 35 - 41.
73. Safi F, Kohler I, Rottinger E, et al. The value of the tumor marker CA 15-3 in diagnosing and monitoring breast cancer. *Cancer* 1991; 68: 574-82.
74. Bornbardieri E, Gion M, Mione R, et al. A Mucin-like carcinoma-associated antigen (MCA) in the tissue and blood of patients with primary breast cancer. *Cancer* 1989; 63: 490-5.
75. Horgan PGR, Byrne J, O'Donoghue J, Money E, Grimes H, Given HF. Mucin-like carcinoma associated antigen (MCA) et presentation with breast cancer. *Ir j Med Sct* 1997; 166: 215-6.
76. Yasasever V. Tümör belirleyiciler. Topuz E (editör). Meme kanseri: Biyoloji, Tanı, Evreleme, Tedavi. 1. Baskı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Yayınları; 1997. 156-70.
77. Gion M, Mione R, Barioli P, Sartorello P, Capitanio G. Tissue polypeptide antigen and tissue polypeptide specific antigen in primary breast cancer. Evaluation in serum and tumor tissue. *Eur J Clin Chem Biochem* 1994; 32: 779-87.
78. Gion M, Mione R, Becciolini A, Balzi M, Correale M, Piffanelli A, Giovannini G, Sacconi Jotti G, Fontanesi M. Relationship between cytosol TPS, TPA and cell proliferation. *Int j Biol Markers* 1994; 9: 109-14.
79. Formento JL, Francoual M, Formento P, Etienne MC, Fischel JL, Namer M, Frenay M, Francois E, Milano G. Epidermal growth factor receptor assay validation of a single point method and application to breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1991; 17: 211-9.
80. Ardavanis A, Scorilas A, Loukeri A, Gerakini F, Pissakas G, Missitzis I, Apotolikas N, Yiotis I. Cathepsin D may help in discriminating node-negative breast cancer patients at risk for local regional recurrence. *Anticancer Res* 1998; 18: 2885-90.
81. Tsuruo T, Lida H, Naganuma K, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Promotion by verapamil of vincristine responsiveness in tumor cell lines inherently resistant to the drug. *Cancer Res* 1983; 43: 808-13.
82. Pietenpol JA, Vogelstein B. Tumour suppressor genes. No room at the p53 inn. *Nature* 1993; 365: 17-8.
83. Thompson CB. Apoptozis. In: Paul WE (ed). *Fundamental immunology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1999. 107-38.
84. Wyllie AH, Duvall E. Cell death. In: McGee JO'D, Issacson PGR, Wright

- N (eds). Oxford Textbook of Patology, vol 1. 2nd edition. USA: Oxford University Pres; 1992. 142-7.
85. Cooper GM. Programmed cell death. In: Cooper GM (ed). The Cell. Chapter 14. Washington: ASM Pres; 1994. 592-6.
  86. Perkins AS, Stern DF, Apoptozis. In: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). Cancer Principle and Practice of Oncology. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. 96-100.
  87. Thompson CB. Apoptozis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995; 267: 1456-62.
  88. Hirose Y, Yoshimi N, Suzui M, et al. Expression of bcl-2, bax, and bcl-XL proteins in azoxymethane-induced rat colonic adenocarcinomas. Mol Carcinog 1997;19: 25-30.
  89. Sanders EJ, Torkkeli PH, French AS. Patterns of cell death during gastrulation in chick and mouse embryos. Anat Embryol. 1997; 195: 147-54.
  90. Karağaç E. Lokal İleri ve Metastatik Meme Kanseri Olan Hastalarda Bir Apoptozis Göstergesi Olan Serum Kırılmış Sitokeratin 18 Düzeylerinin, Tedaviye Yanıtla İlişkisinin İncelenmesi (Uzmanlık Tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi; 2006.
  91. Pole RJ, Qi BQ, Beasley SW. Patterns of apoptosis during degeneration of the pronephros and mesonephros. J Urol 2002; 167: 269-71.
  92. Aral H. Apoptozis. Sendrom 1996; 33-7.
  93. Afford S, Randhawa S. Apoptozis. Mol Pathol 2000; 53: 55-63.
  94. Pasquini L, Petrucci R, Riccioni A, Petronelli U. Sensitivity and Resistance of Human Cancer Cells to TRAIL. Mechanisms and Therapeutical Perspectives. Cancer Therapy 2006; 4: 47-72.
  95. Rodenburg RJT, Raats JMH, Pruijn GJM, van Venrooij WJ. Cell death: a trigger of autoimmunity? Bioessays 2000; 22: 627-36.
  96. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Lung infections: role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. Chest 2000; 117:1771-7.
  97. Fisher B, Anderson S, Redmond CK, Wolmark N, Wickerham DL, Cronin WM. Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. N. Engl. J Med 1995; 333: 1456-61.
  98. Veronesi U. Conservation surgery and irradiation in stages 1 and 2 disease. European experience. In: Bland KI, Copeland EM, (eds). The Breast: Comprehensive management of benign and malignant diseases. 2nd edition. Philadelphia: W:B Saunders; 1998. 1191-6.
  99. Hortobagyi GN. Treatment of breast cancer. N Eng J Med 1998; 339: 974-84.
  100. Recth A. The return of postmastectomy radiotherapi. J Clin Oncol 1995; 13: 2861-84.
  101. Fisher B, Brown AM, Dimitrov NV, et al. Two months of doxorubicin cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate and fluorouracil in positive- node breast cancer patients with tamoxifen-

- nonresponsive tumors: results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1483-96.
102. Klijn JG, Blamey RW, Boccardo F et al. Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a meta-analysis of four randomized trials. *J Clin Oncol* 2001; 19: 343–53.
  103. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998; 352: 930-42.
  104. Sausville, E.A. Longo, D.A. Principles of cancer treatment: surgery, chemotherapy and biological treatment. In: Fauci, A.S., Braunwald, E., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L., Loscalzo, J. (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th edition. Spain: McGraw-Hill Interamericana; 2009.
  105. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365: 1687–717.
  106. Vaclavikova R, Horsky S, Simek P, Gut I. The paclitaxel metabolism in rat and human liver microsomes is inhibited by phenolic antioxidants. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2003; 368: 200-9.
  107. Sayek İ (editör). *Temel Cerrahi*. 3. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd.Şti. 2004. 989
  108. Carrick S, Parker S, Wilcken N et al. Single agent versus combination chemotherapy for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; CD003372.
  109. Sledge GW, Neuberg D, Bernardo P et al. Phase III trial of doxorubicin, paclitaxel, and the combination of doxorubicin and paclitaxel as front-line chemotherapy for metastatic breast cancer: an intergroup trial (E1193). *J Clin Oncol* 2003; 21: 588–92.
  110. Plosker GL, Faulds D. Epirubisin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in cancer chemotherapy. *Drugs* 1993; 45: 788-856.
  111. Jarvinen TA, Holli K, Kuukasjarvi T, Isola JJ. Predictive value of topoisomerase II alpha and other prognostic factors for epirubisin chemotherapy in advanced breast cancer. *British journal of cancer* 1998; 77: 2267-73.
  112. Olinski R, Jaruga P, Foksinski M, Bialkowski K, Tujakowski J. Epirubisin-induced oxidative DNA damage and evidence for its repair in lymphocytes of cancer patients who are undergoing chemotherapy. *Molecular Pharmacology* 1997; 52: 882-5.
  113. Mavroudis D, Papakotoulas P, Ardavanis A et al. Randomized phase III trial comparing docetaxel plus epirubisin versus docetaxel plus capecitabine as first-line treatment in women with advanced breast cancer. *Annals of oncology* 2009; 21: 48-54.
  114. Quiles J.L, Huertas J.R, Battino M, Mataix J, Ramirez-Tortosa M.C. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 2002; 79–95.



115. Quiles J.L, Ochoa J.J, Huertas J.R, Lopez-Frias M, Mataix J. Olive oil and mitochondrial oxidative stress: studies on adriamycin toxicity, physical exercise and ageing. In: Quiles J.L, Ramirez-Tortosa M.C, Yaqoob P. (Eds). Olive Oil and Health. 1st edition. Oxford: CABI Publishing; 2006. 119–51.
116. Kayaalp O (Editör). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 1. Cilt. 10. Baskı. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd Şti; 2005. 330-4.
117. Manavoğlu O. Klinik Onkoloji El Kitabı. 4. baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2004. 68.
118. Uçar A. Farmakoloji. 4. Baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti; 2003. 390-1.
119. Rao CV, Newmark HL, Reddy BS. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*. 1998; 19: 287–90.
120. Smith TJ, Yang GY, Seril DN, Liao J, Kim S. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis*. 1999; 19: 703–6.
121. Escrich E, Solanas M, Moral M. in: Quiles J. L, Ramirez-Tortosa C, Yaqoob P. (Eds.) Olive Oil and Health. 4th edition. Oxfordshire: CABI International; 2006. 317–74.
122. Kachhap S. K, Dange P, Ghosh S. N. Effect of omega-6 polyunsaturated fatty acid (linoleic acid) on BRCA1 gene expression in MCF-7 cell line. *Cancer Lett*. 2000; 154: 115–20.
123. Perrinjaquet-Moccetti et al. Food Supplementation with an Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Extract Reduces Blood Pressure in Borderline Hypertensive Monozygotic Twins. *Phytother. Res* 2008; 22: 1239–42.
124. Ersus S, Esen Y. Oleuropein and Other Phenolic Compounds in Olive Leaves and Their Health Benefits. *Akademik Gıda* 2008; 6: 34-8.
125. Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev* 2005; 18: 98–112.
126. Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1986; 34: 823–6.
127. Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, Leone A, Zappia V. The protective effect of the olive oil polyphenol (3, 4-dihydroxyphenyl) ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *Journal of Nutrition* 1997; 127: 286–92.
128. Speroni E, Guerra MC, Minghetti A, Crespi-Perellino N, Pasini P, Piazza F, Roda A. Oleuropein evaluated *in vitro* and *in vivo* as an antioxidant. *Phytotherapy Research* 1998; 12: 98–100.
129. Hamdi K.H, Castellon R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 334: 769-78.
130. Estruch R, Martinez-Gonzalez MA, Corella D, Salas-Salvado J, Ruiz-Gutierrez V, Covas MI, Fiol M, Gomez-Gracia E, Lopez-Sabater MC, Vinyoles E, Aros F, Conde M, Lahoz C, Lapetra J, Saez G, Ros E.

- Effects of a Mediterranean-Style Diet on Cardiovascular Risk Factors A Randomized Trial. *Ann Intern Med* 2006; 145:1–11.
131. Fito M, Guxens M, Corella D, Saez G, Estruch R, de la Torre R, Frances F, Cabezas C, Lopez-Sabater MC, Marrugat J, Garcia-Arellano A, Aros F, Ruiz-Gutierrez V, Ros E, Salas-Salvado J, Fiol M, Sola R, Covas MI. Effect of a Traditional Mediterranean Diet on Lipoprotein Oxidation A Randomized Controlled Trial. *Arch Intern Med* 2007; 167: 1195–203.
  132. Scarmeas N, Stern Y, Tang MX, Mayeux R, Luchsinger JA. Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2006; 59: 912–21.
  133. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean Diet and Survival in a Greek Population *New Engl J Med* 2003; 348: 2599–608.
  134. Menendez JA, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Garcia-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Analyzing effects of extra-virgin olive oil polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reverse-phase protein microarrays. *Int J Mol Med* 2008; 22: 433-9.
  135. Menendez JA, Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Carrasco-Pancorbo A, Garcia-Villalba R, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer* 2007; 7: 80–98.
  136. V. Petkov and P. Manolov. Pharmacological analysis of the iridoid Oleuropein. *Arzneimittelforschung* 1972; 22: 1476–86.
  137. Elliott G.A, Buthala D.A., DeYoung E.N. Preliminary safety studies with calcium elenolate, an antiviral agent. *Antimicrob. Agents Chemother* 1969; 9: 173–6.
  138. D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P, Capasso G, Pontoni G, Galletti P, Zappia V. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metab. Dispos.* 2001; 29: 1492–8.
  139. Bartsch H, Nair J, Owen RW. Exocyclic DNA adducts as oxidative stress markers in colon carcinogenesis potential role of lipid peroxidation, dietary fat and antioxidants. *Biol Chem.* 2002; 383: 915–21.
  140. Owen RW, Giacosa A, Hull WE, et al. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol.* 2000; 1: 107–12.
  141. Jiang W. G, Hiscox S, Hallett M. B, Horrobin D. F, et al. Regulation of the expression of E-cadherin on human cancer cells by gamma-linolenic acid (GLA). *Cancer Res.* 1995; 55: 5043–8.
  142. Giulia C, Monica D, Incani Alessandra I. et al. Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007; 362: 606-11.
  143. Andreotti PE, Cree IA, Kurbacher CM, et al. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1995; 55: 5276-82.

144. Kurbacher CM, Cree IA, Bruckner HW, et al. Use of an ex vivo ATP luminescence assay to direct chemotherapy for recurrent ovarian cancer. *Anti-Cancer Drugs* 1998; 9: 51-7.
145. Han J, Talorete T.P.N, Yamada P, Isoda H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology* 2009; 59: 45-53.
146. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
147. Leers MP, Kolgen W, Bjorklund V et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 1999; 187: 567-72.
148. Ueno T, Toi M, Biven K, Bando H, Ogawa T, Linder S. Measurement of an apoptotic product in the sera of breast cancer patients. *Eur J Cancer* 2003; 39: 769-74.
149. Owen R.W, Giacosa A, Hull W.E, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur. J. Cancer* 2000; 36: 1235-47.
150. Visioli F, Galli C. Phenolics from olive oil and its waste products. Biological activities in in vitro and in vivo studies. *World Rev. Nutr. Diet.* 2001; 88: 233-7.
151. Lairon D. Intervention studies on Mediterranean diet and cardiovascular risk. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007; 51: 1209-14.
152. Pelucchi C, Bosetti C, Rossi M, Negri E, La Vecchia C. Selected aspects of Mediterranean diet and cancer risk. *Nutr. Cancer* 2009; 61: 756-66.
153. Verberne L, Bach-Faig A, Buckland G, Serra-Majem L. Association between the Mediterranean diet and cancer risk: A review of observational studies. *Nutrition and Cancer* 2010; 62: 860-70.
154. Abaza L, Talorete T.P, Yamada P, Kurita Y, Zarrouk M, Isoda H. Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian gerboui olive leaf extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 2007; 71: 1306-12.
155. Visioli F, Galli C. Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2002; 42: 209-221.
156. Visioli F, Bellosta S, Galli C. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci.* 1998; 62: 541-6.
157. Sudjana A.N, D'Orazio C, Ryan V, Rasool N, Ng J, Islam N, Riley T.V, Hammer K.A. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2009; 33: 461-3.
158. Goulas V, Exarchou V, Troganis A.N, Psomiadou E, Fotsis T, Briasoulis E. et al. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Molecular Nutrition and Food Research* 2009; 53: 600-8.
159. Sirianni R, Chimento A, De Luca A, Casaburi I, Rizza P, Onofrio A. et al. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Molecular Nutrition and Food Research* 2010; 54: 833-40.

160. Fini L, Hotchkiss E, Fogliano V, Graziani G, Romano M, De Vol E et al. Chemopreventive properties of pinoresinol-rich olive oil involve a selective activation of the ATM-p53 cascade in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis* 2008; 29: 139–46.
161. Obied HK, Prenzler PD, Konczak I, Rheman A, Robard K. Chemistry and bioactivity of olive biophenols in some antioxidant and antiproliferative in vitro bioassays. *Chem Res Toxicol* 2009; 22: 227–34.
162. Aggarwal B.B, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology* 2006; 71: 1397–421.
163. Jaouad A, Zahira FB, Myriam VP et al. A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2011; 723: 165-70.
164. Stefania B, Rosanna C, Marilena C et al. Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives. *Food Chemistry* 2011; 127: 1609-14.
165. Notarnicola M, Pisanti S, Tutino V et al. Effects of olive oil polyphenols on fatty acid synthase gene expression and activity in human colorectal cancer cells. *Genes and Nutrition* 2011; 6: 63-9.
166. Dahan L, Sadok A, Formento JL, Seitz JF, Kovacic H. Modulation of cellular redox state underlies antagonism between oxaliplatin and cetuximab in human colorectal cancer cell lines. *Br J Pharmacol* 2009; 158: 610–20.
167. Zouhaier B, Junkuy H, Isoda H et al. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 2011; 49: 179-84.
168. Janicke R.U, Sprengart M.L, Wati M.R, Porter A.G. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 9357–60.
169. Wang R, Wang X, Li B, Lin F, Dong K, Gao P, Zhang HZ. Tumor-specific adenovirus-mediated Puma gene transfer using the survivin promoter enhances radiosensitivity of breast cancer cells in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 2008 PMID: 18791823
170. Yeruva L, Abiodun E, Carper SW. Methyl jasmonate decreases membrane fluidity and induces apoptosis through tumor necrosis factor receptor 1 in breast cancer cells. *Anticancer Drugs* 2008; 19: 766–76.
171. Nizamutdinova IT, Lee GW, Son KH, Jeon SJ, Kang SS, Kim YS, Lee JH, Seo HG, Chang KC, Kim HJ. Tanshione I effectively induces apoptosis in estrogen receptor-positive (MCF-7) and estrogen receptor-negative (MDA-MB-231) breast cancer cells. *Int J Oncol* 2008; 33: 485–91.
172. Kumar A, D'Souza SS, Gaonkar SL, Rai KML, Salimath BP. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by a new series of substituted-1,3,4-oxadiazole derivatives. *Invest New Drugs* 2008; 26: 425–35.

173. Cui Q, Yu J-h, Wu J-n, Tashiro S-i, Onodera S, Minami M, Ikejima T. p53-mediated cell cycle arrest and apoptosis through a caspase-3-independent, but caspase-9-dependent pathway in oridonin-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28: 1057–66.
174. Hsuuw YD, Chan WH. Epigallocatechin gallate dosedependently induces apoptosis or necrosis in human MCF-7 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1095: 428–40.
175. Zhang GP, Lu YY, Lv JC, Ou HJ. Effect of ursolic acid on caspase-3 and PARP expression of human MCF-7 cells. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2006; 31: 141–4.
176. Yang HL, Chen CS, Chang WH, Lu FJ, Lai YC, Chen CC, Hseu TH, Kuo CT, Hseu YC. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by *Anrodia camphorata*. *Cancer Lett* 2006; 23: 215–227.
177. Chen JS, Konopleva M, Andreeff M, Multani AS, Pathak S, Mehta K. Drug-resistant breast carcinoma (MCF-7) cells are paradoxically sensitive to apoptosis. *J Cell Physiol* 2004; 200: 223–34.
178. Adlercreutz H, Bannwart C, Wahala K, Makela T. et al. Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1993; 44: 147–56.
179. Fu S, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A et al. Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010; 397: 643-54.
180. Martin S.S, Leder P. Human MCF10A mammary epithelial cells undergo apoptosis following actin depolymerization that is independent of attachment and rescued by Bcl-2. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21: 6529–36.
181. Rida F, Samer B, Serine EB et al. The Antioxidant and Anti-proliferate Activity of the Lebanese *Olea europaea* Extract. *Plants Foods For Human Nutrition* 2011; 66: 58-63.
182. Mijatovic S A, Timotijevic GS, Miljkovic DM et al. Multiple antimelanoma potential of dry olive leaf extract. *International Journal of Cancer* 2011; 128: 1955-65.

## KISALTMALAR

Ek: 1

<b>Aİ</b>	: Aromataz inhibitörleri
<b>AJCC</b>	: American Joint Committee On Cancer
<b>Apaf 1</b>	: Apoptozis proteaz aktive edici faktör 1
<b>BRCA-1</b>	: Breast Cancer Resistance Protein 1
<b>BRCA-2</b>	: Breast Cancer Resistance Protein 2
<b>CA</b>	: Siklofosamid-Doksorubisin
<b>CA 15-3</b>	: Karbonhidrat Antigen 15-3
<b>CA-549</b>	: Karbonhidrat Antijen 549
<b>CA 27.29</b>	: Cancer antijen 27.29
<b>CEA</b>	: Karsino Embriyonik Antigen
<b>CK18</b>	: Sitokeratin 18
<b>CMF</b>	: Siklofosamid-metotreksat-5-Florourasil
<b>EBV</b>	: Epstein-Barr virüsü
<b>EGF</b>	: Epidermal growth factor
<b>EGFR</b>	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptör
<b>ER</b>	: Östrojen reseptör
<b>FAC</b>	: 5-Florourasil-Doksorubisin-Siklofosamid
<b>FADD</b>	: Fas adapter protein with a death domain
<b>FEC</b>	: 5-Florourasil-Epirubisin-Siklofosamid
<b>GnRH</b>	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
<b>HPV</b>	: İnsan papilloma virüsü
<b>HRT</b>	: Hormon replasman tedavisi
<b>HT</b>	: Hidroksitirozol
<b>LHRH</b>	: Lüteinizan hormon salgılatıcı hormon
<b>MCA</b>	: Mücin-like Carcinoma Associated Antigen
<b>MI</b>	: Minimum yaşam
<b>MO</b>	: İlaç uygulanmamış kontrol hücreleri
<b>MTT</b>	: Metiltiazoltetrazolium
<b>OKS</b>	: Oral Kontraseptif
<b>OL</b>	: Oleuropein
<b>PR</b>	: Progesteron reseptör
<b>RLU</b>	: Rölatif ışık ünitesi
<b>RT-PCR</b>	: Eş zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu
<b>STL</b>	: Sitotoksik T lenfositler
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodecyl Sülfat
<b>TAM</b>	: Tamoksifen
<b>TGF alpha</b>	: Transforming growth factor alpha
<b>TİK</b>	: Test İlaç Konsantrasyon
<b>TNFR</b>	: Tümör Nekrozis Faktör Reseptör
<b>TNM</b>	: Tümör-nod-metastaz
<b>TPA</b>	: Doku Polipeptid Antigen
<b>TRADD</b>	: TNFR adapter protein with a death domain
<b>UICC</b>	: Union International Contre Cancere
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>ZYE</b>	: Zeytin yaprağı ekstresi

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince her zaman bilgilerini bizimle paylaşan, eğitimim ve tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı değerli hocam ve uzmanlık tezi danışmanım Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen ve bizi her konuda destekleyen değerli hocam Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Esmâ GÜR'e şükranlarımı ve saygılarımı sunarım. Bizler için zamanlarını ve emeklerini harcayan kürsümüzün tüm öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Beraber görev yaptığım, dostluğunu ve desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Arzu YILMAZTEPE ORAL'a, aynı zamanda dostluklarını paylaştığım sevgili iş arkadaşlarıma teşekkür ederim. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı personeline yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım esnasındaki yardımları için Biyokimya Kanseri Araştırma Laboratuvarı'nda çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman sevgi ve desteği ile yanımda olan yaşam kaynağım değerli eşim, annem, babam ve Ezgi'ye teşekkür eder sevgilerimi sunarım.

## ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Bursa'da doğdum. İlköğrenimimi Emek İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimimi Bursa Çelebi Mehmet Lisesi'nde tamamladım. 2000 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'ni kazandım. 2006 yılında mezun olduktan sonra 2007 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım. Halen aynı bölümde görevime devam etmekteyim.