



**MEME KANSERİ (MCF-7) HÜCRE
HATTINDA ARBUTİNİN ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Ayşe Nur SARIOVA

Danışman
Doç. Dr. Ömer HAZMAN

KİMYA ANABİLİM DALI

Eylül, 2019

Bu tez çalışması 16.FEN.BİL.15 numaralı proje ile AKÜ-BAPK tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEME KANSERİ (MCF-7) HÜCRE HATTINDA
ARBUTİNİN ETKİLERİ

Ayşe Nur SARIOVA

Danışman

Doç. Dr. Ömer HAZMAN

KİMYA ANABİLİM DALI

Eylül, 2019

TEZ ONAY SAYFASI

Ayşe Nur SARIOVA tarafından hazırlanan “Meme Kanseri (MCF-7) Hücre Hattında Arbutinin Etkileri” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 04/09/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ömer HAZMAN

Başkan :Doç. Dr. Laçine AKSOY
Afyon Kocatepe Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi

Üye :Doç. Dr. Ömer HAZMAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi

Üye :Dr. Öğr. Üyesi Naci Ömer ALAYUNT
Uşak Üniversitesi
Banaz Meslek Yüksek Okulu



Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

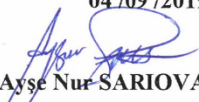
Prof. Dr. İbrahim EROL
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

**Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım
bu tez çalışmada;**

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

04 /09 /2019

Ayşe Nur SARIOVA

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

**MEME KANSERİ (MCF-7) HÜCRE HATTINDA
ARBUTİNİN ETKİLERİ**

Ayşe Nur SARIOVA
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ömer HAZMAN

Kanser tedavisinde cerrahi yaklaşım, radyoterapi ve kemoterapi yıllardan beri kullanılmaktadır. Mevcut tedavi yöntemlerinin yan etkileri ve hastaların yaşam tarzına olumsuz etkileri nedeniyle konunun paydaşlarını ve bilim insanlarını daha doğal ve yan etkisi az olabilecek alternatif yöntemler araştırmaya yönlendirmiştir. Bu bağlamda birçok kanser türüne değişik bitki ekstraktlarının veya doğal bileşenlerinin etkileri araştırılmaktadır. Sunulan bu tez çalışmasında MCF-7 adenokarsinom hücre hattında arbutinin inflamasyon ve oksidatif stres aracılı apoptoza (programlı hücre ölümü) etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca arbutinin MCF-7 hücrelerinde östrojen reseptörlerine, proliferasyona ve endoplazmik retikulum stresine etkileri de araştırılmıştır.

Sunulan çalışmada bir antioksidan olarak α ve β -arbutinin insan meme adenokarsinomu (MCF-7) hücre hattında sitotoksisite düzeyleri MTT (3-(4,5-dimetil-tiyazolil)-2,5-difeniltetrazolyum bromid testi) ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında β -arbutinin MCF-7 hücreleri için daha sitotoksik etkili olabileceği belirlenmiştir. Bu nedenle araştırmalara β -arbutinle devam edilmiştir. Bu amaçla MCF-7 hücrelerinde arbutinin oksidatif strese, inflamasyona, apoptoza, proliferasyona ve endoplazmik retikulum stresine etkisini belirleyebilmek amacıyla 4 farklı deneysel grup (1. Grup: kontrol grubu, 2. Grup: LD₀ dozu β -arbutin uygulanan grup; 3. Grup LD₁₀ β -arbutin dozu uygulanan grup, 4. Grup: LD₅₀ dozundan daha yüksek dozda β -arbutin uygulanan grup) oluşturulmuştur.

Deney gruplarından elde edilen hücre lizatlarında total antioksidan statü (TAS), total oksidan statü (TOS), oksidatif stres indeksi (OSI), tümör nekrozis faktör alfa (TNF) α , interferon gama (IFN) γ , interlöykin 1 beta (IL-1 β) seviyeleri analiz edilmiştir. Deney gruplarından izole edilen total RNA'lar kullanılarak sentezlenen cDNA'lar aracılığı ile MCF-7 hücrelerinde β -arbutinin Caspase 3 analizi ile apoptoza, Bcl-2 analizi ile proliferasyona ve GRP78 analizi ile endoplazmik retikulum stresine etkileri belirlenmiştir. Yapılan immunohistokimyasal çalışmalarla ise arbutinin MCF-7 hücrelerinde östrojen reseptörlerine ve p53 düzeylerine etkileri tespit edilmiştir.

Analizler sonunda MCF-7 hücrelerine uygulanan β -arbutinin dozlarının deney gruplarında oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stresini etkilemediği belirlenmiştir. Bununla birlikte LD₅₀ dozunda β -arbutin uygulanan hücrelerde proinflamatuvar stokin düzeyleri aracılığıyla inflamasyonun uyarıldığı belirlenmiştir. MCF-7 hücrelerinde β -arbutinin LD₁₀ ve LD₅₀ dozlarında genotoksisiteyi artırdığı görülmüştür. Yapılan moleküler ve immunohistokimyasal analizler sonucunda LD₅₀ dozunda β -arbutin genomun gardiyanı olarak nitelendirilen p53 ve Caspase 3 seviyelerini uyararak, MCF-7 hücrelerinde apoptozu artırdığı görülmüştür. Ayrıca MCF-7 hücrelerine uygulanan tüm dozlarda β -arbutinin östrojen reseptörlerini baskıladığı belirlenmiştir.

MCF-7 hücrelerinde arbutinin LD₅₀ dozunda genotoksik ve inflamatuvar etkileriyle uyarılan p53 aracılığıyla apoptotik Caspase 3'ün aktivasyonunu artırdığı ve aynı zamanda ER'lerinin aktivitesini azalttığı düşünülürse, β -arbutinin bu etkilerini nasıl oluşturduğunun araştırılması tedavide yeni bir bakış açısı geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Ama bunun için β -arbutinin, ER sinyal yolu ve DNA ile etkileşimlerini de ele alan daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

2019, xii + 87 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kanser, MCF-7 hücreleri, Arbutin, İnflamasyon, Oksidatif Stres

ABSTRACT
M.Sc. Thesis

**THE EFFECTS OF ARBUTINE IN THE (MCF-7) CELL LINE OF
BREAST CANCER**

Ayşe Nur SARIOVA

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Doç. Dr. Ömer HAZMAN

Surgical approach, radiotherapy and chemotherapy have been used in cancer treatment for many years. Adverse effects of current treatment methods and patients' lifestyle adversely affect. Therefore, the stakeholders and scientists of the subject have turned to research alternative methods that may be more natural and have less side effects. In this context, the effects of different plant extracts or natural components are investigated in many types of cancer. In this study, the effect of arbutin on inflammation and oxidative stress mediated apoptosis (programmed cell death) in MCF-7 adenocarcinoma cell line was investigated. The effects of arbutin on estrogen receptors, proliferation and endoplasmic reticulum stress in MCF-7 cells were also investigated.

In the present study, cytotoxicity levels of α and β -arbutin in human breast adenocarcinoma (MCF-7) cell line were analyzed by MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazolyl) - 2,5-diphenyltetrazolium bromide test). It was determined that β -arbutin may be more cytotoxic for MCF-7 cells. For this reason, studies were continued with β -arbutin. In order to determine the effect of arbutin on oxidative stress, inflammation, apoptosis, proliferation and endoplasmic reticulum stress in MCF-7 cells, 4 different experimental groups were formed. Groups are as follows: Group 1: control group, Group 2: LD₀ dose of β -arbutin applied group; Group 3: LD₁₀ dose of β -arbutin treated group, Group 4: : LD₅₀ dose of β -arbutin applied group.

Total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), oxidative stress index (OSI), tumor necrosis factor alpha (TNF) α , interferon gamma (IFN) γ , Interleukin 1 beta (IL-1 β) in cell lysates obtained from experimental groups levels were analyzed. The effects of β -arbutin on apoptosis by Caspase 3 analysis, proliferation by Bcl-2 analysis and endoplasmic reticulum stress by GRP78 analysis in MCF-7 cells were determined by using cDNAs synthesized using total RNAs isolated from experimental groups. In immunohistochemical studies, the effects of arbutin on estrogen receptors and p53 levels in MCF-7 cells were determined.

At the end of the analyzes, it was determined that β -arbutin doses applied to MCF-7 cells did not affect oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in experimental groups. However, inflammation was induced by increasing proinflammatory stokin levels in cells treated with LD₅₀ of β -arbutin. In MCF-7 cells, β -arbutin increased genotoxicity in LD₁₀ and LD₅₀ doses. As a result of molecular and immunohistochemical analyzes, LD₅₀ dose of β -arbutin stimulated p53 and caspase 3 levels and increased apoptosis in MCF-7 cells. In addition, β -arbutin suppressed estrogen receptors at all doses administered to MCF-7 cells.

It can be thought that LD₅₀ dose of beta arbutin in MCF-7 cells increases the activation of apoptotic caspase 3 and decreases the activity of ERs via p53 induced by genotoxic and inflammatory effects. Investigation of how these effects of β -arbutin can contribute to the development of a new perspective in treatment. However, further studies are needed to address the interaction of β -arbutin with the ER signaling pathway and DNA.

2019, xii + 87 pages

Keywords: Cancer, MCF-7 cell line, Arbutin, Inflammation, Oxidative stress

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazım aşamasında yapmış olduğu büyük fedakarlıklarından dolayı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ömer HAZMAN'a,

Araştırma ve laboratuvar aşamasında analizlerin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan arkadaşlarım Hatice Kaya'ya ve Zehra KUMRAL'a,

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca ders aldığım, desteğini gördüğüm Doç. Dr. Laçine AKSOY'a,

İmmünohistokimya analizlerinde yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Fatih BOZKURT'a ve genotoksisite analizlerinde yardımını esirgemeyen Prof.Dr İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye,

Her konuda eleştirileriyle ve önerileriyle bana destekte bulunan çalışma arkadaşlarıma,

Ayrıca yüksek lisans çalışmalarına maddi anlamda 16.FEN.BİL.15 numaralı proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na,

Bütün öğrenim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen öğretmenlik yaptığım okuldaki öğrencilerime, başarılarımı görmeyi hayal ve hak eden ailem ve desteğini esirgemeyen Halide ZINGAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayşe Nur SARIOVA
AFYONKARAHİSAR, 2019

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	ii
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	3
2.1 Kanser Gelişimi	4
2.2 Dünyada ve Türkiye’de Kanser Hastalıklarının Dağılımı	5
2.3 Kanser Türleri	6
2.4 Meme Kanseri Gelişimini Etkileyen Faktörler	7
2.4.1 Meme Kanseri, Östrojen ve Östrojen Reseptörleri Arasındaki İlişki	9
2.4.2 Meme Kanseri, Yaşam Tarzı ve Obezite.....	12
2.4.3 Meme Kanserinde Yaş Faktörü ve Menapoza Girme Yaşının Etkisi.....	14
2.4.4 Meme Kanseri Riskini Azaltan Bir Faktör Olarak Doğum Yapma ve Emzirme.....	14
2.4.5 Meme Kanserinde Aile Öyküsü ve Genetik Olarak Meme Kanseri	15
2.5 Meme Kanserinin Sınıflandırılması.....	16
2.6 Meme Kanseri ve Oksidatif Stres	17
2.7 Meme Kanseri ve İnflamasyon	21
2.8 Meme Kanseri ve Endoplazmik Retikulum Sentezi	23
2.9 Meme Kanseri, Apoptoz ve Proliferasyon.....	26
2.10 Arbutin	26
3. MATERYAL ve METOT	32
3.1 Çalışmada Kullanılacak Hücre Hattı ve Kültür Ortamı.....	32
3.2 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi.....	33
3.3 Hücrelerin Çoğaltılması (Pasajlanması)	34
3.4 Hücrelerin Sayılması.....	35

3.5 MTT Hücre Viabilite Ölçüm Testi	36
3.6 Biyokimyasal Analizlerde Kullanılacak Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Yapılan Biyokimyasal Analizler.....	38
3.7 Genotoksisite Düzeylerinin Belirlenmesi İçin Yapılan Analizler	39
3.7.1 Comet Analizinin Yapılması	41
3.7.2 Mikronükleus Analizinin Yapılması	42
3.8 MolekülerAnalizler	43
3.8.1 RNA izolasyonu	43
3.8.2 Komplemanter DNA(cDNA) Sentezi ve RT-PCR Analizi	44
3.9 Immunohistokimyasal Analizler	45
3.10 İstatistiki Analizler.....	46
4. BULGULAR	48
4.1 MCF-7 Hücrelerinde Arbutinin Sitotoksisite Düzeyleri ve Lethal Dozları	48
4.2 MCF-7 Hücrelerinde β -arbutinin Genotoksisiteye Etkisi	51
4.3 β -arbutinin MCF-7 Hücrelerinde Oksidatif Strese Etkisi	52
4.4 β -arbutinin MCF-7 Hücrelerinde İnflamasyona Etkisi.....	53
4.5 β Arbutinin MCF-7 Hücrelerinde Apoptoza, Proliferasyona ve Endoplazmik retikulum Stresine Etkileri	54
4.5.1 LD ₀ dozunda β -arbutinin MCF-7 hücrelerinde Apoptoz, Proliferasyon ve Endoplazmik retikulum stresine etkisi.....	55
4.5.2 LD ₁₀ dozunda β -arbutinin MCF-7 Hücrelerinde Apoptoz, Proliferasyon ve Endoplazmik retikulum stresine etkisi	57
4.5.3 LD ₅₀ dozunda β -arbutinin MCF-7 Hücrelerinde Apoptoz, Proliferasyon ve Endoplazmik Retikulum Stresine Etkisi	58
4.6 MCF-7 Hücrelerinde β -arbutinin Östrojen Reseptörlerine ve p53 Seviyelerine etkisi	59
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	61
6. KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	87

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dH ₂ O	Distile su
Cr (VI)	Hekzavalent krom
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
OH [•]	Hidroksil radikali
Ma	Miliamper
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali

Kısaltmalar

BRCA1	Meme kanseri geni 1 (Breast cancer gene 1)
BRCA2	Meme kanseri geni 2 (Breast cancer gene 2)
CAT	Katalaz
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
HER2	Human epidermal reseptör-2
HK-2	Human kidney-2
IFN-γ	İnterferon gama
IL-1β	İnterlökin bir beta
JAK	Janus Kinaz
MCF-7	Meme kanseri hücre hattı
NF-κB	Nükleer faktör-kappa B
OSI	Oksidatif stres indeksi
p53	Tümör protein 53 (EC :2.7.1.37)
RAW	Fare makrofaj hücre hattı
RGC	Retinal ganglion hücreleri
RNS	Reaktif azot türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Super oksit dismutaz
STAT	Signal transducer and activator of transcription factor
TAS	Total antioksidan statü (total antioksidan kapasite)
TNF-α	Tümör hücre ölüm faktörü alfa (Tümör nekrozis factor α)
ELISA	Enzim-Linked Immuno Sorbent Assay
LPS	Lipopolisakkarit
UPR	Unfolded protein response
PBS	Phosphate buffered saline (pH=4)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Türkiye’de 2013 yılı itibari ile erkeklerde en sık görülen kanser türleri	6
Şekil 2.2 Türkiye’de 2013 yılı itibari ile kadınlarda en sık görülen kanser türleri	7
Şekil 2.3 Meme kanserinde risk faktörleri ve tedavileri amacıyla kullanılan yöntemler .	9
Şekil 2.4 Östrojenlerin yapısı	10
Şekil 2.5 Meme kanserinin sınıflandırılması.....	17
Şekil 2.6 Enzimatik antioksidanlar ve etki mekanizmaları	20
Şekil 2.7 Endoplazmik retikulum stresi ile apoptozis arasındaki ilişki.....	24
Şekil 2.8 Endoplazmik retikulum stresinin aracılık ettiği hastalıklar	25
Şekil 2.9 α -arbutin, β -arbutinin kimyasal yapıları	27
Şekil 2.10 α -arbutinin hidrokinon ve mikrobiyal enzimler yardımıyla biyolojik olarak sentezinde kullanılan yöntemler.....	28
Şekil 3.1 Hücre sayımında kullanılan hücre sayım lamı ve hücre sayımı yapılan hücreler	35
Şekil 3.2 DNA hasar dereceleri.....	39
Şekil 4.1 MCF-7 hücrelerinde α -arbutin ve β -arbutinin sitotoksitesi.....	49
Şekil 4.2 LD ₀ dozunda β -arbutinin MCF-7 hücrelerinde apoptoz, proliferasyon ve endoplazmik retikulum stresine etkisi	55
Şekil 4.3 LD ₁₀ dozunda β -arbutinin MCF-7 hücrelerinde apoptoz, proliferasyon ve endoplazmik retikulum stresine etkisi	57
Şekil 4.4 LD ₅₀ dozunda β -arbutinin MCF-7 hücrelerinde apoptoz, proliferasyon ve endoplazmik retikulum stresine etkisi.....	58
Şekil 4.5 Immunohistokimyasal değerlendirmede kullanılan hücrelerin mikroskop görüntüleri	60
Şekil 4.6 Östrojen (E ₂) etki mekanizmaları.....	66
Şekil 4.7 LD ₅₀ dozunda MCF-7 hücrelerine uygulanan β -arbutinin antikanserojenik etkilerinin oluşmasına aracılık eden mekanizma	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Türkiye’deki ve dünyadaki kadınlarda ve erkeklerde yaşa göre kanser dağılımı	5
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan besiyerinin (medium) bileşenleri.....	32
Çizelge 3.2 Çalışmalarda oluşturulan deney grupları ve yapılan uygulamalar	37
Çizelge 3.3 Lizis çözeltisinin hazırlanması	41
Çizelge 3.4 Elektroforez çözeltisinin hazırlanması	41
Çizelge 3.5 Nötralizasyon çözeltisinin hazırlanması	41
Çizelge 3.6 KCl çözeltisinin hazırlanması	42
Çizelge 3.7 Oliganükleotit primer dizileri ve RT-PCR programları	44
Çizelge 4.1 α -arbutinin MCF-7 hücrelerindeki Lethal Dozları	49
Çizelge 4.2 β -arbutinin MCF-7 hücrelerindeki Lethal Dozları	50
Çizelge 4.3 β -arbutinin MCF-7 hücrelerinde DNA hasarı ve mikronükleus oluşumuna etkisi.....	51
Çizelge 4.4 TAS, TOS ve OSI seviyeleri	53
Çizelge 4.5 Proinflamatuvar stokin ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ ve $\text{IFN-}\gamma$) düzeyleri	54
Çizelge 4.6 MCF-7 hücrelerinde β -arbutinin p53 ve ER’lerine etkisi	59

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 4.1 Deney gruplarına ait hücrelerin mikroskop görüntüleri.....	50
---	----



1. GİRİŞ

Kanser dünyada ve ülkemizde insanları fiziksel, psikolojik, ekonomik ve sosyal yönden etkileyen hastalıkların başında gelmektedir. Tedavi için pek çok yöntem bulunmakla birlikte; genelde cerrahi yaklaşım, radyoterapi ve kemoterapi en çok tercih edilen yöntemler arasındadır. Bu tedavi yöntemlerinden özellikle kemoterapi ve radyoterapinin yan etkileri hasta yaşamını çok etkilemektedir. Bu durum, bilim insanlarını yan etkisi daha az olabilecek doğal alternatif yöntemler araştırmaya yönlendirmiştir. Bu bağlamda bitkilerin ve bitkilerden elde edilen antikanser etkili olabilecek bileşenlerin etkileri hücre içi ve hücre dışı deney modelleriyle denenmeye başlanmıştır. Türkiye İstatistik Kurumunun yapmış olduğu çalışmalarda Türkiye'deki 5 ölümden 1'inin kanserden olduğu gözlenilmiştir. Türkiye'de 2014 yılında gerçekleşen 375 bin 291 ölümden %20,7 sinin kanserden olduğu tespit edilmiştir. Bu oran ile kanser, toplam ölümlerin %40,4 ünün oluşturan dolaşım sistemleri hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır. Avrupa Birliğinin verilerinden olan 2011 yılı raporları incelendiğinde Avrupa daki her dört ölümden birinin kanserden kaynaklandığı görülmektedir (İnt.Kyn.2).

Türkiye'de ve dünyada kanser hastalığının bu kadar çok görülmesi ve ölüm nedenleri arasında en üst seviyede yer alması nedeni ile kanser hastalığı artık bir sağlık sorunu olmasının ötesinde ekonomik ve sosyal açıdan bir toplum sorunu haline gelmiştir. Bu bağlamda bitkilerin ve bitkilerden elde edilen antikanser etkili olabilecek bileşenlerin etkileri öncelikle in vivo ve in vitro deney modelleri ile laboratuvarlarda, tedaviye etkisi olduğu gözlenenler ise kliniklerde gönüllüler üzerinde denenmeye başlamıştır. Bu kapsamda armut, dut ağacı gibi bitkilerin olgun yapraklarının kurutulması sonucu elde edilen eksraktların temel bileşenlerinden biri olan arbutinin; cilt kanseri üzerine etkili olabileceği birçok çalışma ile gösterilmiştir (Deisinger *et al.* 1996).

Sunulan tez çalışmasında öncelikle MCF-7 hücrelerinde α ve β arbutinin sitotoksitesi analiz edilmiştir. Bu analizler sonucunda belirlenen dozlar kullanılarak arbutinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde oksidatif strese, apoptoza, proliferasyona, endoplazmik retikulum stresine, östrojen reseptörlerine ve inflamasyona etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçların arbutinin klinik amaçlı kullanım adına mevcut bilgilere katkı sağlanabileceği düşünülmüştür.

Sunulan tezde öncelikle kanser ve meme kanseri hakkında temel ve teorik bilgilere değinilmiştir. Sonrasında ise “MCF-7 hücrelerinde arbutinin inflamasyon ve oksidatif stres üzerine etkileri” olan proje ismini de karşılayacak şekilde, literatürde arbutinin antikanserojen etkilerini araştırmaya yönelik yapılan son çalışmaların sonuçları derlenerek sunulmaya çalışılmıştır. Literatür bilgileri sunulduktan sonra çalışmada kullanılan meteryaller ve analizlerde kullanılan metotlar verilmiştir. Laboratuvar analizlerinden elde edilen ham verilerin istatistik programları ile analiziyle elde edilen bulgulara sunulan tez metninde yer verilmiştir. Tüm sonuçlar, tartışma ve sonuçlar ana başlığı altında sunulmuş olup, elde edilen veriler ile literatür özeti kısmında da sunulan bilgiler ilişkilendirilerek çalışmanın özgünlüğü ifade edilmeye çalışılmıştır.



2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

Asırlar boyunca kanser insan ve hayvanlarda sık görülen hastalıklar arasında yer almıştır. Kanser hakkında bilinen en eski kayıtlar M.Ö 3000 yılına kadar uzanmaktadır. Kanser kelimesi Latince yengeç anlamına gelen “cancer” veya “carcinos” kelimelerinden türemiştir. Tümör terimi ilk defa M.Ö 3.yüzyılda tümörün etrafındaki şişmiş damarları bir yengecin bacaklarına benzettiği için Hipokrat tarafından kullanılmış, Yunan doktor Galen ise şişme anlamına gelen “oncos” terimini kullanmıştır (Baykara 2016). Geçmişten günümüze elde edilen bilgiler genel olarak toparlandığında kanser, bir organizmadaki hücrelerin çeşitli etkiler (kanserojenik etkiler) sonucunda değişime (mutasyona) uğrayarak özelliklerini kaybetmesi ile kontrolsüz bir şekilde ve oranda çoğalarak, önce bulundukları dokunun sonrasında ise tüm vücudun işlevini olumsuz etkilemeye başlayan bir hastalık olarak tanımlanabilir.

Kanser dünyada mortalitesi sürekli artan toplumsal sorunlardan biridir. Her yıl dünya da 8 milyondan fazla insana kanser tanısı konmaktadır. Yapılan çalışmalar kanserden sağlıklı diyet ve doğru yaşam tarzı ile korunulabileceğini göstermektedir (Anand *et al.* 2008 and Jemal *et al.* 2010). Bununla beraber sağlıklı yaşam tarzını benimsemiş kişiler de bile kanser vakaları görülebilmektedir.

Kansere yakalandıktan sonra özellikle erken dönemde tanının konması tedavide başarı şansını artırmaktadır. Kanser tedavisinde cerrahi yaklaşım, radyoterapi ve kemoterapi yıllardan beri kullanılmaktadır. Mevcut tedavi yöntemlerinin yan etkileri ve hastaların yaşam tarzına olumsuz etkileri nedeniyle konunun paydaşlarını ve bilim insanlarını daha doğal ve yan etkisi az olabilecek alternatif yöntemler araştırmaya yönlendirmiştir. Bu bağlamda bitkilerin ve bitkilerden elde edilen antikanser etkili olabilecek bileşenlerin etkileri öncelikle in vivo ve in vitro deney modelleri ile laboratuvarlarda, tedaviye etkisi olduğu gözlenenler ise kliniklerde gönüllüler üzerinde denenmeye başlanmıştır. Yapılan araştırmalar antioksidan özellikleri ile öne çıkan birçok doğal aktif maddenin düşük dozlarda organizmada koruyucu rol oynarken, yüksek dozlarda kanser hücreleri üzerinde öldürücü rol üslenebileceğini göstermektedir.

2.1 Kanser Gelişimi

Günümüzde kanser hücreleri iki temel kalıtsal özellik ile tanımlanır. Bunlar; kanser hücrelerinin hücre bölünmesindeki normal sınırlamaları aşarak çoğalması ve normalde diğer hücrelere ayrılmış alanlara yayılarak yerleşmeleridir. Hücrelerin çoğalması denetim altında değilse, bir tümör ya da neoplazmaya yani aşırı büyüyen anormal hücreler kitlesinin (neoplastik hücreler) oluşumuna neden olur. Neoplastik hücreler tek bir kitle içinde küme halinde durdukları sürece bu tümör iyi huylu olarak isimlendirilir. Bu durumda kitle, cerrahi yolla çıkartılarak tam tedavi sağlanabilir. Ancak bir tümör kötü huylu ise, yani hücreleri etrafındaki dokuyu istila yeteneği kazanmışsa kanser olarak kabul edilir (Alberts *et al.* 2008).

Kanser gelişimi başlangıcından itibaren dört uzun zamanlı faz ile ele alınabilir (Adam *et al.* 2013). Kanser gelişimi ile ilişkili olarak söz konusu gelişim fazları aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

- İndüksiyon fazı; 30 yıl veya daha uzun sürelidir. Radyasyon ve toksinler gibi kanser yapıcı etkenlere maruziyet sonucu kanser gelişiminin başladığı fazdır. İnsan kanserinin yaklaşık 3/4 ünün çevresel etkenler nedeniyle olduğu ifade edilmektedir (Adam *et al.* 2013).
- İnsüte fazı; Bu fazda kanser gerçekten vardır. Ancak, başlangıç alanında bölgesel olarak kalır ve diğer dokulara yayılmaz.
- İnvazyon fazı; Bu fazda, kanser hücreleri çoğalır ve yüzey alandan derin dokulara ilerler. Böylece damarlara ve lenfotik kanallara metastaz yapar.
- Disseminasyon fazı; doku içine tamamen girmiş olan kanser hücreleri, vücutta çeşitli doku ve organlarına yayılır.

Başlangıç fazları olan induksiyon ve insüte fazları sonunda kanser gelişimi organizmada tamamlanmış olsa bile çoğunlukla hissedilir belirtiler ortaya çıkmaz. Hastalığın bu döneminde olan hastalar, çoğunlukla düzenli tarama testlerini yaptırıyorsa veya başka bir hastalık nedeni ile analizler yapılırken hastalıklarını öğrenebilmektedirler. Bu nedenle belirli yaştan sonra, özellikle toplumda sık görülen kanser türleri ile ilgili taramaların yapılması hem toplum sağlığı hem de birey sağlığı açısından çok önemlidir.

Çünkü kanser gelişimi tanısının indüksiyon fazında konması, erken tanı olarak tanımlanmakta ve hastalığın tedavisi kolaylıkla yapılabilmektedir. İnsüte fazda kanser gelişimini tamamlasa da, diğer dokulara yayılmadığı (metastaz yapmadığı) için tedavisi daha kolaydır. Fakat gelişimi açısından üçüncü ve dördüncü faz olan invazyon ve disseminasyon fazlarına geçen kanser hastalığının tedavisi çok daha zor olmaktadır.

2.2 Dünyada ve Türkiye’de Kanser Hastalıklarının Dağılımı

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de her geçen gün görülen kanser vakalarının sayısı ve oranında artış görülmektedir. Çizelge 2.1 incelendiğinde ülkemizde erkeklerde görülen kanser vakalarının dünya ortalamasının üzerinde olduğu, kadınlarda ise ortalamanın altında kaldığı görülebilir. Tablo incelendiğinde ABD ve Avrupa Birliği (AB) gibi gelişmiş ülkelerde görülen kanser vaka sayısının Türkiye’ye göre daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır (İnt. Kyn. 2). Türkiye ile Avrupa Birliği verileri kıyaslanırken yaş kriterleri göz önünde bulundurulacak olursa AB’deki 65 yaş altı ölümlerin % 38’inin, 65 yaş ve üstü ölümlerin ise % 25’inin kanserden kaynaklandığı görülmüştür. Türkiye’ de ise bu oran % 28 olarak belirtilmiştir (İnt. Kyn.1).

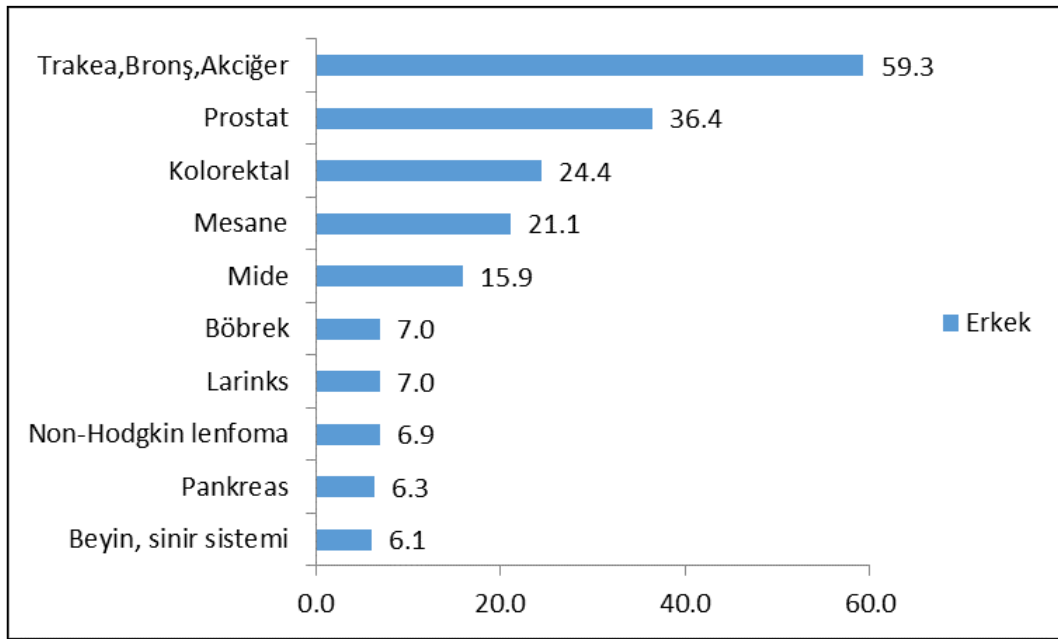
Çizelge 2.1 Türkiye’deki ve dünyadaki kadınlarda ve erkeklerde yaşa göre (100.000 kişide) kanser dağılımı (İnt.Kyn.2). IARC (Amerika Birliği Ülkeleri), AB (Avrupa Birliği), ABD (Amerika Birleşik Devletleri)

	ERKEK	KADIN
DÜNYA	204,9	165,2
IARC’a ya üye 24 ülke	235,4	192,1
AB (28 ülke)	311,3	241,4
ABD	347,0	297,4
TÜRKİYE	220,3	156,8

Klinik verilerin kullanılması ile oluşturulan istatistiki bilgiler, ülkemizde görülen ilk beş kanser türüyle dünyadaki ve diğer gelişmiş ülkelerdeki kanser türlerinin birbiri ile benzediğini ifade etmektedir. Bu bağlamda erkeklerde trakea, bronş ve akciğer kanseri, kadınlar da ise meme kanseri en sık görülen kanser türleri olarak öne çıkmaktadır (İnt Kyn.2).

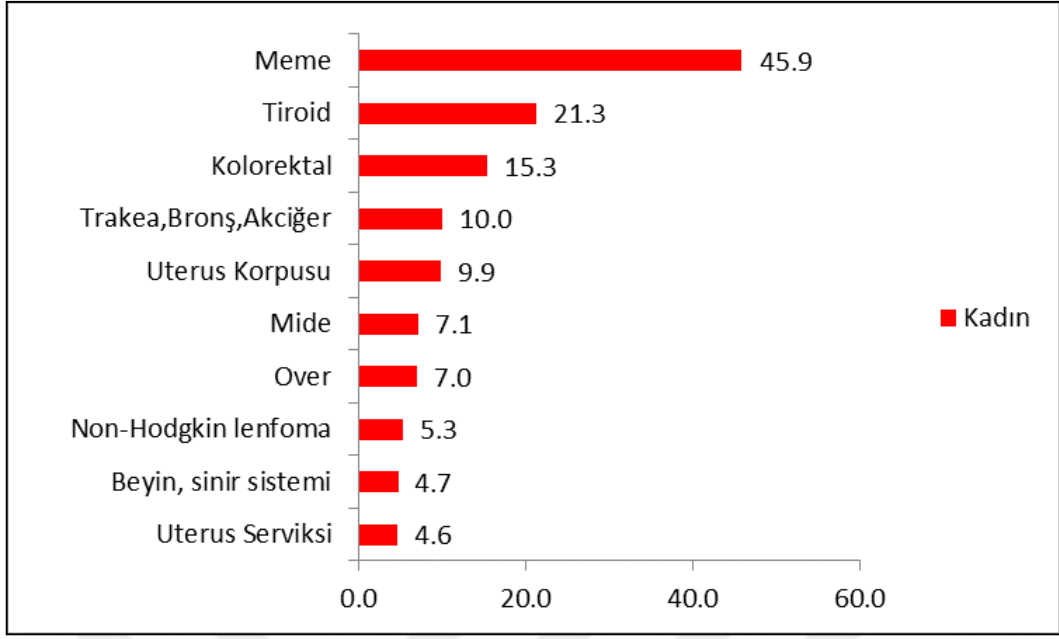
2.3 Kanser Türleri

Kanser vücudumuzda görüldüğü doku ve organa göre farklı isimler alabilir. Hatta aynı organda bulunan farklı dokularda bile farklı özellikte kanser gelişimi görülebilir. Bu bağlamda yüze yakın kanser türü olduğu bilinmektedir. 2013 verilerine göre ülkemizde erkeklerde en sık görülen ilk beş kanser türü en fazla görülme sıklığına göre çoktan aza doğru; solunum yolu ile ilgili kanserleri (trake, bronş ve akciğer kanserleri), prostat, kolorektal, mesane ve mide kanserleri şeklinde sıralanabilir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Türkiye’de 2013 yılı itibari ile erkeklerde en sık görülen kanser türleri (İnt. Kyn. 2).

Bayanlarda ise en sık görülen kanser türü olarak yüksek bir oranla meme kanseri öne çıkmakta (Şekil 2.2); sonrasında ise tiroid, kolokteral, solunum yolu ile ilgili kanserler ve uterus korpusu kanseri gelmektedir (İnt. Kyn.2).



Şekil 2.2 Türkiye’de 2013 yılı itibari ile kadınlarda en sık görülen kanser türleri (İnt. Kyn.2).

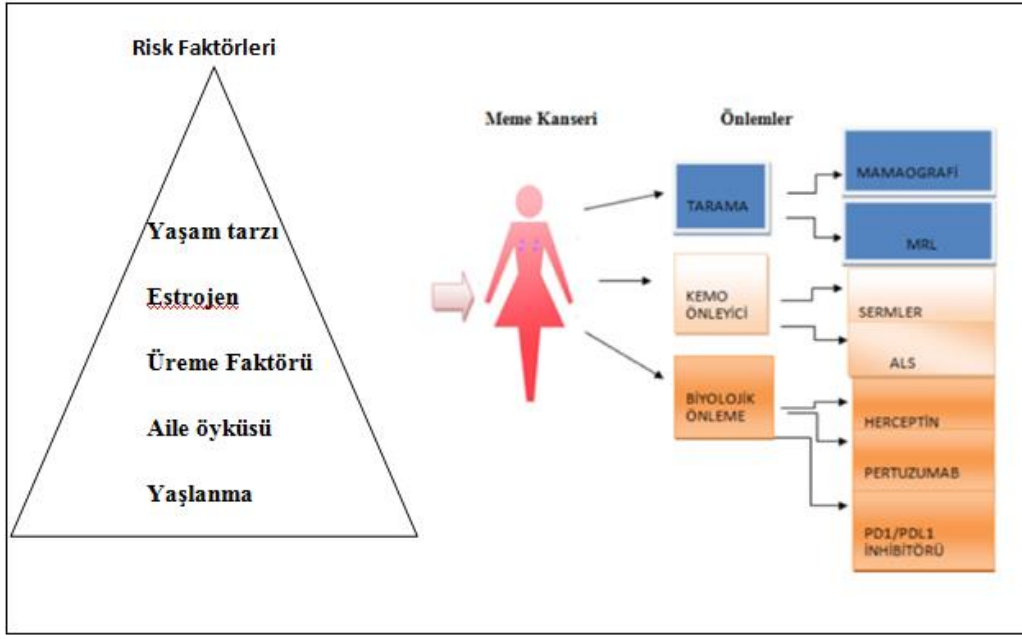
Bu tezde MCF-7 hücre hattında yapılacak olan araştırmalarla ele alınması düşünülen meme kanserinin tedavisi ve önleyici yöntemlerin geliştirilmesinde büyük ilerleme kaydedilmiştir. Patogenez ve tümör ilaçlarına dirençli mekanizmalar, meme kanseri kök hücreleri keşfedilerek ortaya çıkarılmakta ve meme kanseri ile ilgili birçok gen bulunmaktadır. Günümüzde insanlar meme kanserinin tedavisinde daha fazla ilaç seçeneğine sahiptirler. Biyolojik önleme son zamanlarda hastaların yaşam kalitesini iyileştirmek için geliştirilmiştir (Sheng-Yi *et al.* 2017). Bu kapsamda meme kanseri ile ilişkili olabilecek risk faktörlerine göre kişiler bilinçlendirilmekte, risk altında olduğu belirlenen bireyler ise takibe alınabilmektedir.

2.4 Meme Kanseri Gelişimini Etkileyen Faktörler

Meme kanseri kadınlarda en sık rastlanan kanser türü olup, kansere bağlı olarak ölüm sıralamasında ikinci sırayı almaktadır. Hastalığın temel sebebinin biyolojik mekanizmalardan kaynaklanabileceği belirtilmektedir. Bu kapsamda meme kanserinin oluşmasında etkili olabilecek risk faktörleri temel olarak iç ve dış risk faktörleri olarak sınıflandırılabilir (Libson and Lippman 2014).

- İç faktör olarak; ilk adet (menstrüasyon) yaşı, ilk hamilelik yaşı, hamilelik sayısı, meme kanserli birinci derece akraba sayısı (genetik faktörler), menopoz yaşı, biyopsiler ve atipik duktal hiperplazi (meme süt kanalları) gösterip göstermediği iken;
- Dış faktör olarak; boy, kilo, alkol, çeşitli hastalıkların tedavisinde hormonal tedavilerin kullanımı, kanserojen özellikli kimyasallara maruziyet gibi faktörler gösterilebilir.

Meme kanserinde risk faktörlerini azaltmak, meme kanserini önlemek ve tedavi için üç temel strateji izlenebilir (Şekil 2.3). Bunlar belirli yaştan sonra yapılacak mamografi gibi tarama testleri, hastalık oluştuktan sonra çoğunlukla ER⁺ meme kanserli hastalar için kullanılan kemoönleyici tedavi protokolleri ve biyolojik olarak meme kanserini önlemeye yönelik tedavi protokolleri olarak sıralanabilir. Bir kadının yaşı, aile öyküsü, ırk ve üreme faktörleri meme kanseri riskini belirlemek için yaygın olarak kullanılan parametreler olmasına rağmen, meme kanseri risk oranını tam olarak değerlendirmek için net bir strateji geliştirilememiştir. Gelişen teknoloji ile birlikte sekanslama teknolojisindeki gelişmelerle bireysel genom sekanslama, meme kanseri riskini değerlendirmek için güçlü bir yöntem olabilir (Sheng-Yi *et al.* 2017). Latin Amerika’da meme kanseri konusundaki risk faktörleri ile ilgili yapılan çalışmalar (27 adet çalışma) incelendiğinde, hastalığın en erken teşhisinin bilinçli kadınların kendi kendilerine uyguladıkları meme muayenesi ile yapılabildiğini göstermektedir. Bu veriler meme kanserinde teşhis için toplumun konu ile ilgili olarak bilgilendirilmesinin ne kadar önemli olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca gelir ve eğitim düzeyi gibi sosyo-ekonomik faktörlerin de meme kanseri riski üzerinde etkili değişkenler olduğu ifade edilmektedir (Ferreira *et al.* 2017).



Şekil 2.3 Meme kanserinde risk faktörleri ve tedavileri amacıyla kullanılan yöntemler (Sheng-Yi 2017).

Bu bilgiler ışığında meme kanserinde risk faktörlerini azaltmak için; bireylerin hareketsiz yaşam tarzı yerine günlük fiziksel aktivitelerin yer aldığı bir yaşam tarzına geçmelerinin yararlı olacağı söylenebilir. Ayrıca sağlıklı beslenmeye dikkat edilmesi, alkol alımının azaltılması, bazı hastalıklarda mecbur kalınmadıkça hormonal tedavilere başvurulmamasının meme kanseri riskini azaltılabileceği ifade edilebilir.

2.4.1 Meme Kanseri, Östrojen ve Östrojen Reseptörleri Arasındaki İlişki

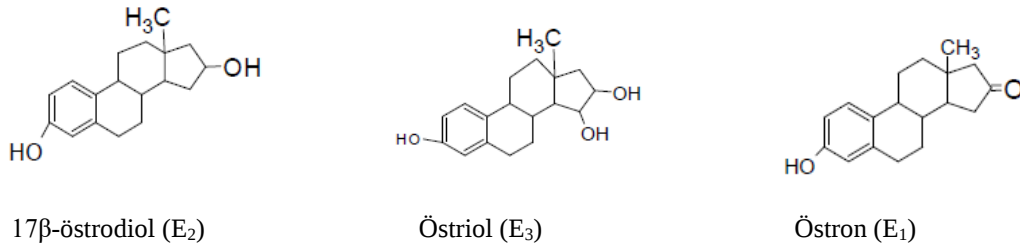
Metabolizmanın kontrolü, integrasyonu ve koordinasyonundan endokrin sistem sorumludur. Hormonlar, endokrin sistemde dokular arası haberleşmeyi sağlayan kimyasal moleküllerdir. Bu bağlamda östrojen hormonları hem kadınlarda hem de erkeklerde salgılanan cinsiyet hormonları olup, bayanlarda erkeklere oranla daha yüksek miktarlarda sentezlenmektedir.

Östrojen hormonları erkeklerde; östradiol olarak erkek cinsel fonksiyonunda kritik bir rol oynamaktadır. Testosteronu östrojene dönüştüren enzim, aromatazin yanı sıra östrojen reseptörleri, beyin, penis ve testis gibi cinsel işlev için önemli organlarda bol

miktarda bulunur. Beyinde, cinsel uyarılma ile ilgili alanlarda östradiol sentezi artar. Ayrıca peniste, corpus cavernosum boyunca nörovasküler demetler çevresinde yüksek konsantrasyonda östrojen reseptörleri yer almaktadır (Schulster *et al.* 2016).

Çeşitli dokularda sentez edilebilen ve dişilik özelliklerin gelişmesinde etkin rol alan östrojenler ve progesteronun bayanlardaki en önemli sentez yerleri overler ve plasentadır (Onat *et al.* 2006). Normal meme dokusu dişi seksüel hormonlara bağımlı olduğundan, meme dokusundan köken alan tümörlerin bu hormonlardan etkilenmeleri doğaldır. Fakat burada hormonlar direkt olarak değil, indirekt olarak polipeptid büyüme faktörlerinin (IGF, EGF, α TGF) oluşumu üzerinden etkilidirler. Bu nedenle de, meme kanserlerinin tedavisinde östrojenlerin antiöstrojenizasyonu büyük önem taşımaktadır (Kalaycıoğlu 2013).

Doğal olarak oluşan östrojenler üç tiptir. Bunlar (Şekil 2.4); östrojenik aktiviteli östron (E_1), 17β -östradiol (E_2) ve östriol (E_3) isimli üç bileşik overlerden ve idrardan izole edilmiştir. Seksüel olgunluğa erişmiş bir kadının kanında en fazla over kaynaklı 17β -östradiol (E_2) bulunmaktadır. Postmenopozal dönemde ise kanda bulunan temel östrojen, östrondur. Genel östrojenler steroid hormon ailesi içinde yer alan özel reseptörlerine bağlanarak etkilerini göstermektedir. Hormon reseptör kompleksi oluşturduktan sonra DNA yapısındaki hormon yanıt elementine bağlanmakta ve ilgili genlerde transkripsiyon aşaması kontrol edilerek hormonal etkiyi ortaya çıkarmaktadır (Onat *et al.* 2006).



Şekil 2.4 Östrojenlerin yapısı

Bayanlarda yaşam boyunca yumurtalık hormonlarına (östrojen gibi) maruz kalma meme kanserinin gelişmesinde etkilidir. Östrojen hormonları içerisinde erişkin bayanlarda östrojenik etkileri en fazla öne çıkan hormon 17β -östrodiol (E_2) olduğu için, hastalıklarla ilişkili araştırmalarda ve tedavi geliştirme programlarında östrojen denildiğinde genellikle 17β -östrodiol (E_2) akla gelmektedir. Bu nedenle tezin bundan sonraki kısmında da östrojen ile ilişkili bilgiler sunulurken temelde 17β -östrodiol (E_2) hormonuna ait bilgiler sunulmuştur.

Organizmada östrojen ve progesteron düzeylerinin gerekenden yüksek olması; genotoksisite oluşturmalarının yanında, hücre çoğalmasını da arttırarak meme kanserine neden olur. Bununla birlikte erken ve geç menapozun yanı sıra yüksek seviyede endojen östrojen seviyeleri de meme kanseri riskini artırabilir. Östrojen reseptörü pozitif (ER^+)/progesteron reseptörü pozitif (PR^+) tümörleri olan kadınlar, hormonal tedaviye daha duyarlıdır ve östrojen reseptörü negatif (ER^-)/progesteron reseptörü negatif (PR^-) tanısı olanlardan daha iyi prognoza sahiptir (Setiawan *et al.* 2009).

İsveç'te yapılan bir çalışmada, menopoz sonrası hormon tedavisinin yanı sıra üreme, antropometrik (insan vücudunun boyutları) ve diğer çeşitli meme kanseri risk faktörleri olan kadınlara menopozal hormon tedavisi yapılmış ve reseptör durumuna göre meme kanseri riski arasındaki ilişki postmenopozal döneme göre açıklanmaya çalışılmıştır. Çalışma menopoz sonrası postmenopozal kadınlarda, 1993-1995 yılları arasında meme kanseri tanısı konan, 50 ile 74 yaşları arasındaki 3.065 kişi arasında yapılmıştır. Bu hastalarda 332 ER^- ve PR^- , 286 ER^+ ve PR^- , 71 ER^- ve PR^+ , 1,165 ER^+ ve PR^+ , bilinmeyen reseptör durumu olan 789 tümör tespit edilmiştir. İlk doğumu 20 ile 24 yaşları arasında yapan kadınlarla, 30'lu yaşlarda doğum yapan kadınlar karşılaştırıldığında, ER^+ ve PR^+ olan tümörlerin yüksek risk altında olduğu belirtilmektedir. Yetişkinlik döneminde 30 kg'dan fazla kilo alan kadınlarda bu risk oranının 3 kat arttığı görülmüştür. Fakat ER^- ve PR^- özelliğinde olan tümörlerde herhangi bir risk artışı gözlenmemiştir. Hormon tedavisi yapılmayan kadınlar ile menopozal östrojen ve progestin tedavisini en az 5 yıl boyunca kullanan kadınlar da ise ER^+ ve PR^+ tümörlerinde artış olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, meme kanseri risk faktörlerinin çoğunun, tümörün içerdiği reseptörle ilişkili olabileceği belirtilmektedir.

Bununla birlikte, ilk doğumda yaş, menopoz sonrası obezite ve östrojen-progestin gibi menopozal hormon tedavisi kullanımı, reseptör pozitif meme kanseri için reseptör negatif meme kanserinden daha güçlü risk faktörü olduğu ifade edilmektedir (Rosenberg *et al.* 2006). Meme kanserinin yaş ile birlikte artmasına rağmen, menopozdan sonra artış hızının yavaşladığı görülmüştür. Çünkü menapozla beraber östrojen seviyelerinin azalması sonucu ER reaktivasyonuna cevap olarak gelişen transkripsiyonel, büyüme, apoptoz ve moleküler değişiklikler meme kanserin riskini azaltmaktadır (Hosford *et al.* 2019).

2.4.2 Meme Kanseri, Yaşam Tarzı ve Obezite

Yaşam tarzı tüm hastalıklarda olduğu gibi meme kanseri için de en önemli risk faktörleri arasındadır. Meme kanseri açısından dış veya çevresel faktörler olarak ifade edebileceğimiz stresli yaşam, düzensiz beslenme, kötü alışkanlıkların (alkol, sigara gibi) organizmada oluşturduğu zararlar ve fiziksel inaktivite gibi faktörler hem meme kanserinin hem de diğer hastalıkların oluşmasına zemin hazırlayabilmektedir.

Meme, uterus korpusu ve over gibi kadın kanserlerinde yaşam tarzı ile ilişkili olarak en önemli risk faktörlerinden birisi de obezitedir. Obezitenin etkili olduğu kanserler daha çok kadınları etkilemektedir. Bu nedenle obezite ile ilişkili kanserlerin örüntüsü incelendiğinde kadınlarda hızın erkeklere göre yüksek olması beklenen bir durumdur (İnt. Kyn. 2).

Obezite, aslında yalnızca kanser başlangıcı değil, aynı zamanda ilerlemesini destekleyebilecek metabolik kusurlarla da ilişkilidir. Yağ kütle deposu olarak düşünülen adipoz doku aynı zamanda yaygın endokrin organ olarak tanınmaktadır. Adipoz dokunun insan fizyolojisinin glikoz ve lipit metabolizmasını dengeleyen, insülin duyarlılığını artırıcı, bağışıklık sistemini düzenleyici ve antiapoptotik etkiler ortaya koyan birçok işlevi olabileceği gösterilmiştir (Tumminia *et al.* 2019).

Adipoz dokunun endokrin kanserler üzerindeki antineoplastik etkilerini iki ana mekanizma ile gösterebileceği belirtilmektedir. İlk olarak, reseptör aracılı yollar etkisi

ile doğrudan kanser hücrelerini uyararak tümör dokusunun proliferasyonuna neden olabilir. İkinci olarak ise; insülin duyarlılığını, inflamasyonunu ve tümör anjiyogenezini modüle ederek dolaylı yoldan kanser biyolojisini etkileyebileceği gösterilmiştir. Adipoz dokunun meme kanseri büyümesi üzerindeki etkisinin ER α ekspresyonu ile ilgili olarak farklı olabileceği de öne sürülmüştür. Çalışmaların çoğu ER α negatif meme kanseri hücrelerinde adipoz dokunun proliferatif ve proapoptotik bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Tumminia *et al.* 2019).

Batı dünyası bulaşıcı hastalıklarla mücadele ederken, bu hastalıklara çözüm yolu bulmuş fakat geçen süre içinde obezite, hiperglisemi ve hiperlipidemi hızının önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Obezite; zamanla vücuda alınan enerji ihtiyacının zamanla daha da artması ile ortaya çıkan aşırı yağ birikimi olarak tanımlanabilir. Obeziteyle beraber meme adipoz dokusunda spesifik metabolik değişiklikler, pro-tümörijenik mikroortamın oluşturulması yoluyla meme kanserinin ilerlemesi ile ilişkilendirilmektedir (Strober *et al.* 2019).

Obezite ve metabolik sendrom; düzensiz adipokin (yağ dokudan salınan stokin ve kemokinler) metabolizmasının oluşmasına neden olabilmektedir. Adipokin metabolizmasında oluşan bu düzensizliklerin bir meme kanseri türü olan TNBC (üçlü negatif meme kanseri) oluşumunda da önemli risk faktörü olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca TNF- α , MCP-1 ve Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)-21 gibi bazı adipokinlerin, meme kanserinin ilerlemesinde doğrudan rol oynayabileceği belirtilmektedir (Strober *et al.* 2019).

Yapılan çalışmalar aşırı kilo ve şişmanlığın, menopoz sonrası meme kanseri riskini artırabileceğini göstermektedir. Obez kadınlarda menopoz sonrası meme kanseri riskinin artmasının, obeziteyle ilişkili olarak östrojen üretiminin yüksek olması ve östrojene endojen olarak maruz kalınması ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir. Bununla birlikte, bazı çalışmalar premenopozal (menopoz öncesi dönem) yaşlarda aşırı kilolu veya obez olan kadınların normal vücut ağırlığına sahip kadınlara kıyasla daha az meme kanseri riskine sahip olabileceğini göstermiştir. Bu ters ilişki için potansiyel bir biyolojik mekanizma olarak premenopozal kadınlar arasında aşırı kilo ve şişmanlığın

anovülasyon ve düşük dolaşımdaki östrojen seviyeleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Odotola *et al.* 2019).

2.4.3 Meme Kanserinde Yaş Faktörü ve Menopoza Girme Yaşının Etkisi

Kadınlarda yaşam; çocukluk, ergenlik, cinsel olgunluk, menopoz ve yaşlılık olmak üzere beş dönemden oluşur. Bu dönemlerden her biri kendine özgü fiziksel, psikolojik ve hormonal farklılıklar gösterir. Her dönemin kendine göre özellikleri olmasına karşın, ergenlik ve menopoz dönemleri kadın yaşamındaki etkileri ile en önemli dönemlerdir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) tanımına göre menopoz; ovaryum aktivitesinin yitirilmesi sonucunda menstrüasyonun kalıcı olarak sonlanmasıdır. Dünyada ortalama menopoz yaşı 51 iken, bu oran 45-55 arasında değişmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde menopoz yaşı gelişmiş ülkelere göre daha erkendir. Gelişmiş ülkelere 49.3 ile 51.4 aralığının da iken, gelişmekte olan ülkelere 43,5 ile 49.4 arasındadır. Örneğin, Ürdün'de 50-51, Türkiye'de 47 ve Mısır'da 48'dir. Menopoz dönemine giriş zamanının erken veya geç oluşunda bazı faktörler etkili olmaktadır. Çalışan kadınlar ve sigara içen kadınlar menopoza erken girerken, seksüel yaşantısı devam eden, çok doğum yapmış, bekâr veya boşanmış kadınlarda menopoz daha geç görülmektedir. Yaş, aile geliri, eğitim düzeyi, çocuk sayısı, sağlık durumu, menopozal dönem şiddeti gibi durumlar ile menopozal semptomları arasında bir ilişki bulunmaktadır. Menopoza girilen dönemde, östrojen hormonunun azalmasına bağlı olarak kadınlarda hormonal, fiziksel ve duygusal değişimler meydana gelmektedir (Özcan and Oskay 2013). Bununla birlikte bayanlarda çeşitli çevresel faktörlerin etkisiyle menopoza olması gerekenden erken veya geç girilmesi endojen östrojen seviyelerini etkileyeceği için meme kanseri riskini artırabilir (Setiawan *et al.* 2009).

2.4.4 Meme Kanseri Riskinin Azaltan Bir Faktör Olarak Doğum Yapma ve Emzirme

Bir kadının emzirme öyküsü var ise meme kanseri oranların da azaldığı görülmüştür. Hamilelik ve emzirme döneminde seksüel hormonların sentez ve salgılandığı değişikliklerin meme kanseri açısından koruyucu etkili olabileceği ifade edilmektedir

(Shah *et al.* 2014). Nitekim 30 farklı ülkede 50302 meme kanserli, 96973 sağlıklı kadınla yapılan bir araştırmada; kadınlarda yapılan her bir doğumun %7, doğum sonrası annelerin çocuklarını emzirdiği her bir yıl %4,3 meme kanseri riskinin azaldığı belirlenmiştir (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2002).

Emzirme ile ilişkili olarak kadınlarda kanser riskini etkileyen faktörler anne sütünün içeriği ile de ilişkilidir. Yapılan çalışmalar anne sütünde bulunan α -laktoalbumin, antiinflamatuvar stokinler (IL-10 ve IL-12 gibi), immunoglobulinler ve transforming growth faktör (TGF- β) gibi büyüme faktörlerinin bebek gelişimini desteklerken, bu bileşiklerin üretimi sırasında annenin metabolizmasını olumlu yönde etkilediği ve böylelikle meme kanserine karşı koruyucu etkiler gösterebileceği ifade edilmektedir (Botelho *et al.* 2013).

2.4.5 Meme Kanserinde Aile Öyküsü ve Genetik Olarak Meme Kanseri

Bir ailenin fertlerinde meme kanserinin geçmişte görülmüş olması, hastalığın genetik olarak oluşmasına zemin hazırlayan olası mutasyonların bir sonraki nesile aktarılmış olabileceğini akla getirmektedir. Literatürde yapılan çalışmalar (Loman 2003, Rawal *et al.* 2006 and Joyce *et al.* 2015). Değerlendirildiğinde meme kanseri aile öyküsü olan bireyler açısından, özellikle de birinci derece akrabalar meme kanseri açısından önemli bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir.

Yapılan bir çalışmada meme kanseri teşhisi konan 8868 hastanın 31235 birinci derece akrabası belirlenmiş, belirlenen bu akrabalar arasındaki meme kanseri, yumurtalık ve diğer kanserler için var olabilecek riskler, bireyler 50 yaşına gelmeden önce tahmin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar genel olarak; 674 meme kanseri vakasının %39'u ve 143 yumurtalık kanseri vakasının %43'ü bir aile üyesinde erken başlangıçlı meme kanseri teşhisi ile ilişkilendirilmiştir. 50 yaşın altındaki akrabalar arasında, oranlar sırasıyla %56 ve %58 iken 50 yaş ve üstü akrabalar arasında yaklaşık %30 ve %10 olduğu görülmüştür (Rawal *et al.* 2006). Başka bir çalışmada ise 40 ile 50 yaşları arasındaki meme kanseri olan kadınlar incelenmiştir. Bu süreçte 334 hasta teşhis edilmiş olup, teşhis edilen meme kanseri hastası kadınların %22'sinde ailede meme

kanseri öyküsü olduğu belirtilmiştir. Ayrıca %1,8'inde meme kanseri genetiği doğrulanmış ve yatkınlık olduğu belirtilmiştir (Joyce *et al.* 2015).

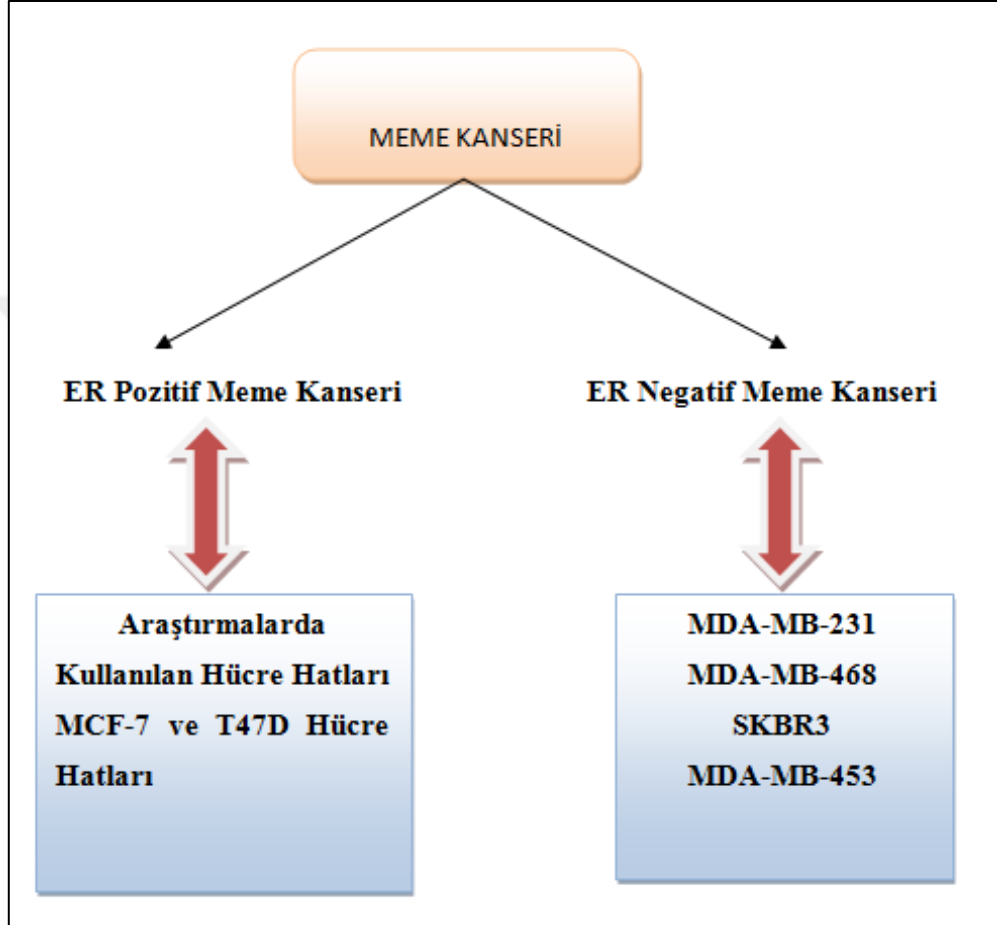
Meme kanseri için genetik faktörler önemli risk faktörleri arasında gösterilmektedir. Bu nedenle özellikle yakın akrabasında meme kanseri hikayesi olan bireylerin genetik riskini azaltmak adına meme kanseri riskini oluşturabilecek genlerle ilgili bir tarama testi yaptırabilir. Böylelikle genetik olarak bir risk varsa belirlenebilir. Çünkü meme kanseri açısından bir onkogen olarak kabul edilen BRCA1/2 genine bağlı olarak gelişen meme kanseri vakalarının yarısının aile öyküsüne bağlı olarak açıklanabileceği belirtildiği (Rawal *et al.* 2006) düşünülürse, risk altında olan bireylerin genetik taramalardan sağlayabileceği yararlar anlaşılabilir.

Meme kanseri ile ilgili olarak birçok gen tanımlanmıştır. Hem onkogenlerin hem de anti-onkogenlerin mutasyonları ve anormal amplifikasyonları, tümörün başlatılması ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. En sık rastlanan kalıtsal meme kanseri genleri; BRCA1 (Breast Cancer Susceptibility1), BRCA2 (Breast Cancer Susceptibility2) ve HER2 (İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2) ve EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) genleridir. BRCA1 ve BRCA2 genleri, DNA'da iplikçik kopmasının onarımında görevli genler iken, HER2 genin kodları HER2 proteini, tirozin kinaz ailesinin bir epidermal büyüme faktörü reseptörüdür ve kanser kök hücre sayısını arttırdığı görülmüştür, EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) geni ile kodlanan; EGFR proteini, tirozin kinaz ailesinin bir hücre yüzeyi glikoproteinidir ve EGF, TGF- α , amphiregulin, betacellulin ve benzerlerine bağlanarak aktive ettiği gözlenmiştir (Sheng-Yi *et al.* 2017). Söz konusu bu genlerin risk altında olan bireylerde analizi, biyoönleyici önlem olarak değerlendirilebilir.

2.5 Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Meme kanserinin sınıflandırılması, tümör morfolojisi, derecesi dikkate alınarak ve tümörün östrojen reseptörlerini bulundurmasına bağlı olarak sınıflandırılabilmektedir. Bu bağlamda meme kanseri genel olarak ER-pozitif (ER⁺) ve ER-negatif (ER⁻) olmak üzere 2 grupta (Şekil 2.5) sınıflandırılmaktadır (Li *et al.* 2017). Bununla birlikte meme

kanserinin gelişmesinde rol oynayan hücrelerin sahip oldukları diğer reseptör (progesteron reseptörü veya HER2;human epidermal reseptör-2), gen ekspresyon profili veya molekül türlerine göre farklı sınıflandırmalar (luminalA, luminalB, basal-like,Her2 pozitif gibi) da yapılabilmektedir (Wesolowski and Ramaswamy 2011)



Şekil 2.5 Meme Kanserin Sınıflandırılması

Meme kanseri ile ilgili çalışmalarda kullanılan bir çok hücre hattı vardır ve bunların özellikleri birbirinden farklı farklıdır (Şekil 2.5). Örneğin; MCF-7 ve T47D hücre hatları ER⁺ hücre hatları iken, MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-468 ve SKBR3 hücre hatları ER⁻ hücre hatlarıdır (Li *et al.* 2017).

2.6 Meme Kanseri ve Oksidatif Stres

Oksidatif stresin; kanser, diyabet gibi metabolik hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve yaşlanma da dahil olmak üzere pek çok kronik hastalığın oluşmasında etkili olabileceği bilinmektedir. Metabolizmanın devamlılığı açısından oksidan moleküller ile antioksidan moleküller arasında bir denge olması gerekir. Bu denge oksidan moleküllerin artması veya antioksidan molekül seviye veya aktivitelerinin azalması şeklinde oksidanlar lehine bozulduğunda oluşan durum, oksidatif stres olarak tanımlanabilir.

Bir organizmada reaktif türlerin seviyesi yüksekse ve antioksidan savunma mekanizmaları bunların detoksifikasyonunda yetersiz kalırsa, antioksidanlarca etkisiz hale getirilememiş reaktif moleküller, lipidlere, proteinlere veya doğrudan DNA'ya etki ederek hasar oluşturabilir. Oksidatif stres aracılı oluşan DNA hasarı karsinogenezin başlama sebeplerinden biri olarak gösterilebilmektedir (Lee *et al.* 2017) .

DNA mutasyonu karsinogenezde kritik bir adımdır ve çeşitli tümörlerde yüksek seviyelerde oksidatif DNA lezyonlarının (8-OH-G) hasara yol açtığı belirtilmiştir. Oksidatif DNA hasarının karsinogenez sürecine katkısı ne kadar olduğu henüz net olmadığı, ancak DNA hasarının büyük ölçüde başlangıç süreci ile bağlantılı olduğu belirtilmektedir. Böylece DNA hasarı, mutasyonlar ve gen modifikasyonlarının karsinogenez sürecinde kilit rol oynadığı görülmüştür (Valko *et al.* 2006).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) üretilmesinde ve oksidanların uzaklaştırılmasında bir dengesizlik olarak da tanımlanmaktadır. Bu dengesizlik meydana geldiğinde, biyomoleküller ROS ve RNS tarafından zarar görür ve normal hücre metabolizması bozulur. Bu durum hücre içi ve hücre dışı ortam koşullarında değişikliklere neden olur. ROS, mutasyonlar, delesyonlar, gen amplifikasyonu ve yeniden düzenlemeler gibi DNA'da, malign dönüşümlere, kanser başlangıcına ve ilerlemesine yol açabilen lezyonlara neden olabilir (Rodrigues *et al.* 2014).

Genel olarak reaktif azot türleri ile birlikte reaktif oksijen türleri olarak bilinen oksijensiz radikallerin, hem zararlı hem de faydalı türler olduğu bilinmektedir. ROS'un iki yönlü karakterine göre hücreler içindeki ROS'un, onkojenik fenotipini indükleyen ve koruyan hücre içi ikincil haberciler olarak hareket ettiğini, ayrıca hücrel yaşlanmayı ve apoptozisi indükleyebileceği belirtilmiştir. Oksidatif stres normal hücrelere kıyasla çeşitli kanser hücrelerinde mevcut bulunan hücrel bir redoks dengesizliğini indükler. Bu redoks dengesizliğinin onkojenik stimülasyonla ilişkili olabileceğini belirtilmektedir (Valko *et al.* 2006).

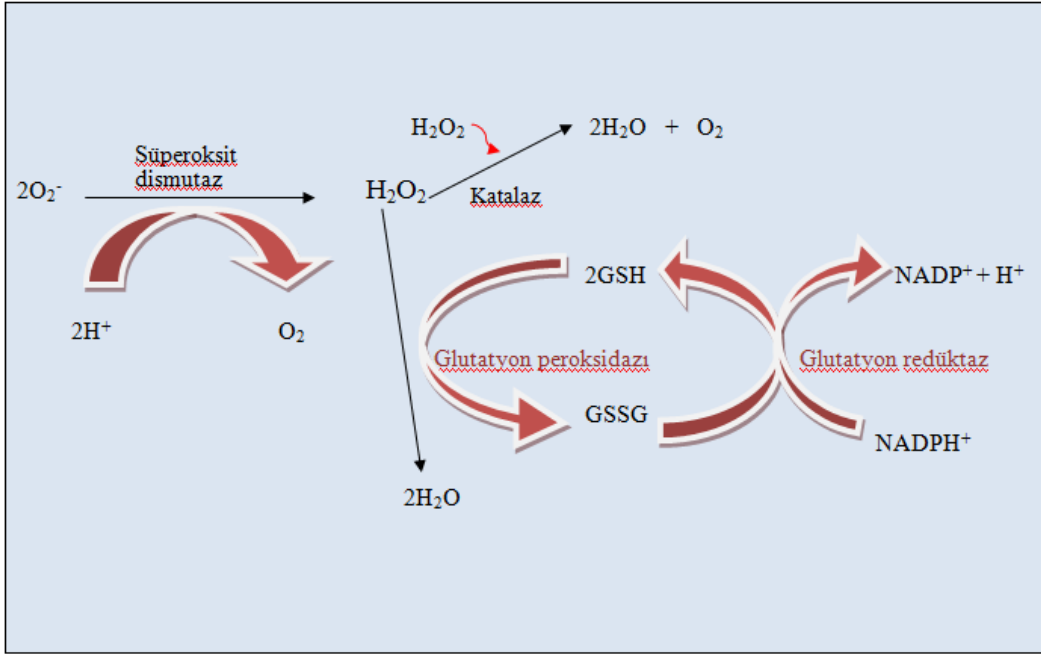
Kanser ve oksidatif stres arasındaki ilişki yıllardan beri birçok araştırmacının ilgi odağındadır. Bu araştırmaların birisinde, metabolizmanın devamlılığı açısından önemli olan redoks sistemlerinde görev alabilen antioksidan, oksidan veya diğer biyomoleküller ile ilişkili proteinleri kodlayan genlerdeki yaygın varyantlar ile meme kanseri gelişimine yakınlık arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Çalışmada oksidatif stresin dengelenmesinde rol alan 27 gende mevcut olan 76 tek baz polimorfizmi analiz edilmiştir. Sonuçlar; oksidan/antioksidan sistemle ilgili genlerdeki farklı genotiplerin, meme kanserine duyarlılığı etkileyebileceğini göstermektedir. Meme kanserine yakınlıklarıyla ilişkili olabilecek; OGG1 (8-oksoguanin DNA Glikosilazı), GPX6 (Glutasyonperoksidaz-6), SOD3 (Superoksitdismutaz-3), TXN (Tioeredoksin) ve XDH (Ksantin dehidrojenaz) genlerinde polimorfizim olabileceği bulunmuştur. Polimorfizmlerde oksidatif strese bağlı işlevselliğin birçok durumda olduğu görülmüştür (Rodrigues *et al.* 2014). Bu bilgiler ışığında oksidan/antioksidan sistemle ilişkili genlerin polimorfizimleri ve mutasyonlarının oksidatif stresi uyarmanın yanı sıra kanser gelişimine de neden olabileceği beklenmesi gereken bir durumdur.

Oksidatif stresin belirli bir karsinogenez aşamasındaki etkisi, doğrudan radikallerin tipi, reaktivitesi ve konsantrasyonu ile ilgilidir. Oksidatif stresin zararlı etkisi, hem antioksidan enzimlerin hem de enzimatik olmayan antioksidanların etkisiyle önlenebileceği ifade edilmektedir. Mn-SOD, anti-tümör aktivitesine sahip en etkili antioksidan enzimlerden biri olarak kabul edilmiştir. Deneysel çalışmalar, normal seviyelerdeki Mn-SOD düzeylerinin hücre büyümesini baskımlarken anormal derecede yüksek Mn-SOD seviyelerinin kanser hücrelerinin istilacı potansiyelini arttırdığını

göstermiştir. Dolayısıyla, oksidatif strese bağlı kanseri önlemek için, endojen ve eksojen oksidatif stres kaynaklarına maruz kalmanın en aza indirilmesi gerektiğini belirtmektedir (Valko *et al.* 2006).

Reaktif oksijen türleri, meme kanserinin başlaması veya ilerlemesine yol açan östrojenik ve genotoksik etkilerde rol oynar. ROS'un neden olduğu hasarın büyüklüğü, üretilen ROS miktarı ile vücudun bu oksidatif hasarı önlemek için savunma kapasitesi arasındaki dengeye bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir. Elde edilen bulgular, meme kanserli hastalarda redoks homeostazında bir dengesizlik olduğunu göstermiştir. Meme kanseri olan hastaların oksidan belirteçlerinde bir artış, antioksidan belirteçlerinde ise bir azalma görülerek, oksidatif stres seviyelerinin genelde yükseldiği belirtilmektedir (Sateesh *et al.* 2019).

Hücrelerde metabolizmanın sürdürülmesi sırasında birçok serbest radikalın oluşması olağan bir olaydır. Ama biyomoleküller ve hücresel yapılar için toksik olan bu ara ürünler hızlı bir şekilde antioksidan sistem tarafından etkisiz hale getirilir. Bu sistemin bir parçası olarak enzimatik antioksidanlardan biri olan süperoksit dismutaz, güçlü bir serbest radikal olan süperoksit radikalini, dismutasyon reaksiyonu ile daha az toksik H_2O_2 molekülüne dönüştürür (Şekil 2.6). Sonrasında oluşan H_2O_2 ise yine enzimatik antioksidanlardan bir diğeri katalaz (CAT) yardımı ile su ve oksijene dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur. H_2O_2 'nin özellikle düşük konsantrasyonlar da detoksifiye edilmesinde rol alan enzimlerden birisi de glutatyon peroksidandır.



Şekil 2.6 Enzimatik antioksidanlar ve etki mekanizmaları

Meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücre hattında, SOD enziminin türlerinden biri olan Mn-SOD'un diğer hücrelere oranla daha düşük seviyelerde olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle MCF-7 hücrelerinde hidrojen peroksit konsantrasyonunun düşük kaldığı belirlenmiştir. Başka bir ifade ile MCF-7 hücrelerinde, hücreler için toksik olan süperoksit radikali yeterli miktarda detoksifiye edilememektedir. Bu nedenle süperoksit radikali düzeylerinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde yüksek seyretmesinin, meme kanserinin ilerlemesine katkı sağlayabileceği ifade edilmektedir (Isnaini *et al.* 2018). MCF-7 hücrelerinin ER^+ meme kanseri türü olduğu düşünülürse, süperoksit radikalının detoksifikasyonunda etkili olabilecek antioksidanlar tedavi açısından yararlı olabilir. Sunulan tez çalışmasında meme kanseri hücrelerinde arbutinin etkileri belirlenmeye çalışılırken, metodoloji kısmında da sunulduğu üzere, farklı dozlarda arbutinin MCF-7 hücrelerinde hem oksidatif stres düzeyleri hem de DNA hasarına etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

2.7 Meme Kanseri ve İnflamasyon

İnflamasyon, organizmada çeşitli etkilerle (enfeksiyon, hastalık, toksik çevresel faktörler gibi) oluşabilecek doku hasarını sınırlamak ve onarım mekanizmalarını uyarmak için hızlı bir savunma mekanizması olarak hizmet eden güçlü bir yanıttır (Bower 2012). Vücudumuzdaki immün hücrelerin bir savunma mekanizması olarak görev yapan inflamatuvar yanıt, akut dönemde organizmanın korunması açısından çok önemlidir. Fakat inflamatuvar yanıtın oluşmasındaki mekanizmaların bozulmasıyla veya başka nedenlerle gelişen kronik inflamasyon ve kronik inflamasyonla bağlantılı hastalıkların (mikrobialenfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar vb.), kanser vakalarının yaklaşık %25'nin oluşmasında rol oynadığı ifade edilmektedir (Murata 2018 and Barabutis *et al.* 2018).

Hücrede görülen herhangi bir stres etkisiyle uyarılarak çekirdeğe translokalize olan NF- κ B (Nükleer faktör kappa B) gibi nükleer faktörler DNA'ya bağlanarak bazı inflamatuvar genlerin uyarılmasına neden olabilir. Bu genlerden biri olan Caspase-1'in uyarılması ile TNF- α gibi proinflamatuvar stokinlerin üretilmesi ve salınımı artabilir. Böylelikle hücre içinde artan akut inflamasyon apoptotik kaskatları aktive edebilir (Hazman *et al.* 2018). Bununla beraber özellikle NF- κ B'nin oksidatif stres veya başka nedenlerle uyarılması sonucu salınımı artan proinflamatuvar stokinlerin etkisinin kronik hale gelmesi durumunda p53'ü baskılayarak kanser oluşumuna veya ilerlemesine katkı yapabileceği ifade edilmektedir (Lowe *et al.* 2014).

Kanser hücrelerinin gereksinimleri normal hücrelerden farklıdır. Bu nedenle kanser hücrelerinde metabolizma kanser hücrelerinin gereksinimlerine göre yeniden düzenlenir (Deregulation). Örneğin kanser hücrelerinin hızlı üreme ve proliferasyon yetenekleri, farklı dokulara uyum sağlamaya yönelik gösterdikleri metabolik faaliyetler ve buna benzer tümör hücrelerine özgü metabolik faaliyetler, kanser hücresinin ilave besin ihtiyacına ve enerji harcamasına sebep olur. Bunun sonucunda metabolizmada fazla miktarda laktat, nitrik oksit (NO), ROS, araşidonik asit metabolitleri (Prostaglandinler) gibi maddelerin oluşumu artar (Neagu *et al.* 2019). Ayrıca kanser hücrelerinin proliferatif özelliklerinin gelişmesi sonucu, dokunun ihtiyacı olan oksijen miktarlarının

azalmasıyla kanserli dokuda glikoliz uyarılır. Bu metabolik değişiklikler kanser hücrelerinde inflamasyonun artmasına katkı sağlar (Palucka and Coussens 2016, Andrejeva and Rathmell 2017).

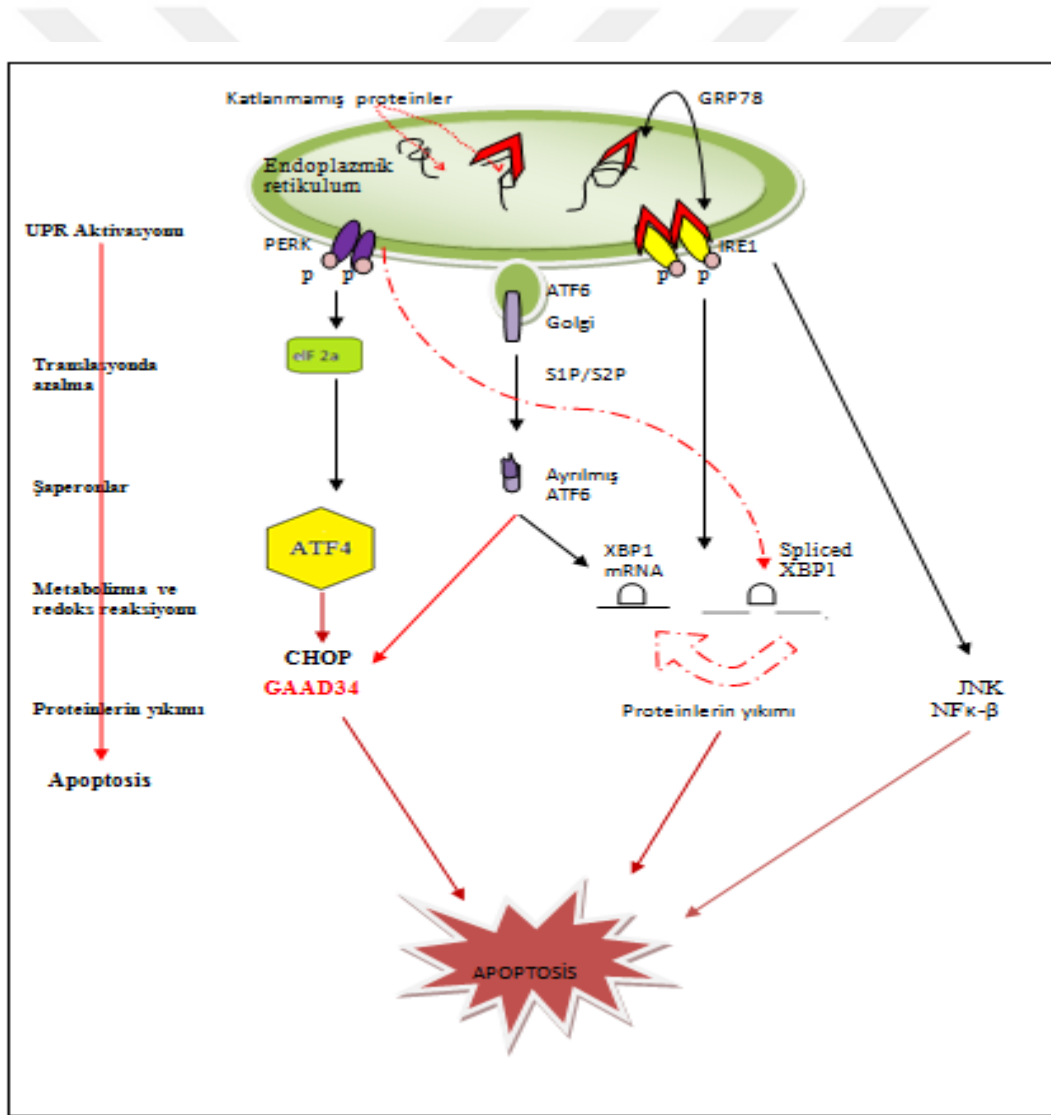
Organizmada inflamasyonun oluşmasında görev alan metabolit gruplarından birisi de proinflamatuvar stokinlerdir. Sitokinler, enfeksiyonlarda, hematopoezde ve homeostazide önemli rolleri olan biyomoleküllerdir. Stokinler doku yenilenmesini, hücresel proliferasyonu ve büyümeyi kontrol ederek, enfeksiyöz hastalıklara ve hatta kansere karşı organizmayı koruyan biyomoleküllerdir. Adiposit veya immun hücreler başta olmak üzere farklı birçok dokuda üretilerek salınımları yapılabilmektedir (Fasoulakis *et al.* 2018). Sunulan bu çalışmada MCF-7 hücrelerinde arbutinin inflamasyona etkisini belirleyebilmek adına proinflamatuvar stokinlerden bazıları TNF α , IFN γ ve IL1 β analiz edilmiştir.

2.8 Meme Kanseri ve Endoplazmik Retikulum Sentezi

ER (endoplazmik retikulumun), protein sentezi için kalite kontrol merkezi olarak tanımlanabilmektedir. Protein moleküllerinin farklı görevleri yerine getirebilmesi için fonksiyonel aktivite kazanmaları gerekmektedir. Bu nedenle proteinlerin, görevlerine yönelik tanımlanan üç boyutlu yapılara katlanması gerekir. Ancak hücresel ortamda yeni sentezlenen proteinler, potansiyel olarak toksik türler oluşturan anormal katlanma ve toplanma riski taşıyabilmektedir. Bu tehlikelerden kaçınmak amacıyla hücreler, agregasyonu önlemek ve etkin katlanmayı teşvik etmek için ustaca mekanizmalar kullanan karmaşık bir moleküler şaperon ağına yatırım yaparlar. Hücre içerisinde birçok önemli görevi bulunan endoplazmik retikulumun en önemli görevi protein katlanmasının sağlanmasıdır. Diğer görevleri ise protein katlanmasının doğru olup olmadığı, yanlış katlanma oldu ise düzeltilmesi, eğer düzeltilemezse yanlış katlanan proteinlerin yıkıma gönderilmesi endoplazmik retikulumun görevleridir (Düzgün *et al.* 2012 ve Tatar and Tatar 2019).

Endoplazmik retikulumunda protein katlanmasının gerçekleşmesini sağlayan proteinler bulunmaktadır. Bu proteinler glukoz düzenleyici protein 78 (GRP78), glukoz

düzenleyici protein 94 (GRP94), lektin benzeri proteinler ve foldazlar şeklinde sıralanabilir. Endoplazmik retikulumun fonksiyon kapasitesini aşan fizyolojik veya patolojik durumlarda lümende katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein birikimi meydana geldiği ve bu durum endoplazmik retikulum stresi olarak isimlendirildiği belirtilmiştir. Endoplazmik retikulum stresi hücre içerisinde oluştuktan sonra hücrenin hayati fonksiyonlarını devam ettirebilmek için katlanmamış protein cevabı (UPR) adı verilen sinyal yolları devreye girmektedir. Bu yollar (Şekil 2.7)'da görüldüğü üzere protein endoplazmik retikulum kinaz (PERK), aktive edici transkripsiyon faktörü-6(ATF6), inozitol gerektiren kinaz 1 (IRE1) yolları UPR sinyal yollarının başlıcalarıdır (Düzgün *et al.* 2012).



Şekil 2.7 Endoplazmik Retikulum Stresi ile Apoptozis arasındaki İlişki

Ökaryotik hücreler, hücre dışı ortamdaki değişikliklerin neden olduğu çeşitli stres türlerine yanıt vermektedir. Endoplazmik retikulumda yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi gibi hücre içi faktörlerin de strese neden olabileceği ve iyileşme sürecine dahil olan şaperonların ve proteinlerin ekspresyonunu indükleyen katlanmış UPR cevabını aktive edebileceği söylenmiştir. Stres aşırı veya sürekli ise ve endoplazmik retikulum fonksiyonu geri alınamıyorsa, UPR'nin apoptozu uyarabileceği belirtilmektedir. Endoplazmik retikulumun stresinin aynı zamanda uyarlanabilir bir işleve sahip kendi kendini parçalayıcı bir süreç olan otofaji için güçlü bir tetikleyici olduğu görülmüştür. Bu nedenle, endoplazmik retikulum stresi ve otofajinin (hücrenin kendi lizozomu tarafından sindirilmesi) kesişimi araştırılmış ve potansiyel terapötik etkileri vurgulanmıştır (Lee *et al.* 2015).

UPR'nin, katlanmış veya yanlış katlanmış proteinlerin endoplazmik retikulumun membranı arasındaki boşlukta birikmesiyle aktive edilen bir stres tepkisi olduğu ve kontrolsüz aktivasyonu, metabolik, nörodejeneratif ve enflamatuar hastalıklar dahil olmak üzere, bir çok hastalıkla ilişkili (Şekil 2.8) olabileceği belirlenmiştir (Sisinni *et al.* 2019).



Şekil 2.8 Endoplazmik retikulum stresinin aracılık ettiği hastalıklar

Kanser hücrelerinde UPR'nin kronik aktivasyonu, yaygın bir tümör ilerleme mekanizması olarak kabul edilmektedir. Yapılan bir çalışmada endoplazmik retikulum stresi ile apoptozis arasındaki ilişki üzerinde durulmuş ve insan meme kanserinde otofaji (hücresinin kendi kendini yemesi) ve UPR'nin aktivasyonu ile antikanser ilaçlara direnç arasındaki etkileşimin açıklanması amaçlanmıştır. UPR'nin anormal aktivasyonunun yanı sıra UPR bileşenlerinin yukarı regülasyonunun meme kanseri ilerlemesinde ve kanser hücrelerinde apoptoz ve ilaç tedavisine direnç göstermesiyle ilgili bilgiler öne sürülmüştür. Otofaji ve UPR'nin insan malignitelerinde yeni moleküler hedefler sağlayabileceği hipotezi tartışılmıştır. GRP78 protein seviyesinin kemoterapötiklere karşı gelişen dirençte önemli etkileri olduğu ve GRP78'in aşırı ekspresyonu olan meme tümörlerinde doksorubisin direncini geliştirdiği belirtilmiştir (Sisinni *et al.* 2019).

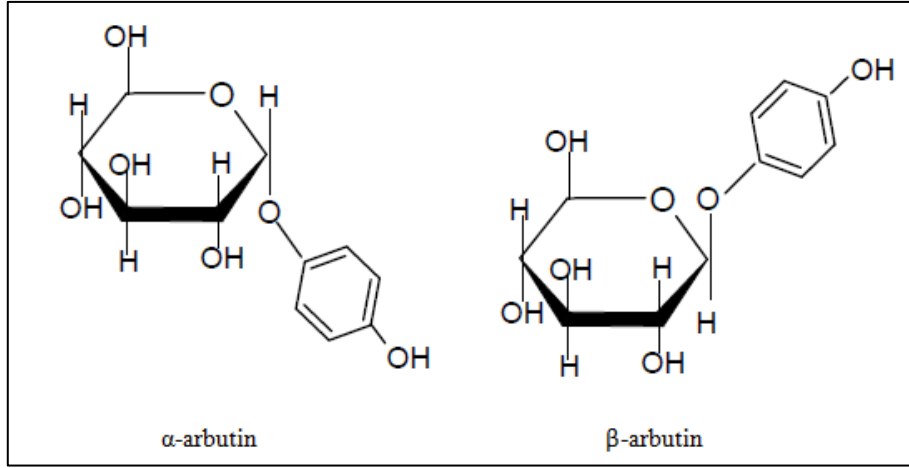
2.9 Meme Kanseri, Apoptoz ve Proliferasyon

Apoptozis biyolojik görevlerini tamamlamış yapısal elemanları ya da DNA'sı hasar görmüş hücrelerin, ilişkili olduğu doku ve hücrelere zarar vermeyecek bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan, genlerle kontrol altında tutulan ve gerçekleşmesi için enerjiye ihtiyaç duyan programlı hücre ölümü olarak tanımlanabilir. Apoptozis, kendi içerisinde bir denge halindedir. Artması durumunda nörodejeneratif hastalıklara, azalması durumunda ise kanser ve fazla otoreaktif hücrelerin ortadan kaldırılamaması sonucu otoimmün hastalıklara yol açabileceği belirtilmiştir. Apoptozis emri alan bir hücrede kromatin yoğunlaşması görüleceği ve hücrenin boyutlarının küçülmeye başlayacağı sonrasında ise apoptotik cisimciklere ayrılacağı belirtilmiştir. Bu apoptotik cisimcikler yüzeylerinde yeni reseptörlerle birlikte yakındaki fagositik sistem hücrelerini çağırarak fagotositoz ile uzaklaştırılır. Apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonunun tedavi için, gen ürünlerinin ise tanı için potansiyel hedefler olduğu belirlenmiştir (Dingel and Kul 2016).

2.10 Arbutin

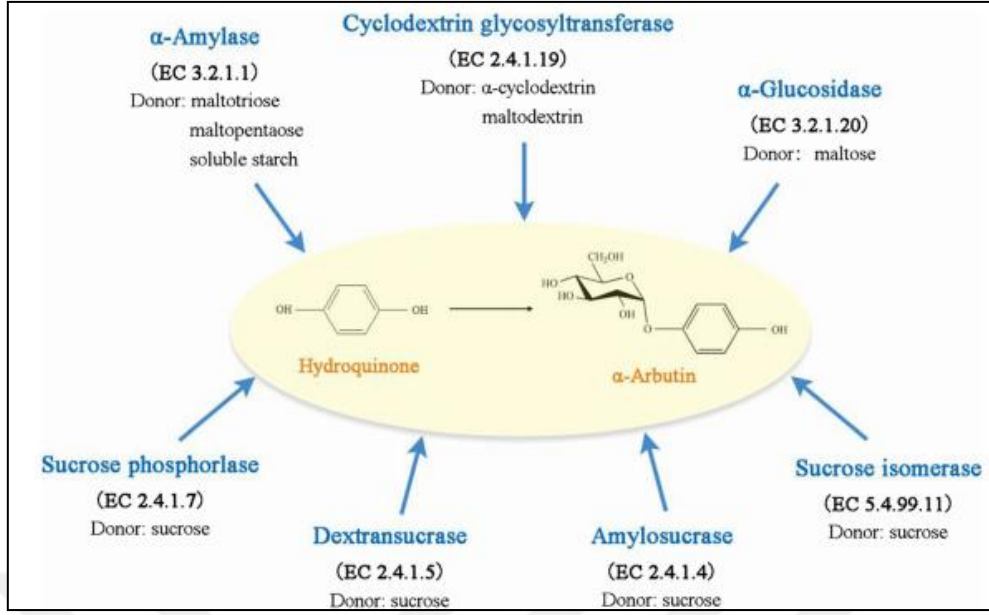
Geçmişten günümüze kanser tedavisinde geleneksel ve yenilikçi temellere dayanan birçok tedavi seçeneği kullanılmaktadır. Bunlar arasında ilk akla gelenler arasında cerrahi yaklaşım, radyoterapi, kemoterapi ve immunoterapi gibi yöntemler sayılabilir. Fakat söz konusu tedavi yöntemlerinin yan etkilerinin ağır oluşu tedavinin başarı şansını azaltabilmektedir. Bu durum bilim insanlarını kanser tedavisinde etkili olabilecek daha doğal ve yan etkisi az olabilecek alternatif yöntemler araştırmaya yönlendirmiştir. Bu bağlamda bitkilerin ve bitkilerden elde edilen antikanser etkili olabilecek bileşenlerin etkileri öncelikle in vivo ve in vitro deney modelleri ile laboratuarlarda, tedaviye etkisi olduğu gözlenenler ise kliniklerde gönüllüler üzerinde denenmeye başlanmıştır.

Yapılan araştırmalar ayı üzümü, kış sümbülü, armut ve dut ağacı gibi bitkilerin olgun yapraklarından elde edilebileceği belirlenen arbutinin günümüzde 100'den fazla farklı bitki türünden izole edilebildiğini göstermektedir (Deisinger *et al.* 1996; Xu *et al.* 2015). Bitkilerden izole edilen arbutin izoformu β -arbutindir (Şekil 2.9). β -arbutin eldesinde kullanılan çoğu bitki türü yapraklarının elde edilen arbutin yüzdesi oldukça düşüktür. Geleneksel olarak idrar yolu bozukluklarının tedavisinde sıklıkla kullanılan ayı üzümü (Bearberry; *Arctostaphylos uva ursi*) bitkisinin arbutin yüzdesinin, bitkinin toplanma zamanı ve yetiştirilme koşullarına bağlı bir şekilde değişmekle birlikte yaklaşık olarak % 17 olduğu ifade edilmektedir (Couteau and Coiffard, 2016). Bununla beraber arbutin içeriği çok daha yüksek olan bitkilerin varlığı da bilinmektedir. Örneğin Güney Afrika'da bulunan küçük bir çalı türü olan *Myrothamnus flabellifolia* (diriliş bitkisi) türünün yapraklarından kuru ağırlığının %27'sine kadar arbutinin izole edilebildiği belirtilmektedir (Suau *et al.* 1991).



Şekil 2.9 α -arbutin, β -arbutinin kimyasal yapıları

Arbutinin kozmetikte kullanımının yaygınlaşması sonucunda artan arzı, bitkilerden izole edilen β -arbutinin karşılayamaması ve muhtemelen sektörün daha ucuz hammaddeye ulaşmak istemesi gibi nedenlerle farklı arbutin türleri sentetik olarak üretilmeye başlanmıştır. Bu türlerin başında α -arbutin (4-hydroxyphenyl α -d-glucopyranoside) gelmektedir (Şekil 2.9). β -arbutinin bir izomeri olan α -arbutin (Şekil 2.9) mikrobiyal enzimler veya bazı mikroorganizmalar kullanılarak sentezlenebilmektedir (Zhu *et al.* 2018). Arbutinin kimyasal olarak sentezlenmesinin bazı dezavantajları (Reaksiyon koşullarının zor olması, üretimde kullanılan moleküllerin oluşturulan reaksiyonlarda seçiciliğinin düşük olması gibi) olması nedeni (Seo *et al.* 2012) ile daha kolay olan enzimatik sentez yolları üzerinde daha çok araştırma yapılmaktadır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 α-arbutinin hidrokinon ve mikrobiyal enzimler yardımıyla biyolojik olarak sentezinde kullanılan yöntemler (Zhu *et al.* 2018).

Enzimatik sentezin temel mekanizmasında, substrat olarak hidrokinon, glukoz donörü olarak ise sükröz, maltoz, maltodekstrin ve maltopentoz gibi karbonhidratlar kullanılmaktadır. Enzim kataliziyle gerçekleşen transglukozilasyonda, glukozun anomerik karbon atomuna α formunda hidrokinon O-glukozidik bağla kovalent olarak bağlanmaktadır (Zhu *et al.* 2018). Enzimatik transglukozilasyonla α-arbutin sentezlenmesinde bugüne kadar 7 farklı enzimin kullanılabileceği belirlenmiştir. Bunlar; sükröz fosforilaz (Kiato and Sekine, 1994), α-amilaz (Nishimura *et al.* 1994), α-glukozidaz (Kurosu *et al.* 2002), dekstransükraz (Seo *et al.* 2009), sükröz izomerez (Zhou *et al.* 2011), siklodekstrin glukoziltransferaz (Mathew and Adlercreutz, 2013) ve amilosükraz (Yu *et al.* 2018) enzimleri olarak sıralanabilir.

Ayrıca arbutinin indirgenmesi (hidrokinona bağlı yan zincirdeki glukoz halkasında bulunan hidroksitlerin yapıdan çıkarılması) ile elde edilen deoksiarbutin (4-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl) oxy] phenol) de sentetik olarak üretilerek kozmetik ürünlerin bileşiminde kullanılmaya başlamıştır (Miao *et al.* 2016).

Melasma (choasma) adı verilen ciltte ve özellikle yüzde oluşan lekeler bireyleri psikolojik ve fizyolojik olarak etkileyebilen önemli cilt hastalıklarından birisidir.

Oluşan bu cilt lekelenmeleri genellikle kahverengi tonlarında oluşmaktadır. Bunun en önemli nedenleri arasında düzensiz bir şekilde güneş ışınlarına maruz kalma gösterilmektedir. Melasma özellikle bayanlarda menstrual siklusa kaynaklanan hormon düzensizliklerinden etkilenebilmektedir. Bu nedenle de bayanlarda erkeklere göre daha yoğun görülmektedir (Miao *et al.* 2016).

Melasma, hiperpigmentasyon ve özellikle yüzde oluşan çillerin tedavisinde yarım asıra yakın bir süre hidrokinonlar kullanılmıştır. Son yıllarda kanserojen bir madde olan benzenin bir türevi olan hidrokinonun özellikle de kozmetik ürünlerde kullanımı yasaklandı (Nordlund *et al.* 2006). Bunun en önemli sebepleri arasında kliniklerde, deney hayvanları ve hücre kültürü modellerinde yapılan bilimsel çalışmalarla hidrokinonların organizmada oksidatif stres, DNA hasarı gibi oluşumları uyurabileceğinin gösterilmiş olmasıdır (Westerhof and Kooyers 2005; Horita *et al.* 2005; Levitt, 2007; Jurica *et al.* 2017). Hidrokinonun metabolizma açısından sakıncaları olduğu öğrenilince, benzer etkileri olabilecek daha güvenilir ürünlerin kullanımı yaygınlaşmaya başladı. Bu bağlamda doğal olarak elde edilen β -arbutinin ve sentetik arbutin türleriyle yapılan çalışmalar, arbutin türlerinin hidrokinona göre sitotoksitesinin daha az olduğunu, bu nedenle daha güvenilir bir cilt beyazlatma ajanı olarak kabul edilebileceğini göstermektedir (Boissy *et al.* 2005; Hu *et al.* 2009; Miao *et al.* 2016).

Geçmişten günümüze cilt beyazlatma ajanı olarak kullanılan hidrokinonlar ve günümüzde onun yerini alan arbutin türevleri aslında birer trozinaz inhibitörü metabolitlerdir (Garcia-Jimenez *et al.* 2017). Trozinaz (EC 1.14.18.1) insan vücudunda temel pigment maddeleri olan melaninlerin sentezlenmesinde görevli, bakır içerikli bir enzimdir. Farklı türdeki renklerin oluşumunda görev alan pigment molekülleri olan melaninlerin oluşumundaki dengenin bozulması, insanlarda hiperpigmentasyon hastalıklarına neden olabilirken, meyve, sebze, mantar gibi besinlerin ise doğal renklerini kaybederek, kalite ve organoleptik özelliklerinin (renk, tat, his vb gibi duyuşsal özellikler) azalmasına sebep olabilmektedir (Ortiz-Ruiz *et al.* 2015).

Arbutinin fenolik bir bileşik olması, aynı zamanda antioksidan özelliklerinin de oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Reaktif oksijen türleri arasında en yüksek reaktiviteye sahip olan hidroksil radikali, melanogenez sırasında gerçekleşen L -tirozin-tirozinaz reaksiyonu yoluyla üretilmektedir. Böylece melanogenez sırasında cildin oksidatif strese maruz kalabileceği ifade edilmektedir. Yapılan bir çalışmada, arbutinin, tirozinaz reaksiyonu yoluyla hidroksil radikal oluşumunu baskılayıp baskılamadığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, arbutinin radikal süpürücü etkisiyle, kozmetikte cilt beyazlatma ajanı işlevine ek olarak, ciltte melanogenez sırasında oluşan hidroksil radikale bağlı artış gösteren oksidatif stresi azaltabileceği göstermektedir (Mika *et al.* 2014).

Son yıllarda arbutin türlerinin farklı hastalık modelleri üzerindeki etkileri de araştırılmaya başlanmıştır. Ama bunun için çalışmaların öncelikle hücre kültürü ortamında veya deney hayvanları ile yapılacak modellemelerle yapılması sonrasında ise kliniklerde faz çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Böylelikle mevcut arbutin türlerinin ve ilerde sentezlenebilme olasılığı olan farklı arbutin türlerinin olası yararları/yan etkileri belirlenebilir. Bu kapsamda yapılan çalışmalarda arbutinin farklı kanser türlerindeki etkileri de araştırılmaya başlanmıştır. Bu bağlamda yapılan çalışmalar melanogenezin inhibisyonunu sağlayan arbutinin, aynı zamanda antikanser etkili olabileceğini de göstermektedir. Bu çalışmalardan birinde arbutin ve asetilenmiş türevinin, mitokondriyal apoptotik yoldaki modülü aracılığı ile B16 melanom hücrelerinde, tirozinaz aktivitesini etkileyerek melanogenezini inhibe edebileceği ve indüklenen apoptozu belirgin bir şekilde düşürerek antikanserojenik etki gösterebileceği belirtilmiştir (Jiang *et al.* 2017). Arbutinin A549 (Peng *et al.* 2013), MCF-7 (Berdowska *et al.* 2013) gibi adenokarsinom hücre hatlarında da sitotoksik etkileri gösterilmiştir. Bu nedenle arbutinin başka kanser türlerinde de tedavi edici etkileri olabileceği düşünülmektedir.

Sunulan bu tez çalışmasında MCF-7 adenokarsinom hücre hattında arbutinin antikanserojenik etkilerinin varlığı teyit edildikten sonra, söz konusu etkilerin hangi mekanizmalar aracılığı ile ortaya çıkmış olabileceği belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla MCF-7 hücrelerinde β -arbutinin sitotoksositeye, genotoksositeye, endoplazmik

retikulum stresine, östrojen reseptörlerine, oksidatif strese, apoptoza, inflamasyona ve proliferasyona etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

Bu bağlamada sunulan çalışmada MCF-7 hücrelerine β -arbutinin etkileri belirlenmeye çalışılırken, yapılan uygulamalar ve analizler özetlenecek olursa;

- Arbutin izoformlarının (α -arbutin ve β -arbutin), MCF-7 hücreleri canlılığına etkisini belirleyebilmek için MTT viabilite testleri ve sonrasında lethal dozların belirlenmesi,
- Elde edilen lethal dozların kullanılmasıyla oluşturulan deney gruplarında β -arbutinin genotoksisite düzeylerinin comet ve mikronükleus testleri ile analizi,
- TRAIL ve Fas ligantları olarak görev yapabilen ve böylelikle apoptozu uyarak kanser hücrelerinde proliferasyonu durdurarak böylelikle aktif maddelerin antikanserojen etkilerinin oluşmasında aracı olabilen akut inflamasyonun gelişmesinde görev alabilen bazı inflamatuvar stokinlerin (TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ) seviyelerinin analizi,
- MCF-7 hücrelerinde stokinlerle beraber sinerjik etki göstermesi muhtemel olan oksidatif strese arbutinin etkileri incelenirken TAS(total antioksidan seviyeleri), TOS(total oksidan seviyeleri), OSI(oksidatif stres indeksi) seviyelerinin hücre lizatlarında analiz edilmesi,
- Arbutinin, MCF-7 hücrelerinde apoptoza etkilerinin belirlenmesi amacıyla moleküler düzeyde Caspase 3 mRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi, immunohistokimyasal olarak ise p53 düzeylerinin analizi,
- Arbutinin, MCF-7 hücrelerinde proliferasyona etkilerinin belirlenmesi amacıyla moleküler düzeyde Bcl-2 düzeylerinin analizi,
- Arbutinin, MCF-7 hücrelerinde endoplazmik retikulum stresine etkilerinin belirlenmesi amacıyla moleküler düzeyde GRP78 düzeylerinin analizi,
- Arbutinin, MCF-7 hücrelerinde ER sinyal yoluna olan muhtemel etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla immunohistokimyasal olarak ER α reseptörlerini nasıl etkilediği belirlenmeye çalışılmıştır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Çalışmada Kullanılacak Hücre Hattı ve Kültür Ortamı

Sunulan çalışmada arbutinin meme kanserinde olası etkileri analiz edilirken, göğüs adenokarsinomu hücre hattı olarak kullanılan MCF- 7 hücreleri tercih edilmiştir. Çalışmada kullanılan hücreler Anadolu Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Biyoloji Laboratuvar stoklarından tedarik edilmiştir. Proje kapsamında hücrelerle yapılan tüm çalışmalarda sterilizasyona özen gösterilmiştir. Çalışma esnasında kullanılan hücrelerin herhangi bir strese maruz kalmamaları amacıyla, hücrelerle temas edecek her türlü çözücü/çözeltinin 37°C' de olmasına, santrifüj işlemlerinin ise düşük hızda (800 rpm) 5 dakika süreyle yapılmasına özen gösterilmiştir.

Hücrelerin çoğaltılması için kullanılacak olan komplete medium (besiyeri) 0,22 µm gözenekli pes membran filtreler (WVR) kullanılarak hazırlandı. Filtreye konacak komplete medium bileşenleri steril ortamda konuldu. Medium hazırlanırken 1 litre hacim esas alınarak filtreye öncelikle %10 (v/v) oranında ısı ile inaktif edilmiş fetal buzağı serumu (FBS; Fetal bovine serum veya fetal calf serum), %1 (v/v) oranında penisilin streptomisin, %1 (v/v) oranında (1 mM) sodyum piruvat eklendi ve içeriğinde glutamin olan yüksek glukoz konsantrasyonuna sahip DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma) ile hacim 1 litreye tamamlandı. Böylelikle complete mediumdaki DMEM oranı %88 oldu (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan besiyerinin (medium) bileşenleri

Bileşen	Oran (%)	Hacim (mL)
DMEM (glutaminli)	88	880
FBS	10	100
Penisilin Streptomisin	1	10
Sodyum Piruvat	1	10
Toplam	100	1000

Bu tabloda (Çizelge 3.1) belirtilen complete mediumu elde etmek için hazırlanan karışım bir vakum pompası aracılığı ile filtreden (WVR, 0,22µm'lik pess membran filtre) geçirildi. Filtratın toplandığı medium şişesi filtreden ayrılarak kapağı kapatıldı. Hücrelerin çözündürülmesi, yıkanması, pasajlanması ve üretilmesi amacıyla kullanılacak medium, steril 50 mL'lik falkonlara konularak, kullanım süresine kadar +4°C' ye kaldırıldı. Bu şekilde 50'lik falkonlarda kullanıma hazır edilen mediumlar, hücre ekimi yapılacağı veya manipülasyonlarda kullanılacakları zaman, önceden çıkarılarak 37°C' deki su banyosunda 20-30 dakika ısıtılmıştır.

3.2 Hücrelerin Çözündürülmesi ve Ekilmesi

MCF-7 hücreleri sıvı azotta kriyotüpler içinde labarotuvaya getirilmiştir. Donmuş halde kriyotüp içinde bulunan hücreler öncelikle sıvı azottan -18°C ye alınmıştır. 10 dakika beklendikten sonra 37°C' deki sıcak su banyosunda 1-2 dk süre ile inkübe edilerek çözülmeye bırakılmıştır. Bu arada 15 mL'lik bir falkona 5mL medium konulmuştur. Su banyosunda tamamı çözülmek üzere olan kriyotüpteki hücreler hazırlanan (içine medium konan) falkona alınmıştır. Sonrasında kibarca pipetaj yapılarak hemen santifüj edilmiştir. Santifürüj sonunda falkon tabanında biriken hücrelere temas edilmeden medium pipetle çekildi. Hücre peleti üzerine tekrar 2 mL medium eklenerek ve nazıkçe pipetaj yapılarak ikinci kez yıkama işlemi yapılmıştır.

Santrifüjden sonra hücrelerin üzerinde kalan medium tekrar çekildi. Anlatıldığı üzere çözündürülerek 2 yıkamada içeriğinde bulunan DMSO (dimetil sülfoksit)'dan arındırılan MCF-7 hücreleri flaska ekilmek üzere son kez 1 mL medium içinde çözüldü. Hücreler dondurulup çözüldüğünde strese girerler. Hücrelerin stresten daha kolay çıkarak tekrar kısa sürede bölünme yeteneğine kavuşabilmesi için hücrelerin besiyerinin temel protein unsuru olan FBS oranı %15-20 oranında olmalıdır. Oysa standart olarak kullanılan mediumun FBS oranı %10'dur. Bu nedenle mevcut olan mediumdan belirli bir hacimde alınarak, üzerine enjektör filtresinden geçirilerek steril hale getirilen FBS eklenerek, medium içindeki FBS oranının %20 olması sağlanır. İlk ekim için hazırlanan ve %20 FBS içeren 37°C' deki complete medium 25 mL'lik flaska 5 mL hacminde eklenir. Bu şekilde ekim için hazır hale getirilen flaska, ekim için çözündürülerek DMSO'dan

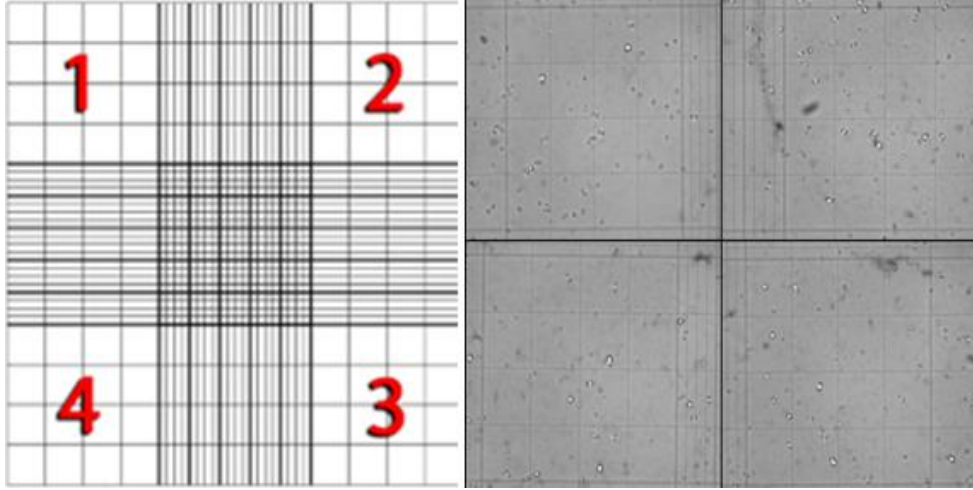
arındırılarak hazırlanan MCF-7 hücreleri yavaşça eklenir. Ekimi yapılacak hücre sayısı-500-600 binden az ise hücreler eklendikten sonra, hücreler fazla ayrı düşmesin diye flask fazla sallanmaz. Çünkü hücrelerin birbirine yakın olması adherent hücre kültüründe özellikle hücre sayısının az olduğu durumlarda, hücre bölünmesini pozitif yönde etkiler. Hücre sayısının çok olması durumunda (özellikle de 1-2 milyondan fazla) ekim yapılan 25 mL'lik flask ekim sonrası kibarca sallanarak hücrelerin flask içine homojen dağılması sağlanabilir. Bu işlem hücrelerin daha kısa sürede konfluent olmasına katkı sağlar. Bununla birlikte çözdürülerek ekilmesi düşünülen hücre sayısı çok ise ilk pasaj 75'lik flask da yapılabilir. 25 mL'lik flask ekimi yapılan hücreler üremesi için 37⁰ C ve % 5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır. Günlük olarak takibi yapılan hücrelerin besiyerleri, hücreler %80-90 konfluent oluncaya kadar 2 günde bir değiştirilmiştir. 25 mL'lik flask istenen oranda konfluent olunca 75 mL'lik flaska pasajlanmıştır.

3.3 Hücrelerin Çoğaltılması (Pasajlanması)

Hücrelerin ürediği bir flasktan, başka bir flaska hücrelere zarar vermeden transfer edilmesine pasajlama denir. Pasajlama işleminde flask tabanına yapışık halde (konfluent) bulunan hücrelere önce tripsinizasyon, sonrasında ise detripsinizasyon (tripsinden arındırma) işlemi uygulanmıştır. Böylelikle tekrar bir falkonun dibinde elde edilerek çözülen hücreler 75'lik flaska ekilmiştir.

3.4 Hücrelerin Sayılması

Analizlerde kullanılmak amacıyla wellplate veya flasklara hücre ekilirken, her bir flaska veya wellplate aynı/yakın sayıda hücre ekilmesi esastır. Bu nedenle sunulan çalışmada LD dozları belirlenirken wellplate hücreler ekilmeden önce mL'de ne kadar hücre olduğu belirlenmiş, yani hücreler sayılmıştır. Bu amaçla tripan blue hücre sayım yöntemi kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Hücresayımında kullanılan hücre sayım laması (Neubauer counting chamber) ve hücre sayımı yapılan hücreler

Tripan blue sadece canlı hücrelerin boyanmasını ve ışık altında parlak görünmesini sağlayan bir boyadır. Bu nedenle sayım yapılacak lama uygulanan ve tripan mavisi ile boyanmış canlı hücreler mikroskop altında parlak görülürken, ölü hücreler mavi/mat görülür. Sayım lamında her biri 16 kareden oluşan 4 sayım bölgesindeki (Şekil 3.1) hücreler sayılarak ortalamaları alınır.

Sonrasında aşağıda ifade edilen formül kullanılarak medium-hücre süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplanır. Sayımın güvenilirliği açısından dilüsyon miktarı önemlidir. Genellikle ortalama hücre sayısının 50-150 arasında olması hücre süspansiyonunun ideal dilüsyona tabi tutulduğunun bir göstergesidir. Eğer ortalama hücre sayısı çok yüksek çıkarsa tripan mavisi – hücre karışımındaki hücre hacmi azaltılarak, tripan mavisi hacmi artırılarak daha dilüe hücre süspansiyonu elde ederek sayım tekrarlanır. Bu durumda dilüsyon oranı artacaktır. Hücre sayısının çok yoğun olduğu durumlarda 20 µL hücre süspansiyonu, 80 µL tripan mavisi (dilüsyon oranı 5) alınarak sayım yapılabilir. mL’deki hücre sayısını belirlemek amacıyla aşağıda sunulan formül kullanılmaktadır.

$$\text{mL’deki canlı hücre sayısı} = (\text{Ortalama Hücre Sayısı}) \times (10^4) \times (\text{Dilüsyon Faktörü})$$

Sunulan çalışmalarda hücrelerin sayımı şu şekilde yapıldı. Flask tabanından tripsinizasyon ile kaldırılıp, detripsinizasyon ile tripsinden arındırılan hücreler, hücre yoğunluğuna göre 2-6 mL aralığında istenen hacimde çözülür. Sunulan çalışmada ise ortalama bir değer olarak hücreler 4 mL mediumda çözüldü. Hücre süspansiyonundan 50 µL alınarak, 50 µL tripan blue ile (dilüsyon oranı 2) karıştırıldı. Hücrelerin sayımında kullanılacak lam ve lamel (Neubauer counting chamber) hazırlandı. Hazırlanan tripan blue-hücre süspansiyonu karışımından pipetaj yapılarak, 10 µL alınarak neubauer lamına uygun şekilde konuldu. Sayım bölgelerinde sayılan hücrelerin ortalamaları alınarak hücre süspansiyonunun mL'sinde kaç adet hücre olduğu formül yardımı ile bulundu. Sonrasında uygulamalarda kullanılacak hücre sayısına göre hücre süspansiyonundan kaç mL alınması gerektiği hesaplanarak, hücrelerle yapılacak manipülasyonlara geçildi.

3.5 MTT Hücre Viabilite Ölçüm Testi

Sitotoksik etkiler, sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik testlerden biri olan MTT yöntemi ile belirlendi. Bu yöntem, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal suksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilir ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir (Koyuncuoğlu *et al.* 2013).

Sunulan çalışmada arbutinin MCF-7 hücre canlılığına etkisi şu şekilde belirlendi. 2×10^4 hücre/mL de olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan, 100µl 96 kuyulu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğuna aktarılacak ve aynı zamanda hücrelere 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 mM konsantrasyonlarında arbutin eklenerek 37°C' de inkübe edilmiştir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 20 µl MTT boyası (5 mg/ml) ilave edilerek, hücreler 37°C' de 2-4 saat daha inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılarak ve her bir kuyucuğa 200 µl DMSO eklenerek

10 dakika inkübe edilmiştir. Renk değişimi, ELISA plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyunda belirlendi. Arbutin ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edilmiştir (Ersin *et al.* 2016 ; Ulaşlı *et al.* 2013). MTT uygulamaları sonucunda kontrol grubuna göre hücre canlılığını %50 oranında azaltan arbutin dozu LD₅₀ dozu olarak kabul edilmiştir. Biyokimyasal ve moleküler analizler için gerekli numunelerin temini için arbutin dozu olarak LD₀ ile birlikte LD₁₀ ve LD₅₀ dozları kullanılmıştır. MTT uygulamaları sonucunda lethal dozlar belirlendikten sonra deney grupları oluşturulmuştur. Çalışmada oluşturulan gruplar ve ilgili gruplara yapılan uygulamalar Çizelge 3.2’de sunulmuştur.

Çizelge 3.2 Çalışmalarda Oluşturulan Deney Grupları ve Yapılan Uygulamalar

Gruplar*	Hücrelere Yapılan Uygulamalar
Grup 1 : Kontrol grubu	β -arbutini çözmek amacıyla kullanıla çözücü (medium) aynı konsantrasyon ve hacimde uygulanmıştır.
Grup 2 : Düşük doz (LD ₀ dozunda) β -arbutin uygulanan tedavi grubu	MTT testleri ile belirlenen LD ₀ dozu olan β -arbutin 0,15 mM konsantrasyonunda hücrelere uygulanmıştır.
Grup 3: Orta doz (LD ₁₀ dozunda) β -arbutin uygulaması yapılan grup	MTT analizleri ile belirlenen ve MCF-7 hücre viabilitesini kontrol grubuna göre %50 oranında düşüren doz (2,3 mM) hücrelere uygulanmıştır.
Grup 4: Yüksek Doz (LD ₅₀ dozunda) β -arbutin uygulanan tedavi grubu	MTT testleri ile belirlenen LD ₅₀ dozu olan β -arbutin 69,6 mM konsantrasyonunda hücrelere uygulanmıştır.

*: Her bir grup 5 adet flaska ekilen hücrelerden oluşturulmuştur. Biyokimyasal ve immunohistokimyasal analizler için gerekli hücreler 75 cm²’lik flasklarda, moleküler analizler için gerekli hücreler ise 25 cm²’lik flasklarda çoğaltılmıştır.

MCF-7 hücrelerinde arbutinin oksidatif strese, apoptozise, endoplazmik retikulum stresine ve inflamasyona etkilerinin belirleyebilmek amacıyla oluşturulan deney modelinde, hücrelerden oluşturulan 4 deney grubuna öngörülen manipölasyonlar yapılmıştır. Her bir grupta ise en az 5 tekrar yapılarak laboratuvar analizlerinde kullanılan numuneler (hücre lizatlarının) hazırlanmıştır. Ayrıca hücrelerin üretilmesi ve

öngörülen deneysel model ile ilgili uygulamaların yapılması için gerekli malzemeler ve analizler ile ilgili bilgilere bu bölümde ayrıntılı bir şekilde yer verilmiştir.

3.6 Biyokimyasal Analizlerde Kullanılacak Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Yapılan Biyokimyasal Analizler

İnkübasyonlar sonrası hücreleri yapışmış olduğu flask zemininden kaldırmak için flasklara tripsin (1ml %0.25) eklenerek çok kısa süre sonra hafif vurma hareketleri ile hücreler serbest bırakıldı. Süspansiyonlar pipet aracılığı ile toplanarak kapaklı tüpler içerisinde 25°C, 800 rpm devirde 5 dakika süreyle santrifüj edilerek pelet elde edildi. Hücre peleti PBS ile yıkandıktan sonra (tekrar santrifüj) üzerine hücre lizis tamponu konmuştur. Lizis tamponu şu şekilde hazırlandı. 200 mL PBS tamponu (ph 7,4) içerisine %1 triton-X-100(v/v), son hacim 500 mL'ye göre hesaplanan %8 oranında(40ml) proteaz inhibitör kokteyli(Roche) eklendi. Enson lizis tamponunun hacmi PBS tamponu ile 500 mL'ye tamamlandı. İyice çalkalanarak homojen bir karışım oluşması sağlandı. Bu şekilde hazırlanan lizis tamponu deney gruplarındaki her bir flasktan elde edilen hücre peletinin üzerine 500 mL hacminde eklendi, pipetaj yapıldı. Sonrasında 20 saniye sonikasyona(Binder) tabi tutuldu. 40 saniye beklendi. Sonikasyon işlemi bu şekilde 10 tur tekrarlandı. Sonikasyon işlemi soğuk zincirde gerçekleştirildi.

Sonikasyon sonucunda hücre/organel içi sıvıların lizis tamponuna geçmesi sağlandı. Tüm uygulamalara rağmen lizis tamponunda çözünmeyen proteinler 8500 rpm'da, 4 °C'de 10 dakika süre ile santrifüj edilerek çöktürüldü. Bu şekilde elde edilen süpernatantlar hücre lizati olarak biyokimyasal analizlerde kullanıldı. Analizlerde lizis tamponu kullanıldı. Oksidatif stres parametreleri olan TAS, TOS analizleri ticari kitler (Rell Assay) kullanılarak spektrofotometrik olarak yapıldı. Proinflamatuvar sitokin düzeyleri ise human spesifik ELISA kitleri (Sun Red) kullanılarak, mikropate okuyucuda(Biotek ELx800) 540 nm'de belirlendi. Elde edilen sonuçlar herbir numunenin kendi total protein düzeylerine bölünerek ham veriler elde edildi. Supernatanların içerdiği protein düzeyleri standart olarak sığır serum albumini kullanarak Bradford metodu ile yapılmıştır (Bradford 1976). Biyokimyasal analizlerden elde edilen ham veriler total protein düzeylerine bölünerek sonuçlar elde edilmiştir.

Hasar derecesi sınıf(0) olan DNA'nın sadece kafa kısmı bulunur. Hasar derecesi sınıf(1) olan DNA'nın kafa kısmı ile birlikte kuyruk kısmı az belirmiş şekilde görülür. Hasar derecesi sınıf(2) olan DNA'da ise kafa kısmı kadar kuyruk uzunluğu da görülmektedir. Sınıf(3) derecesine sahip olan hasarlı DNA ise kafa kısmı oldukça küçülmüş, kuyruk kısmı oldukça uzun görülür.

Hasar tespiti için kullanılan bir diğer yöntem ise mikronükleus analiz testidir. Fiziksel ve kimyasal ajanların hücrelerde oluşturduğu genotoksik etkinin belirlenmesinde mikronükleus testi kullanılır. Mikronükleus testi, mitoz bölünme ile oluşan hücre tipleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilmekte ve kromozom anormallikleri testine göre daha kolay ve hızlı sonuç vermektedir. Kültürde bir kez bölünmesini tamamlamış binükleat hücrelerde mikronükleus frekansını saptayan ve sitokalsin- β ile sitokinezin bloklanmasına dayanan metodun gelişmesi ile mikronükleus testinin güvenilirliği ve geçerliliği artmıştır. Ayrıca *in vitro* çalışmalarda nükleer bölünme indeksi, *in vivo* çalışmalarda ise polikromatik eritrositler ile normokromatik eritrositler arasındaki oran kullanılarak sitotoksitenin tahmini de mikronükleus testi ile sağlanmaktadır. Kimyasal ve fiziksel faktörlerin potansiyel riskleri ve olumsuz etkilerini değerlendiren genotoksisite çalışmaları günden güne daha çok önem kazanmaktadır. Yapılan bu çalışmada MCF-7 hücrelerinde komet ve mikronükleus analizleri aşağıda izlenen basamaklar ile gerçekleştirilmiştir

3.7.1 Komet Analizinin Yapılması

Komet analizinin yapılabilmesi için öncelikle gerekli çözeltiler hazırlandı. Bu amaçla hazırlanan lizis çözeltisi (Çizelge 3.3), elektroforez çözeltisi (Çizelge 3.4), nötralizasyon çözeltisi (Çizelge 3.5) hazırlamak için kullanılan yöntemler çizelgelerde sunulmuştur. Sonrasında ise hazırlanan çözeltilerin kullanılmasıyla komet analizinin nasıl gerçekleştirildiği açıklanmaya çalışılmıştır.

Çizelge 3.3 Lizis çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
NaCl	29,4 g
EDTA	7,44 g
Trisma baz	0,24 g
Triton X-100	2 mL
DMSO	20 mL

Hazırlanan kimyasallar dH₂O ile 200 ml'ye tamamlanarak pH 10 olacak şekilde ayarlandı.

Çizelge 3.4 Elektroforez çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
NaOH	6 g
EDTA	0,18 g

Hazırlanan kimyasallar dH₂O ile 500 ml'ye tamamlanarak pH>13 olacak şekilde ayarlandı.

Çizelge 3.5 Nötralizasyon çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
Trisma baz	14,55 g

Hazırlanan kimyasal dH₂O ile 300 ml'ye tamamlanarak pH 7,5 olacak şekilde ayarlandı.

Öncelikle % 1 NMA (Normal kaynama noktalı agaroz) hazırlanması için 0,03 g NMA 3 ml PBS ile bek alevinde prepara edilerek hazırlandı. % 0,8 LMA (Düşük kaynama noktalı agaroz) hazırlanması için 0,016 g LMA 2 ml PBS ile bek alevinde prepara edilerek hazırlandı. Stok etidyum bromür hazırlanması için 5 mg etidyum brömür 25 ml dH₂O'da çözündürüldü. Çalışmada 10 kat dilüe edilerek kullanıldı.

- Uygulanan konsantrasyonlardaki hücreler flask yüzeyinden alınarak 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırılarak hücreler PBS ile süspanse edildi.
- Hücre süspansiyonundan 40 µl alınarak ependorf içerisinde 100 µl LMA ile karıştırıldı.

- Ependorf içindeki hücre-LMA karışımının hepsi alınarak bir gün önceden hazırlanmış NMA'lı lamlara prepara edildi.
- Preparatlar donmaları için buz kasetlerinin üzerine yerleştirildi.
- Donan preparatlar üzerindeki lameller yavaşça alınarak 60 dk lizis işlemine tabi tutuldu.
- Lizis işleminden sonra 20 dk alıştırma 20 dk yürütme olmak üzere 25 V 300 mA'de elektroforez işlemine tabi tutuldu.
- Elektroforezden alınan preparatlar nötralizasyon tamponuyla yıkandı.
- Yıkama işleminin ardından her bir preparat 70 µl etidyum bromür ile boyanarak lamelle kapatıldı.
- Elde edilen preparatlardan her bir preparat için floresans mikroskopta 100 hücre olacak şekilde sayımlar yapıldı.

3.7.2 Mikronükleus Analizinin Yapılması

Bu yöntemde kullanılan KCl çözeltisinin hazırlanması (Çizelge 3.6)'da sunulmuştur. Sonrasında ise analizlerde kullanılan fiksatiflerin, giemsa boyasının hazırlanmasına değinilmiştir. Son olarak ise mikronükleus analiz protokolü verilmiştir.

Çizelge 3.6 KCl çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
KCl	0,4 gr
Distile su	100mL

KCl ile dH₂O vorteksenerek homojenize edilir.

Fiksatiflerin Hazırlanışı:

Önce fix2 daha sonra fix1 hazırlanır. Çalışmaya başlamadan 2 saat önce fiksatifler hazırlanmalıdır. Fix2 için; 40mL Glasiyal Asetik Asit + 200mL metanol (Son hacim: 240mL), fix1 için; 50mL Fix2 + 50mL %0.9 NaCl (Son hacim: 100mL) kullanıldı.

%5'lik Giemsa boyası için;

5mL Fix1 +5mL Fix2 + 5ml Giemsa karıştırılır. Son hacim dH₂O ile 100mL'ye tamamlandı. (ph:6,8) Hazırlanan karışım filtre kağıdından geçirildi.

Mikronükleus analiz protokolü;

- Şale içerisine nitrözaset veya distile su eklendi.
- Örnek sayısı kadar lam numaralandırılarak şale içerisine dizildi. Çalışma başlamadan 30 dk önce (+4 °C) buzdolabında bekletildi.
- Ependorf içerisindeki numunelerin üzerine 1mL KCl eklendi, homojenize edildi ve 5dk beklendi.
- KCl eklenen örnekler santrifüje 5dk tabi tutuldu (1500rpm).
- Süpernatant atıldı, pellet üzerine fix1 eklendi ve 5dk yine santrifüj edildi (1500rpm).
- Süpernatant atıldı, pellet üzerine fix2 eklendi ve tekrar 5dk santrifüj edildi (1500rpm).
- Son santrifüj sonrası süpernatant yine atıldı, pellet kısmı şalelerdeki lamlara yayıldı.
- Bir gün sonra lamdaki kuruyan örnekler şale içerisinde giemsa boyasına 15 dk maruz bırakılarak boyanması sağlandı.

3.8 Moleküler Analizler

3.8.1 RNA izolasyonu

Reverz Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile yapılacak olan gen ekspresyonu analizlerinde kullanılacak olan total RNA, hazır ticari kit (Gen Matrix) kullanılarak pankreas ve karaciğer dokularından 10 mg alınarak izole edilmiştir. RNA izolasyonu sırasında kullanılan bütün malzemeler RNAase free bir ortam oluşturabilmek adına uygun çözeltilerle (RNase Away) önceden temizlenerek hazır hale getirilmiştir. Elde edilen RNA'ların miktarı nanodropta optic dansitelerinden hareketle ($OD_{260/280}$) belirlenmiştir. $OD_{260/280}$ oranı 1.7-2,1 arasında olan RNA'lar çalışmada kullanıldı. (White and Kaestner, 2009). RNA izolasyonu işleminin tüm aşamaları buz üzerinde gerçekleştirildi.

3.8.2 Komplementari DNA (cDNA) Sentezi ve RT-PCR Analizleri

PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmak üzere her bir örneğe ait total RNA'dan 0,1-5 µg alınarak önce reverz transkriptaz (RT) ile komplementari DNA (cDNA) sentezi yapıldı. Bunun için ticari cDNA sentez kiti kullanıldı (Therma). Elde edilen her bir numuneye ait cDNA'dan 1,5 µl kullanılarak üzerine Sybr Green PCR Master Mix (12,5 µl) ve primer çifti (oligonükleotid) protokollere uygun miktarlarda eklenmiştir. Primerler her bir transkripsiyon analizi için spesifik olup, literatürdeki çalışmalar (Ersin *et al.* 2016 and Ulaşlı *et al.* 2013) kullanılarak belirlendi. (Çizelge 3.7)' de sunulan primerler her bir RT-PCR reaksiyonunda 100 ng düzeyinde kullanıldı.

Çizelge 3.7 Oligonükleotid primer dizileri ve RT-PCR programları

Gen	Primer Dizisi	RT-PCR Protokolleri	Döngü Sayısı
β-Aktin	F-5'CACCCCAGCCATGTACGTTGC R-5'CCGGAGTCCATCACGATGCCA	93°-15 s / 61°-30 s / 68°-1 dk	35
Caspase 3	F-5'GGAAGCGAATCAATGGACTCTGGA R-5'CCTGAGGTTTGCTGCATCGAC	94°-1 dk / 59°-1 dk / 72°-1 dk	35
Bcl-2	F-5'GACGGGCTACGAGTGGGATGC R-5'GGAGGAGAAGATGCCCCGGTGC	94°-1 dk / 58°-1 dk / 72°-1 dk	35
GRP-78	F-5'GCCTGTATTTCTAGACCTGCC R-5'TTCATCTTGCCAGCCAGTTG	95°-30 s / 58°-30 s / 72°-45 s	35

Denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzatma olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile hesaplandı (Pfaffl 2001) ve mRNA ekspresyon düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Hesaplamalar REST 2009 yazılımı kullanılarak yapıldı.

Endojen kontrol olarak beta aktin geni kullanıldı ve her bir örneğe ait beta aktin gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı. MCF-7 hücrelerinde arbutinin antikanserojen etkileri analiz edilirken, kontrol ve tedavi gruplarından izole edilen total RNA ve sonrasında sentezlenen cDNA'lar kullanılarak Bcl-2, GRP-78 ve Caspase 3 mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR cihazında analiz edilmiştir.

3.9 İmmunohistokimyasal Analizler

İmmunohistokimya uygulaması yapılacak hücreler, her grupta en az 3 flask olacak şekilde çoğaltıldı. Flasklardaki hücrelerin çoğalma oranı yeterli (%60-70 konfluent) olduğunda her bir gruba (Çizelge 3.2)'de öngörülen uygulamalar yapıldı. 24 saatlik inkübasyon sonunda hücreler tripsinle kaldırıldı. Mediumla 2 kez yıkanarak detripsinizasyona tabi tutuldu. Son yıkamadan sonra 15 mL'lik falkonların dibinde kalan ve immunohistokimyasal analizlerde kullanılacak hücreleri sabitlemek için, her bir falkona %8'lik 1mL nötral paraformaldehit solüsyonu eklendi. Hücrelere hafif pipetaj uygulandı. Sonrasında oluşan hücre süspansiyonuna 1mL PBS (pH:7,4) tamponu eklendi. Tekrar kibarca pipetaj edildi. Hücreler böylelikle %4'lük nötral paraformaldehit içerisinde sabitlenmiş oldu. Sabitlenen hücreler 24 saat inkübasyondan sonra immunohistokimya analizlerinde kullanıldı.

%4'lük tamponlu nötral paraformaldehit solüsyonunda 24 saat süreyle tespit edilen hücreler, inkübasyon sonunda 3 kez distile su ile yıkandı ve sitoblok uygulaması ile pellet yapılarak rutin doku takibi yapıldı. Hücreler parafinde bloklandı ve mikrotom kullanılarak 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Adhesivli lamlara alınan örnekler immunohistokimyasal teknik ile boyandı. Bu amaçla örneklerin üzerine tavşan Anti östrojen alfa reseptörü (1/50 sulandırma, Santa Cruz, SC-543), tavşan anti-caspase 3 (1/200 sulandırma, Abcam, ab13847) ve Mouse p53 (1/25 sulandırma, DAKO, M7001) antikoru damlatıldı. Sekonder olarak bitonize Anti tavşan antikoru (IgG BA1000, Vector Laboratories Inc., CA, USA) ile diğer bitonize Anti tavşan antikoru (IgG BA2000, Vector Laboratories Inc., CA, USA) uygulandı ve 30 dakika inkübe edildi. Yıkama işleminden sonra peroksidaz enzimi konjuge edilmiş strepteavidin ile muamele

edildi (Standard Vectastain Elite ABC Kit, PK-6100, Vector Laboratories Inc, CA, USA). 30 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkandı. Peroksidaz substratı 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) uygulanarak reaksiyon renklendirildi. Zemin için Gill's (III) hematoxileni kullanılıp aköz yapıştırıcı ile lamalar kapatıldı. Tüm örnekler ışık mikroskopunda incelendi ve Zeiss Imager A2-Axiocam HRc görüntüleme sistemi ve ZEN2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) yazılımı kullanılarak analiz edildi.

3.10 İstatistiki Analizler

Elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart hata (SH) şeklinde tanımlandı, verilerin değerlendirilmesinde SPSS 18 paket program kullanılmıştır. Verilerin öncelikle normal dağılımlı olup olmadığı test edilmiştir. Normal dağılım gösteren verilere parametrik testlerden tek yönlü varyans analizi (ANOVA), post hoc test olarak ise Duncan testi uygulanmıştır. Normal dağılım göstermeyen analiz sonuçlarına ise non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi uygulanarak istatistiki bir fark olup olmadığı belirlendi. Aralarında istatistiki fark olduğu belirlenen parametrelerde, hangi grupların kontrol grubundan istatistiki farklılık gösterdiği ise Mann-Whitney U testi ile belirlendi.

Sunulan çalışmada MCF-7 hücreleri ile yapılan uygulamalar ve analizler özetlenecek olursa;

- Arbutinin, MCF-7 hücreleri canlılığına etkisini belirleyebilmek için MTT viabilite testi,
- Arbutinin, MCF-7 hücrelerindeki lethal dozları belirlendikten ve deney grupları belirlendikten sonra genotoksisite analizleri,
- TRAIL ve Fas ligantları olarak görev yapabilen ve böylelikle apoptozu uyararak kanser hücrelerinde proliferasyonu durdurarak böylelikle aktif maddelerin antikanserojen etkilerinin oluşmasına aracılık edebilen bazı inflamatuvar stokinlerin (TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ) seviyeleri,
- MCF-7 hücrelerinde stokinlerle beraber sinerjik etki göstermesi muhtemel olan oksidatif strese arbutinin etkileri incelemek amacıyla hücre lizatlarından; TAS, TOS, OSI seviyeleri,

- Arbutinin, MCF-7 hücrelerinde apoptoza etkilerinin belirlenmesi amacıyla moleküler düzeyde Bcl-2, GRP78 ve Caspase 3 mRNA ekspresyon seviyeleri ile immunohistokimyasal olarak p53 düzeyleri,
- Arbutinin MCF-7 hücrelerinde ER'lerine etkisini belirleyebilmek için ER⁺ hücre sayıları belirlendi.

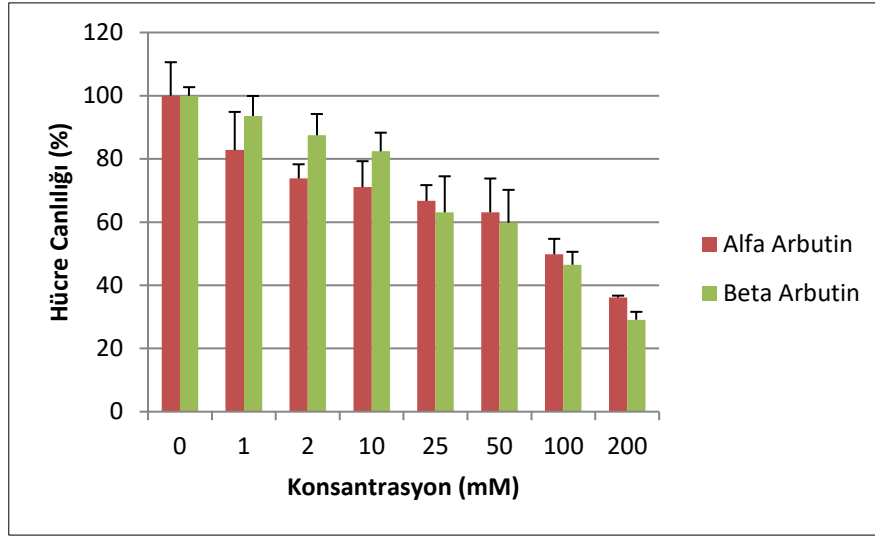


4. BULGULAR

Sunulan çalışmada yapılan laboratuvar analizleri 4 aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada α -arbutin ve β -arbutinin MCF-7 hücrelerinde sitotoksik dozları belirlenmiş ve daha sitotoksik olan β -arbutinin kullanılmasına karar verilmiştir. İkinci aşamada deney grupları planlanarak üretim yapılmıştır. Hücreler her grupta en az 5 flask (n=5) olacak şekilde üretilmiştir. Çalışmanın metaryal-metot kısmında ifade edilen manipülasyonlar hücrelere uygulandıktan sonra hücrelerden laboratuvar analizlerinde kullanılacak olan numuneler (hücre lizatları) elde edilmiştir. Üçüncü aşamada ise elde MCF-7 hücre hattında β -arbutinin etkilerini belirlemeye yönelik analizler elde edilen hücre lizatlarında gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar analizlerinde elde edilen bulgular sırası ile bu bölümde paylaşılmıştır. Ayrıca hücrelerden elde edilen lizatlarda inflamatuvar stokin (TNF- α , IL-1 β ve IFN γ) seviyeleri ve apoptotik süreçte hücrelerin durumlarını belirlemeye imkan verecek olan Bcl-2, GRP-78 ve Caspase 3 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR cihazı yardımıyla belirlenmiştir. Ayrıca MCF-7 hücrelerinde östrojen reseptörlerine ve apoptotik p53 genine etkisi immunohistokimyasal yöntemle analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kaydedilmiş ve istatistiksel analiz ile değerlendirilmiştir.

4.1 MCF-7 Hücrelerinde Arbutinin Sitotoksosite Düzeyleri ve Lethal Dozları

Arbutinin MCF-7 hücrelerinde MTT analizi aracılığı ile sitotoksitesi belirlenirken iki farklı izomeri (α -arbutin ve β -arbutin) kullanılmıştır. Yapılan analizlerde özellikle düşük dozlarda (1mM, 2mM ve 10mM) β -arbutinin α -arbutine göre daha sitotoksik etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.1). Daha yüksek dozlarda (25mM, 50mM, 100mM ve 200mM) ise α -arbutinin sitotoksitesini yüksek olduğu söylenebilir.



Şekil 4.1 MCF-7 hücrelerinde α -arbutin ve β -arbutinin sitotoksitesi

MTT analizlerinden elde edilen bulgulardan yola çıkılarak, kontrol grubundaki hücrelerin canlılık oranları %100 kabul edildiği bir durumda, farklı dozlarda arbutin uygulanan hücrelerin verileri kontrol grubu verileri ile kıyaslanarak elde edilen her bir doza karşılık % hücre canlılık oranları (Şekil 4.1)'de sunulmuştur. Bu veriler kullanılarak MCF-7 hücrelerinde hem α -arbutin hem de β -arbutinin lethal dozları hesaplanmıştır (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2).

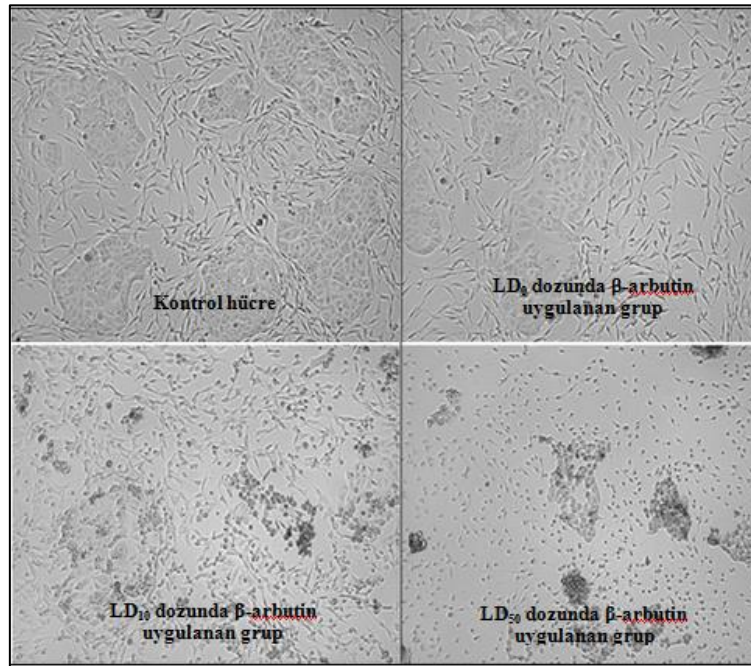
Çizelge 4.1 α -arbutinin MCF-7 hücrelerindeki Lethal Dozları

MCF-7 Hücrelerine Uygulanan α -arbutine Lethal Doz (LD) Konsantrasyonları (mM)		95% Confidence Limits (mM)	
		Lower	Upper
LD₀	0,001	0,000	0,011
LD₅	0,037	0,003	0,152
LD₁₀	0,215	0,036	0,621
LD₁₅	0,703	0,179	1,627
LD₅₀	106,290	61,375	235,875

Çizelge 4.2 β -arbutinin MCF-7 hücrelerindeki Lethal Dozları

MCF-7 Hücrelerine Uygulanan α -arbutine Lethal Doz (LD) Konsantrasyonları (mM)		95% Confidence Limits (mM)	
		Lower	Upper
LD₀	0,145	0,046	0,330
LD₅	0,885	0,402	1,573
LD₁₀	2,322	1,264	3,649
LD₁₅	4,450	2,717	6,494
LD₅₀	69,637	51,890	98,701

α ve β -arbutine ait hesaplanan lethal dozlar kıyaslandığında, β -arbutinin LD'sinin daha düşük olduğu görülmektedir. Bunun anlamı MCF-7 hücrelerinde aynı orandaki sitotoksisiteyi β -arbutinin daha düşük dozlarla sağlayabildiğidir. Yani β -arbutinin sitotoksisitesi α -arbutine göre daha yüksektir. Bu nedenle sunulan çalışmanın kalan kısmında β -arbutin kullanılmıştır. LD₀, LD₁₀ ve LD₅₀ dozlarında β -arbutin uygulanan MCF-7 hücrelerinin ve kontrol grubu hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonrası oluşan mikroskop görüntüleri Resim 4.1'de sunulmuştur.



Resim 4.1 Deneysel gruplarına ait hücrelerin mikroskop görüntüleri

LD₅₀ dozu hücrelerin en az yarısının ölmesine sebep olan dozdur. Başka bir ifade ile antikanserijenik dozdur. LD₀ dozu olarak bilinen doz, alfa ve beta arbutinin 24 saat inkübasyon sonunda MCF-7 hücrelerinde herhangi bir ölüm veya proliferasyona neden olmayan dozudur. Bu doz kanser hücrelerin de herhangi bir proliferasyona neden olmadığı için, diğer hücrelerin kanser nedeniyle organizmada oluşmuş olan oksidatif stres, inflamasyon vb. durumları düzeltmek amacıyla antioksidan olarak kullanılabilecek dozudur. Çünkü daha düşük dozlar MCF-7 hücrelerinin üremesine pozitif katkı sağlamaktadır.

4.2 MCF-7 Hücrelerinde β -Arbutinin Genotoksisiteye Etkisi

Veriler incelendiğinde kontrol grubunda ölçülen hasar değeri ($10,33 \pm 1,87$) ile LD₅₀ düzeyinde ölçülen hasar değerleri ($15,84 \pm 1,63$) incelendiğinde gruplar arasında istatistiki düzeyde farklılık görülmektedir. Doz artırıldığında hücreye verine hasar miktarının arttığı görülmüştür Kontrol grubu ile LD₀ aynı harfleri (a ve b) taşıdığı için gruplar arasında fark olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.3 β -arbutinin MCF-7 hücrelerinde DNA hasarı ve Mikronükleus oluşumuna etkisi

Groups	Comet Scores (Arbitrary Unit)	Micro Nükleus Testi Frekansları (%)
Grup 1 Kontrol grubu	$10,33 \pm 1,87^a$	$0,0400 \pm 0,0089^a$
Grup 2 LD ₀ dozunda β -arbutin uygulanan grup	$12,00 \pm 2,09^a$	$0,0467 \pm 0,0082^a$
Grup 3 LD ₁₀ dozunda β -arbutin uygulanan grup	$19,67 \pm 3,01^b$	$0,0733 \pm 0,0082^b$
Grup 4 LD ₅₀ dozunda β -arbutin uygulanan grup	$15,84 \pm 1,63^b$	$0,0900 \pm 0,0063^c$
P	0,000	0,000

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir (n=5), (p < 0,05).

^{a,b,c}: Aynı sütunda farklı üslü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

4.3 β -arbutinin MCF-7 Hücrelerinde Oksidatif Strese Etkisi

Sunulan çalışmada MCF-7 hücrelerinde β -arbutinin 3 dozu kullanılarak (LD_0 , LD_{10} ve LD_{50} dozları) hem antikanser etkilerini hangi yollar aracılığı ile göstermiş olabileceği belirlenmeye çalışılmış, hem de düşük doz arbutin uygulamalarında arbutinin olası koruyucu etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Söz konusu koruyucu etkilerin belirlenebilmesi amacıyla β -arbutinin MCF-7 hücrelerinde hem oksidatif strese hem de inflamasyona etkileri incelenmiştir. MCF-7 hücrelerine β -arbutin uygulandığında deney gruplarında oksidatif stres düzeylerinin belirlenebilmesi amacıyla hücre lizatlarında TAS, TOS ve OSI düzeyleri analiz edilmiştir.

Elde edilen verilere göre kontrol grubu TAS seviyeleri 0,66 mmol trolox equiv/g-protein olarak belirlenmiştir. Deney gruplarına LD_0 dozunda (0,145 mM) ve LD_{10} dozunda (2,3 mM) β -arbutin uygulandığında TAS seviyelerinde bir değişiklik olmadığı, fakat LD_{50} dozunda (69,6 mM) β -arbutin uygulandığında ise TAS seviyelerinin yaklaşık iki kat arttığı görüldü. Bu yükselişin diğer gruplara göre istatistiki düzeyde önemli bir fark oluşturduğu belirlendi (Çizelge 4.4 TAS, TOS ve OSI seviyeleri).

Çizelge 4.4 TAS, TOS ve OSI seviyeleri

Deney Grupları	TAS (mmolTrolox Equiv./g-protein)	TOS (μ mol H ₂ O ₂ - Equiv./g- protein)	OSI (Arbitrary Unit)
Grup 1; Kontrol grubu	0,66 $\pm$ 0,06 ^a	16,32 $\pm$ 2,48 ^a	2490,3 $\pm$ 328,1
Grup 2; LD_0 dozunda β -arbutin uygulanan grup	0,67 $\pm$ 0,09 ^a	13,85 $\pm$ 1,28 ^a	2143,4 $\pm$ 212,1
Grup 3; LD_{10} dozunda β -arbutin uygulana grup	0,64 $\pm$ 0,03 ^a	14,99 $\pm$ 1,54 ^a	2390,1 $\pm$ 344,9
Grup 4; LD_{50} dozunda β -arbutin uygulanan grup	1,52 $\pm$ 0,29 ^b	30,24 $\pm$ 6,78 ^b	2072,1 $\pm$ 294,3
P	0,003	0,023	0,728

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir (n=5)

^{a,b} : Aynı sütunda farklı üslü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05).

Deney gruplarına ait TOS düzeyleri incelendiğinde de gruplar arasında TAS seviyeleri ile benzer şekilde bir farklılık olduğu görüldü. Yani kontrol grubu, LD₀ grubu ve LD₁₀ grubu TOS düzeyleri arasında istatistiki bir fark gözlenmez iken, LD₅₀ dozunda arbutin uygulanan grupta TOS seviyelerinin yaklaşık iki kat artış göstererek diğer gruplardan istatistiki düzeyde farklılık gösterdiği belirlendi. OSI düzeyleri incelendiğinde ise gruplar arasında herhangi bir farklılık oluşmadığı görüldü. LD₅₀ grubu TAS ve TOS seviyelerinin istatistiki olarak diğer gruplardan farklı bulunmuş olmasına rağmen OSI düzeyleri arasında herhangi bir farkın olmamasının nedeni, MCF-7 hücrelerine LD₅₀ dozunda β -arbutin uygulandığında hem TAS seviyelerinin hem de TOS seviyelerinin birbirine yakın oranlarda artış göstermesine bağlanabilir. Kısacası bu veriler MCF-7 hücrelerine uygulanan β -arbutin dozlarının oksidatif stresi etkilemediğini ifade etmektedir.

4.4 β -arbutinin MCF-7 Hücrelerinde İnflamasyona Etkisi

β -arbutinin MCF-7 hücrelerinde inflamasyona etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla proinflamatuvar stokinlerden bazılarının (TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ) seviyeleri hücre lizatlarında belirlenmeye çalışıldı. Yapılan analizlerde MCF-7 hücre lizatlarında stokin seviyelerinin çok düşük konsantrasyonlarda olduğu görüldü.

Bununla birlikte MCF-7 hücrelerine LD₅₀ dozunda β -arbutin uygulandığında analizi gerçekleştirilen üç stokin türünde hücre lizatlarındaki düzeylerinin önemli derecede arttığı (Çizelge 4.5)' den anlaşılmaktadır. Bu nedenle LD₅₀ dozundaki β -arbutin sitotoksitesinin proinflamatuvar stokin düzeylerinin artmasıyla birebir ilişkili olabileceği söylenebilir. Fakat LD₀ ve LD₁₀ β -arbutin uygulanan hücrelerdeki stokin düzeylerindeki değişim ile kontrol grubu verileri arasında istatistiki düzeyde herhangi bir fark gözlenmemiştir. Yani LD₀ ve LD₁₀ dozlarındaki β -arbutinin inflamasyona etkisi olmadığı söylenebilir.

Çizelge 4.5 Proinflamatuvar stokin (TNF α , IL-1 β ve IFN- γ) düzeyleri

Deney Grupları	TNF- α (ng/g-protein)	IL-1 β (pg/mg-protein)	IFN- γ (ng/g-protein)
Grup 1; Kontrol grubu	42,86 $\pm$ 4,80 ^a	80,36 $\pm$ 8,84 ^a	24,48 $\pm$ 2,08 ^a
Grup 2; LD ₀ dozunda β -arbutin uygulanan grup	52,18 $\pm$ 6,65 ^a	89,39 $\pm$ 9,49 ^a	30,15 $\pm$ 5,55 ^a
Grup 3; LD ₁₀ dozunda β -arbutin uygulanan grup	46,77 $\pm$ 7,51 ^a	86,08 $\pm$ 9,84 ^a	24,21 $\pm$ 2,00 ^a
Grup 4; LD ₅₀ dozunda β -arbutin uygulanan grup	139,53 $\pm$ 41,42 ^b	228,20 $\pm$ 37,92 ^b	75,40 $\pm$ 19,27 ^b
P	0,013	0,000	0,005

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir (n=5)

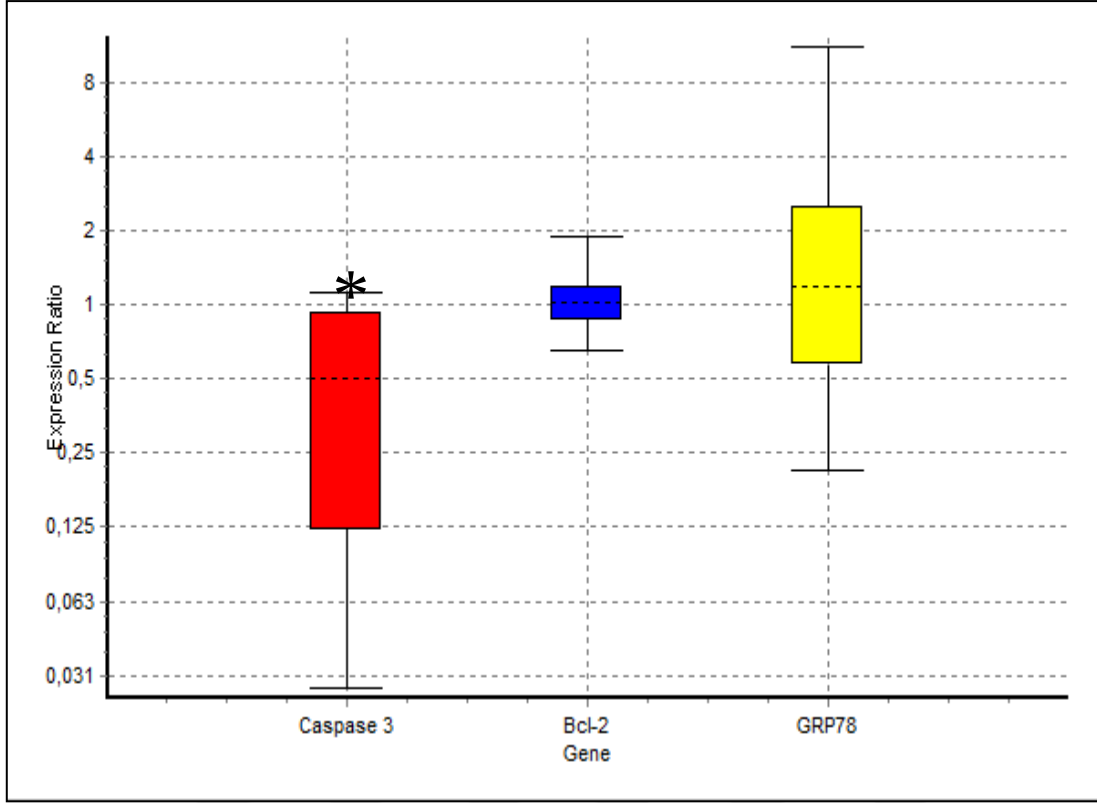
^{a,b} : Aynı sütunda farklı üslü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05).

4.5 β -Arbutinin MCF-7 Hücrelerinde Apoptoza, Proliferasyona ve Endoplazmik Retikulum Stresine Etkileri

Bir maddenin kanser hücrelerinde tedavi edici olabilmesi için, başka bir ifade ile antikanserojen olabilmesi için, kanser hücrelerinde programlı hücre ölümü olan apoptozisi uyatabiliyor nitelikte olması gerekir. Ayrıca antikanserojen etkili maddelerin kanser hücrelerinde proliferasyonu (hücre yenilenmesi ve çoğalması) da baskılaması beklenir. Sunulan çalışmada β -arbutinin MCF-7 hücrelerindeki apoptoza etkisini belirlemek amacıyla Caspase 3 geninin, proliferasyona etkisini belirlemek amacıyla Bcl-2 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. Ayrıca bir endoplazmik retikulum stresi parametresi olan GRP78 mRNA düzeyleri de analiz edilmiştir.

4.5.1 LD₀ dozunda β -Arbutinin MCF-7 hücrelerinde Apoptoz, Proliferasyon ve Endoplazmik Retikulum Stresine Etkisi

β -arbutinin MCF 7 hücrelerinde apoptoz ve proliferasyona etkilerini belirleyebilmek için, deney gruplarından elde edilen veriler, kontrol grubu ile ayrı ayrı kıyaslanmıştır. Böylelikle beta arbutinin MCF-7 hücrelerinde tedavi edici olabilecek LD₀ dozunun etkisi (Şekil 4.2), hafif toksik kabul edilebilecek LD₁₀ dozunun etkisi ve antikanserojen etkili doz olarak kabul edebileceğimiz LD₅₀ dozunun etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

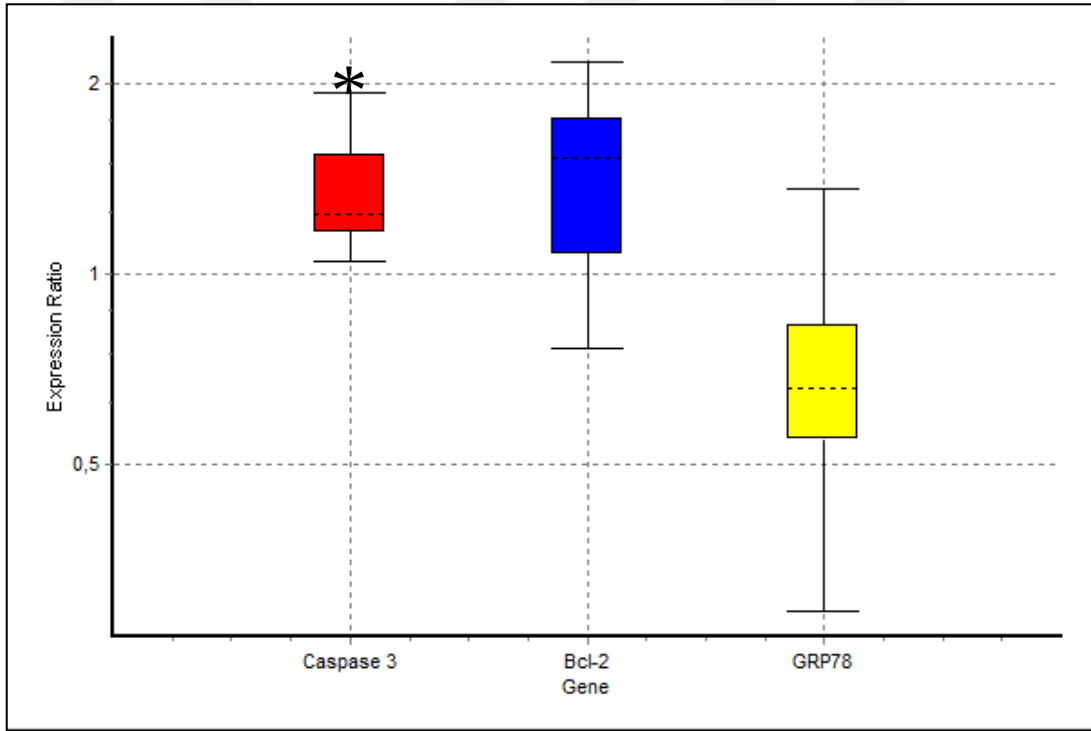


Şekil 4.2 LD₀ dozunda β -arbutinin MCF-7 hücrelerinde apoptoz, proliferasyon ve endoplazmik retikulum stresine etkisi (* işaretini taşıyan parametre istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde kontrol grubuna göre farklıdır).

Bu bağlamda LD₀ dozu uygulanan grubun verileri kontrol grubu ile kıyaslandığında Caspase 3 mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiki düzeyde fark oluşturacak şekilde ($p=0,040$) baskılandığı belirlendi (Şekil 4.2). Bununla birlikte proliferatif bir gen olan Bcl-2 ve Endoplazmik retikulum stresi parametresi olan GRP78 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol verileri ile herhangi bir istatistiki fark oluşturmadığı (p değerleri Bcl-2 için 0,765 ve GRP78 için 0,65) görüldü. Bu veriler LD₀ dozunda beta arbutinin kanser hücrelerinde herhangi bir proliferasyona neden olmadan antioksidan etkilerini gösterebileceğini ifade etmektedir. Beta arbutinin düşük dozlarda MCF-7 hücrelerinde Caspase 3'ü baskılaması nedeni ile apoptozisi baskıladığı söylenebilir. Bu kanserle mücadele adına istenen bir durum değildir. Bu nedenle göğüs kanserli kişilerin arbutin içerikli ürünleri tüketirken bilinçli olmaları gerekebilir.

4.5.2 LD₁₀ dozunda β -Arbutinin MCF-7 Hücrelerinde Apoptoz, Proliferasyon ve Endoplazmik Retikulum Stresine Etkisi

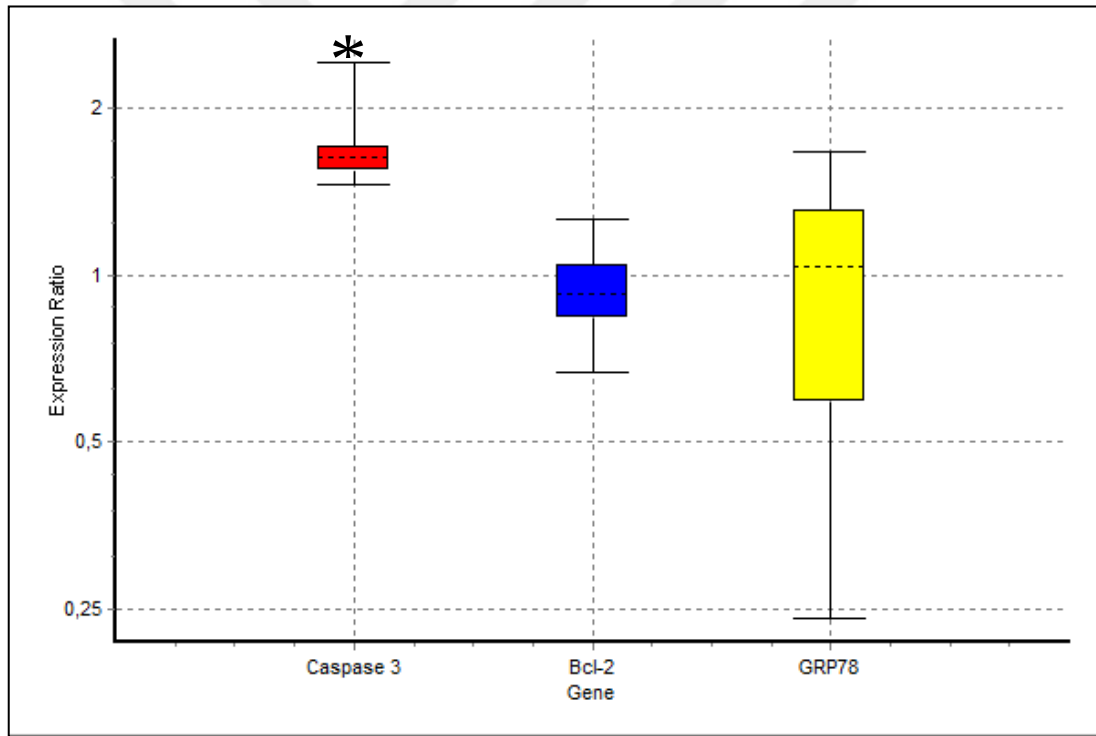
β -arbutin LD₁₀ dozunda MCF-7 hücrelerine uygulandığında 24 saat sonunda caspase 3 mRNA ekspresyon düzeylerini uyardığı görüldü ($p=0,002$). Sitotoksosite analizleri ile belirlenen LD₁₀ dozunun, hücreleri kontrol grubuna göre %10 oranında öldürecek etkide bir doz olduğu düşünülürse sonuçların birbiriyle uyum gösterdiği ifade edilebilir. Analizi gerçekleştirilen diğer genler incelendiğinde ise LD₁₀ grubu Bcl-2 ve GRP78 mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre bir farklılık göstermediği (Bcl2 için p değeri 0,056, GRP78 içinse 0,052) belirlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 LD₁₀ dozunda β -arbutinin MCF-7 hücrelerinde apoptoz, proliferasyon ve endoplazmik retikulum stresine etkisi (* işaretini taşıyan parametre istatistiksel olarak $p<0,05$ düzeyinde kontrol grubuna göre farklıdır).

4.5.3 LD₅₀ dozunda β -Arbutinin MCF-7 hücrelerinde Apoptoz, Proliferasyon ve Endoplazmik Retikulum Stresine Etkisi

Yapılan sitotoksosite analizlerine göre 24 saatlik inkübasyon sonucunda MCF-7 hücrelerinin yarısının ölmesine neden olan LD₅₀ dozu uygulandığında MCF-7 hücrelerinde apoptozun uyarıldığı görüldü. Nitekim LD₅₀ dozu uygulanan grupta apoptozis sinyal yolunun son üyesi olan Caspase 3 mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiki fark oluşturacak düzeyde ($p=0,004$) uyarıldığı belirlendi (Şekil 4.4). Bununla birlikte uygulanan β -arbutin dozunun analizi gerçekleştirilen diğer genlerin (Bcl-2 ve GRP78) mRNA ekspresyon düzeylerini istatistiki düzeyde etkilemediği belirlendi.



Şekil 4.4 LD₅₀ dozunda β -arbutinin MCF-7 hücrelerinde apoptoz, proliferasyon ve endoplazmik retikulum stresine etkisi (* işaretini taşıyan parametre istatistiksel olarak $p<0,05$ düzeyinde kontrol grubuna göre farklıdır).

4.6 MCF-7 Hücrelerinde β -Arbutinin Östrojen Reseptörlerine ve p53 Seviyelerine Etkisi

Sunulan çalışmanın literatür özeti kısmında da değinildiği üzere meme kanserinde östrojen hormonunun etkilediği reseptörlerin varlığı ve miktarı, hastalığın tedavisi açısından önemlidir. ER Bcl-2 geni aracılığı ile kanser hücrelerinde proliferasyonu uyarırken, p53 genini ise baskılayarak apoptozis mekanizmasını sekteye uğratmaktadır. Bu durum ise hastalığın daha da ilerlemesine neden olabilmektedir. Bu nedenle β -arbutinin meme kanseri hücrelerinde etkileri belirlenirken, metaryal-metot kısmında da değinildiği gibi immünohistokimyasal yöntemle ER⁺ ve p53⁺ hücre sayısı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.6)' da sunulmuştur.

Çizelge 4.6 MCF-7 Hücrelerinde β -Arbutinin p53 ve ER'lerine Etkisi

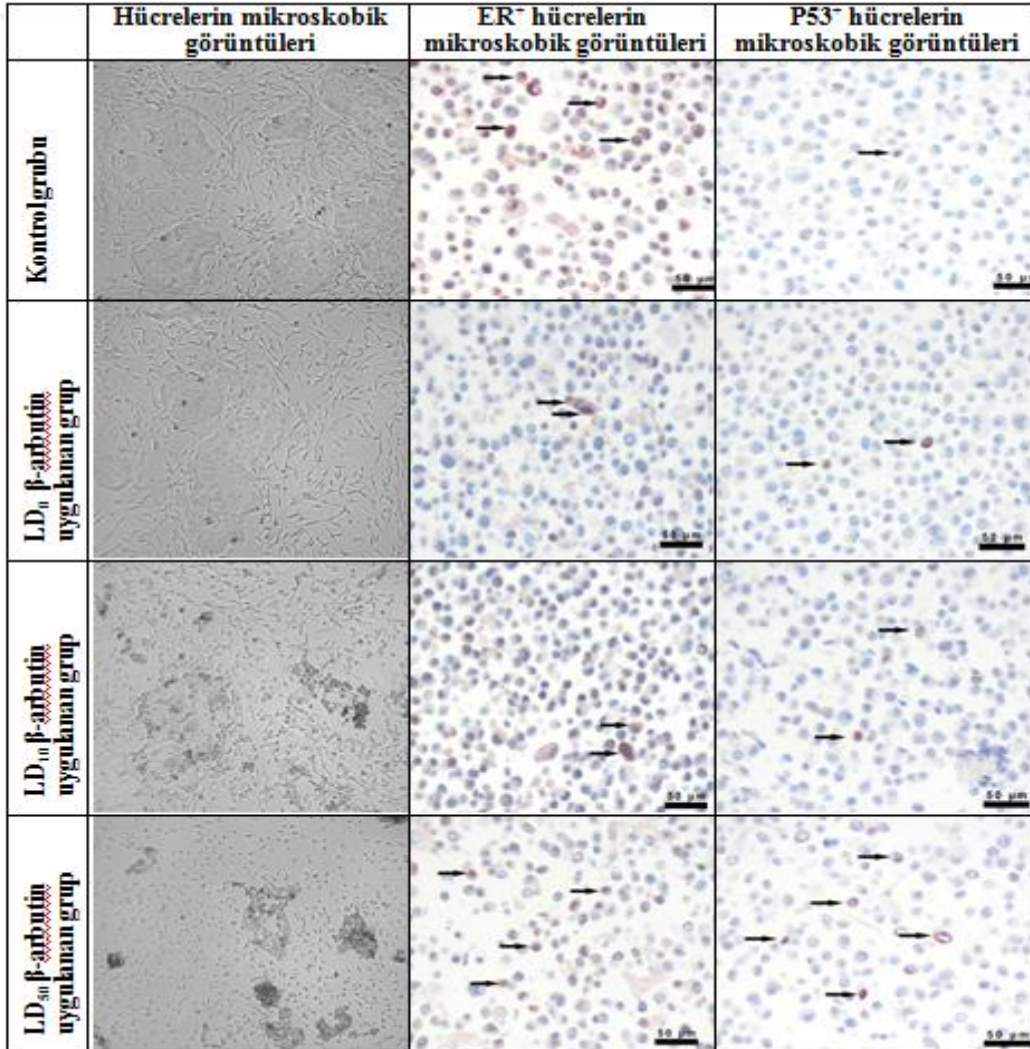
Deney Grupları	p53 ⁺ Hücre Sayısı	ER ⁺ Hücre Sayısı
Grup 1; Kontrol grubu	3,52 $\pm$ 1,40 ^a	62,20 $\pm$ 10,93 ^a
Grup 2; LD ₀ dozu β -arbutin grubu	4,66 $\pm$ 1,40 ^a	18,26 $\pm$ 6,35 ^b
Grup 3; LD ₁₀ dozu β -arbutin grubu	4,40 $\pm$ 1,22 ^a	32,90 $\pm$ 7,31 ^c
Grup 4; LD ₅₀ dozu β -arbutin grubu	7,18 $\pm$ 1,55 ^b	41,23 $\pm$ 6,10 ^d
P	0,000	0,000

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir (n=5)

^{a,b, c, d} : Aynı sütunda farklı üslû ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05). Her bir örnekten dört farklı en büyük büyütme alanı (400x) fotoğraflanarak p53⁺/ER⁺ hücre sayısı belirlendi.

Veriler incelendiğinde kontrol grubu ile LD₀ ve LD₁₀ dozunda β -arbutin uygulan gruplar arasında p53 pozitif hücre sayısı açısından herhangi bir istatistiki fark oluşmadığı görülmektedir. Fakat LD₅₀ dozunda β -arbutin uygulandığında p53 pozitif hücre sayısının arttığı belirlenmiştir. Bu bulgular β -arbutinin genomun gardiyanı olarak nitelendirilen p53 düzeylerini MCF-7 hücrelerinde artırdığını göstermektedir.

Deney gruplarına ait ER⁺ hücre sayıları değerlendirildiğinde tüm gruplar arasında istatistiki farklılıkların olduğu dikkati çekmektedir. Kontrol grubunda ER⁺ hücre sayısının en yüksek olduğu görülmektedir. Hücrelere β -arbutin uygulanarak 24 saat inkübe edildiğinde kullanılan tüm dozlarda ER⁺ hücre sayısının azaldığı görülmektedir. Bu düşüşün en fazla LD₀ dozunda, en az ise LD₅₀ dozunda olduğu anlaşılmıştır. Bu veriler β -arbutinin östrojen reseptör oluşumunu baskılayarak meme kanserinde faydalı olabileceğini akla getirmektedir. Çizelge 4.6’da değerleri sunulan, ER⁺ ve p53⁺ hücre sayılarının belirlendiği lamlardan alınan mikroskopi görüntüleri (Şekil 4.5)’te sunulmuştur.



Şekil 4.5 İmmunohistokimyasal değerlendirmede kullanılan hücrelerin mikroskop görüntüleri

(Her bir deney grubunun değerlendirilmesinde kullanılan lamlardan sadece bir tanesinin mikroskop görüntüsüne tabloda yer verilmiştir. Oklar (→) ER⁺ hücrelerini ve p53⁺ hücrelerini göstermektedir)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Arbutin, biberiye, armut, ayı üzümü gibi bitki türlerinin yapraklarında bulunan bioaktif maddelerden birisidir. Arbutin içeriği yüksek olan bitkilerden birisi olan ayı üzümünün (Bearberry; *Arctostaphylos uva ursi*) geleneksel olarak idrar yolları hastalıklarında kullanımının olduğu bilinmektedir (Couteau and Coiffard 2016). Bunun yanında yapılan bilimsel araştırmalar arbutinin cilt kanseri, böbrek taşı tedavileri, insanların cildinde görülen çil, ben ve lekelerin giderilmesinde cilt beyazlatma ajanı olarak yararlı olabileceğini göstermektedir (Olumide *et al.* 2008, Cheng *et al.* 2007).

Melasma, hiperpigmentasyon ve özellikle yüzde oluşan çillerin tedavisinde yarım asıra yakın bir süre hidrokinonlar kullanılmıştır. Son yıllarda kanserojen bir madde olan benzenin bir türevi olan hidrokinonun özellikle de kozmetik ürünlerde kullanımı yasaklanmıştır (Nordlund *et al.* 2006). Bunun en önemli sebepleri arasında kliniklerde, deney hayvanları ve hücre kültürü modellerinde yapılan bilimsel çalışmalarla hidrokinonların organizmada oksidatif stres, DNA hasarı gibi oluşumları uyurabileceğinin gösterilmiş olmasıdır (Westerhof *et al.* 2005, Horita *et al.* 2005, Levitt 2007 and Jurica *et al.* 2017). Hidrokinonun metabolizma açısından sakıncaları olduğu öğrenilince, benzer etkileri olabilecek daha güvenilir ürünlerin kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu bağlamda doğal olarak elde edilebilen β -arbutinin ve sentetik arbutin türleriyle yapılan çalışmalar, arbutin türlerinin hidrokinona göre sitotoksitesinin daha az olduğunu, bu nedenle daha güvenilir bir cilt beyazlatma ajanı olarak kabul edilebileceğini göstermektedir (Boissy *et al.* 2005, Hu *et al.* 2009, Miao *et al.* 2016).

Son yıllarda arbutin türlerinin farklı hastalık modelleri üzerindeki etkileri de araştırılmaya başlanmıştır. Mesela arbutinin kanser, özellikle de cilt kanserinin tedavisi açısından da yararlı olabileceği ifade edilmektedir (Cheng *et al.* 2007). Buna benzer çalışmalar sonucunda arbutinin cilt beyazlatmaya ve cilt kanserine yönelik kullanımının yanı sıra alternatif kullanım alanları da belirlenebilir. Ama bunun için çalışmaların öncelikle hücre kültürü ortamında veya deney hayvanları ile oluşturulacak modellemelerle yapılması, sonrasında ise kliniklerde faz çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Böylelikle mevcut arbutin türlerinin ve ileride sentezlenebilme olasılığı

olan farklı arbutin türlerinin olası yararları/yan etkileri belirlenebilir. Bu kapsamda sunulan çalışmada öncelikli olarak arbutin izoformlarının MCF-7 hücrelerindeki sitotoksosite düzeyleri belirlenmiştir. Sonrasında ise sitotoksitesi daha yüksek olduğu belirlenen arbutin izoformu olan β -arbutinin MCF-7 hücrelerinde antikanserojen (apoptotik), antioksidatif, antiinflamatuvar gibi olası etkileri araştırılmaya çalışılmıştır.

Arbutin ve farklı hücre hatları ile yapılan çalışmalarda çoğunlukla arbutinin düşük dozları kullanılmıştır. Düşük dozlarda arbutinin herhangi bir sitotoksitesi olmadan antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri olabileceği belirtilmektedir (Lee and Kim 2012, Omori *et al.* 2015). Örneğin Makrofaj/osteoklast öncülü bir fare hücre hattı olan RAW hücreleri ile yapılan çalışmalarda arbutinin (hangi izoformu olduğu belirtilmemiş) herhangi bir sitotoksitesinin olmadığı belirtilmektedir. En yüksek 200 μ M konsantrasyon da olmak üzere beş farklı arbutin dozu kullanılan çalışmada, arbutinin kemik hücrelerinin öncülü olan osteoklastların farklılaşmasını baskıladığı ifade edilmektedir. Ayrıca arbutinin RAW hücrelerinde süperoksit üretimini uygulanan doza bağlı bir şekilde azalttığı rapor edilmektedir (Omori *et al.* 2015).

Başka bir hücre hattı (fare BV2 mikrogial hücreleri) ile yapılan çalışmada ise arbutinin sitotoksositeye, oksidatif strese ve inflamasyona etkileri incelenmiştir. İlgili çalışmada BV2 mikrogial hücrelerine arbutinin 50-100-250-500 ve 1000 μ M dozları uygulandığı ve herhangi bir sitotoksosite oluşturmadığı belirtilmektedir. Aynı çalışmada lipopolisakkarit (LPS)'lerle toksisite oluşturulan BV2 mikrogial hücrelerinde, LPS uygulaması sonucu seviyelerinde artış görülen nitrit, iNOS gibi oksidan parametre düzeylerinin 100 ve 500 μ M dozlarında arbutin uygulaması sonrasında düşüş gösterdiği belirtilmektedir (Lee and Kim 2012). İnsan böbrek hücreleri (HK-2 hücre hattı) ile yapılan bir çalışmada da düşük dozlardaki (10, 30 ve 50 μ M) arbutinin MTT ile sitotoksitesi belirlenmiştir. HK-2 hücrelerinde arbutinin herhangi bir sitotoksitesinin olmadığı belirlenmiştir (Lv *et al.* 2019). Başka bir çalışmada ise hidrojen peroksitle oksidatif hasar oluşturulan retinal ganglion hücrelerinde (RGC) 25, 50, 100 ve 200 μ M konsantrasyonlarındaki arbutinin hücre canlılığına etkisi araştırılmıştır. MTT ile yapılan analizlerde düşük dozların sitotoksik olmadığı buna karşın 200 μ M dozunun sitotoksik etkili olduğu ifade edilmektedir (Zhao *et al.* 2019). Literatürden elde edilen bu bilgiler

arbutinin çoğu hücre hattı için düşük dozlardan ziyade yüksek dozlarda sitotoksik etkili olabileceğini göstermektedir.

Sunulan tez çalışmasında meme kanseri çalışmalarında en sık kullanılan hücre hatlarından olan MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7 hücre hattı östrojen ve progesteron reseptörleri açısından triple pozitif, luminal like adenokarsinoma hücre hattıdır (Calaf *et al.* 2018). Çoğu hücre hattında olduğu gibi MCF-7 hücre hattında da arbutin düşük dozlarda sitotoksik etkili değildir (Berdowska *et al.* 2013). Bu nedenle sunulan çalışmada arbutinin mM düzeylerindeki yüksek dozları kullanılarak antikanserojenik etkileri araştırılmaya çalışılmıştır. Çünkü MCF-7 ve arbutinle yapılan çalışmalarda arbutinin MCF-7 hücrelerinde sitotoksitesilerinin yüksek dozlarda gözlemlendiği belirtilmektedir. Literatürde doxorubisin gibi kemotarpik ilaçların aktif maddesi olan adriamycine dirençli MCF-7 hücre hattı (MCF-7/Adr) ile wild-type yani p53 geninde herhangi bir mutasyon olmayan MCF-7 hücre hattı (MCF-7/wt) üzerinde arbutinin sitotoksitesisi denenmiştir. Elde edilen bulgular arbutinin MCF-7/Adr hücrelerinde LD₅₀ konsantrasyonunun 5,85 mM, MCF-7/wt hücrelerinde ise 1000 mM'dan daha yüksek olabileceğini göstermektedir (Berdowska *et al.* 2013). Literatürde ifade edilen bu veriler arbutinin yüksek dozlarda MCF-7 hücrelerinde sitotoksik etkili olabileceğini ifade etmektedir. Nitekim sunulan çalışmada da arbutinin yüksek dozlarda sitotoksik etkili, başka bir ifade ile antikanserojen etkileri olabileceği belirlenmiştir.

Yapılan sitotoksitesite analizlerinde; β -arbutinin α -arbutine göre antikanserojenik etkisinin daha güçlü olduğu belirlenmiştir. Çünkü arbutinin MCF-7 hücrelerindeki antikanserojen etkili dozu olarak LD₅₀ dozları kabul edilirse, MCF-7 hücrelerinin yarısını öldürmek için gerekli olan β -arbutin dozunun (69,6 mM) α -arbutin (106,3 mM) dozuna oranla daha az olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1; Çizelge 4.2). Başka bir ifade ile β -arbutin daha düşük dozları ile MCF-7 hücrelerinin yarısını öldürebilmektedir. Bu nedenle β -arbutinin sitotoksitesisi α -arbutine göre daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgular MCF-7 meme kanseri hücre hattı için doğal olarak bitkilerden elde edilen β -arbutinin sentetik olarak üretilen α -arbutine göre antikanserojenik etkilerinin daha güçlü olduğunu göstermektedir. Literatürde β -arbutin ve α -arbutinin antikanserojen etkilerini karşılaştıran herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bununla birlikte arbutinin daha çok kozmetikte, özellikle de cilt lekelerine karşı kullanılması nedeni ile bu alanda β -

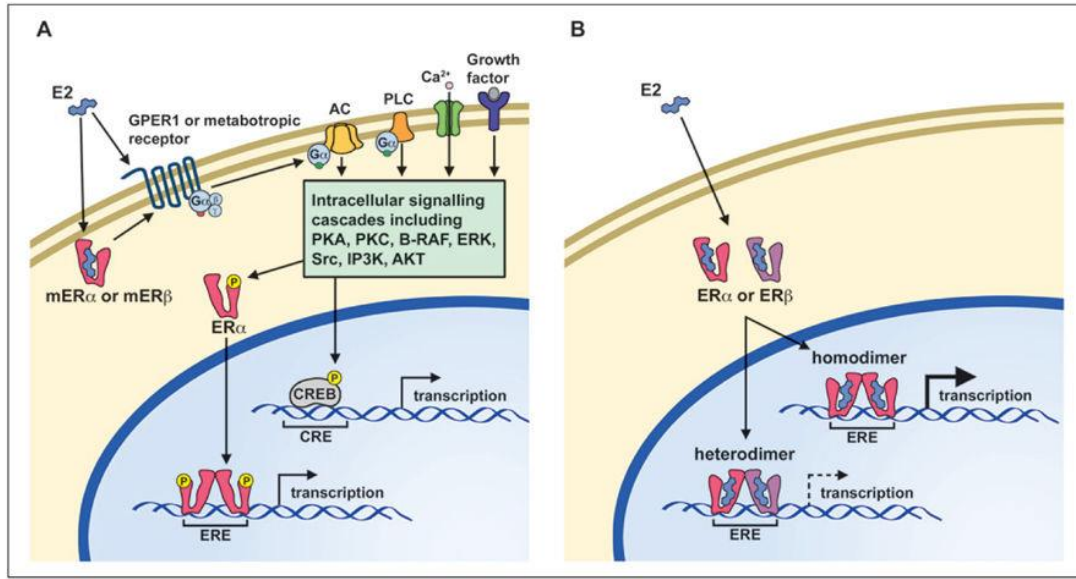
arbutin ve α -arbutinin pigment oluşumuna etkisi (antitirozinaz etkisi) sıklıkla karşılaştırılmaktadır (Couteau and Coiffard 2016, Garcia-Jimenez *et al.* 2017). Bu karşılaştırmalarda α -arbutinin β -arbutine oranla daha etkili olabildiği ifade edilmektedir.

Çalışmada β -arbutinin LD₅₀ dozu dışında kullanılan diğer dozu ise LD₀ dozu olarak bilinen ve beta arbutinin 24 saat inkübasyon sonunda MCF-7 hücrelerinde herhangi bir ölüm veya proliferasyona neden olmayan dozudur. Bu doz kanser hücrelerinde herhangi bir proliferasyona neden olmadığı için, diğer hücrelerin kanser nedeniyle organizmada oluşmuş olan oksidatif stres, inflamasyon vb. durumlarını düzeltmek amacıyla antioksidan olarak kullanılabilecek dozudur. Çünkü daha düşük dozlar MCF-7 hücrelerinin üremesine pozitif katkı sağlamaktadır. Sunulan çalışmada LD₀ dozu uygulanan hücrelerde Caspase 3'ün ve ER- α 'nın baskılandığı belirlenmiştir. Bununla birlikte LD₀ dozunun oksidatif stres, inflamasyon, proliferasyon ve endoplazmik retikulum stresi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Meme kanserini oluşturan tümörler heterojen bir dağılım göstermekte olup, her bir türün özellikleri de birbirinden farklı olabilmektedir. Meme kanseri tedavisi de var olan tümörün özelliğine göre şekillenmektedir. Örneğin ER-pozitif ve progesteron pozitif özellikte olan meme kanserleri hormon tedavisine %50-70 olumlu cevap verebilirken, sadece ER⁺ veya progesteron pozitif hücrelere sahip olan meme kanseri %33 oranında, ER⁻ ve progesteron negatif hücrelere sahip meme kanserli hastalar ise %10'dan daha az oranda hormon tedavisine cevap vermektedir (Pinder and Buzdar 2008). Bu nedenle meme kanserinde tedavi belirlenmeden önce var olan meme kanserinin türünün doğru bir şekilde belirlenmesi gerekir.

Organizmada normal meme gelişiminde çeşitli sinyal yolları görev alır. Bunlar arasında en temel olarak östrojen reseptörü sinyal yolu, HER2 sinyal yolu ve Wnt/ β -katenin yolu sayılabilir (Feng *et al.* 2018). Sunulan çalışmada kullanılan MCF-7 hücre hattı bir ER⁺ meme kanseri hücre hattı olması nedeni ile kanser ilerlemesi ve tedavisi açısından östrojen reseptörü sinyal yolu öne çıkmaktadır. Bu nedenle meme kanserinde östrojen ve östrojen aracılı sinyal yolunun açıklaması ve elde edilen sonuçlarla ilişkisi bundan sonraki kısımda geniş olarak sunulmuştur.

Östrojen (E_2 ; östradiol), meme dokusunda hücre bölüklerinin (gland) ve bölümlerinin gelişiminde rol oynayan bir hormondur. Başka bir ifade ile östrojen hormonu meme dokusunda hücrelerin bölünerek çoğalmasını yani proliferasyonu uyarır (Carroll 2016). Östrojen hormonu hücrelerdeki etkilerini reseptörleri ile etkileşerek aktive ederler. Östrojen reseptörleri (ER; Estrogen receptor) hücre membranlarında G proteinleri ile eşlenik olarak bulunabildiği gibi, hücre içinde nükleer reseptör olarak da bulunabilir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Östrojenin (E_2) etki mekanizmaları, A) Östrojen etkilerinin hızlı oluşması için kullanılan sinyal yolu, B) Östrojen etkilerinin oluşmasında kullanılan klasik yol (Bean *et al.* 2014).

Membranda bulunan ER sinyal yolu östrojenin hızlı bir şekilde etkilerinin gösterilmesinde görev alır. Çoğunlukla sinir sistemi hücrelerinde işleyen bu sinyal yolu, ilerleyen basamaklarda nükleer olarak etki eden sinyal yolu ile de etkileşebilir. Östrojene ait hücre içi reseptör olarak, başka bir ifade ile östrojenin nükleer faktörü olarak $ER-\alpha$ ve $ER-\beta$ olmak üzere 2 adet nükleer östrojen reseptörü olduğu belirlenmiştir. Nükleer reseptörler aracılığı ile östrojen hormonu meme dokusunda gen transkripsiyonu uyararak, meme hücrelerinin proliferasyonunu sağlar (Bean *et al.* 2014). Nitekim hormon bağımlı meme kanseri hücre hatları (T47, ZR75-1, MCF-7) ile yapılan çalışmalarda, östrojenin, ER sinyal yolu aracılığı ile meme kanseri hücre hatlarında proliferatif genler olan Bcl-2 ve Bcl-xL seviyelerini uyararak antiapoptotik

rol oynadığı ifade edilmektedir (Gompel *et al.* 2000). Sunulan çalışmada ise β -arbutinin uygulanan tüm dozlarda antiapoptotik bir faktör olan Bcl-2'yi etkilemediği (uyarmadı/baskılamadığı) belirlendi (Şekil 4.2; Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). MCF-7 hücrelerinde arbutinin Bcl-2 seviyelerini etkilememesi, en azından kanser hücrelerinde proliferatif/antiapoptotik etkili olmadığını göstermesi açısından önemlidir. Çünkü kanser hücrelerinde apoptozun baskılanması, kanserin daha hızlı ilerlemesine sebep olmaktadır. Bu nedenle meme kanseri olan hastalarda ER etkisiyle oluşan gen transkripsiyonu kontrol altında tutulmalıdır.

Meme kanserinin oluşmasında, ER aracılı hücre bölünmesinin çeşitli dış etmenlerin etkisiyle kontrolsüz bir şekilde çevrilmesinin de etkili olduğu ifade edilmektedir. Böyle gelişen meme kanserine ER⁺ meme kanseri adı verilmekte ve tedavileri ER aktiviteleri bloke edilerek yapılmaktadır (Carroll 2016). ER⁺ meme kanseri olan hastalarda ER'nin DNA'da ilgili genlerin transkripsiyonunu uyarması birçok kofaktör, ER ile ilişkili protein ve transkripsiyon faktörü aracılığı ile gerçekleşir. ER sinyal yolunun çalışmasına aracılık eden bu faktörlerden birinin inhibisyonu da ER bağlantılı sinyal yolunu bozabilir (Carol 2016). Bu kapsamda ER sinyal yolunu bozabilen veya ER aktivitesini bloke edebilen biyoaktif maddeler ER⁺ meme kanseri olan hastalar için umut ışığı olabilir. Arbutinin veya arbutin gibi biyoaktif maddelerin ER'lerine etkisinin belirlendiği birincil çalışmaların yapılması önemlidir. Sunulan çalışma da bu bağlamda planlanarak arbutinin ER'lerine (ER- α) etkisi immunohistokimyasal analizler yardımı ile belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar LD₀ dozunda β -arbutinin (kontrol grubuna göre) yüksek oranda ER- α düzeylerini baskıladığını göstermektedir. MCF-7 hücrelerine uygulanan arbutin dozu arttıkça, ER- α düzeylerindeki baskılanmanın azalsa da devam ettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.6; Şekil 4.5). Bu veriler β -arbutinin bloke ederek veya başka bir yolla östrojen reseptörlerinin inaktivasyonunda rol alabileceğini göstermektedir. Östrojen reseptörlerinin inaktivasyonunu sağlayan biyoaktif maddelerin ER⁺ meme kanserinde ilaç olarak kullanıldığı düşünülürse, sunulan çalışma ile elde edilen primer sonuçlar tedaviye katkı sunabilecek protokoller geliştirilmesi adına yararlı olabilir.

ER⁺ meme kanseri hastalarının tedavilerinde ER'lerini bloke etmek amacıyla genel olarak olarak 2 grup ilaç kullanılmaktadır. Bunlar selektif östrojen reseptör mediatörleri (SERMs) ve aromataz inhibitörleri (AIs) olan ilaçlardır (Fisher *et al.* 2005, Carroll 2016). Tamoksifen gibi ER mediatörleri ER'de ligant bağlama bölgelerine östrojeni taklit ederek bağlanır. Fakat ER aracılı gen transkripsiyonunun düzenlenmesini baskılar (Shiau *et al.* 1998). Böylelikle varsa dolaşımdaki östrojenin reseptörüne bağlanarak etkilerinin oluşmasını engellemiş olur. Bu bağlamda tamoksifen gibi ER mediatörü olan ilaçlar (SERMs) östrojen antagonisti ilaçlar olarak da tanımlanabilir.

Meme kanserinde ER'nin bloke edilmesinde kullanılan en önemli aromataz inhibitörlerinden biri fulvestrant adı verilen bir aktif maddedir. Bu aktif madde tamoksifenden farklı olarak ER'ne bağlandıktan sonra reseptör proteininin degrade olarak aktivasyonunu kaybetmesini sağlar (Carroll 2016). Böylelikle meme kanserini uyaran bir ligant olarak görev yapan östrojenin bağlanabileceği reseptör sayısı azalınca/tükenince hastalık tedavi edilmiş olur. Bununla beraber ER⁺ meme kanserli hastalarda ER yolunu bloke eden ilaçlara karşı zamanla direnç gelişebilir. Yapılan çalışmalar hastaların yaklaşık 1/3'ünde direnç gelişebileceğini göstermektedir (EBCTCG 2005). Bu nedenle mevcut tedavi yöntemleri ile kombine bir şekilde veya tek başına kullanılabilecek yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi veya etkili olabilecek yeni aktif maddelerin belirlenmesi önem arz etmektedir.

ER⁺ meme kanseri özelliği taşıyan hücre hattı sayısı çok azdır. Sunulan çalışmada kullanılan hücre hattı olan MCF-7, ER⁺ meme kanseri ile ilgili in-vitro araştırmalar en sık kullanılan hücre hattıdır. ER sinyal yolu yüzlerce proteinin genomda binlerce bölge ile etkileşmesi sonucu, birçok genin ve kodlanmamış RNA'ların aktivitelerinin düzenlendiği bir ağıdır (Carroll 2016). Bu sinyal yolunu var olan tedavilerle kombine bir şekilde veya tek başına etkileyerek ER⁺ meme kanserini tedavi etmek için, arbutin gibi ER'lerini etkileyen aktif maddeler yeni tedavi protokollerinin oluşturulmasına katkı sağlayabilir.

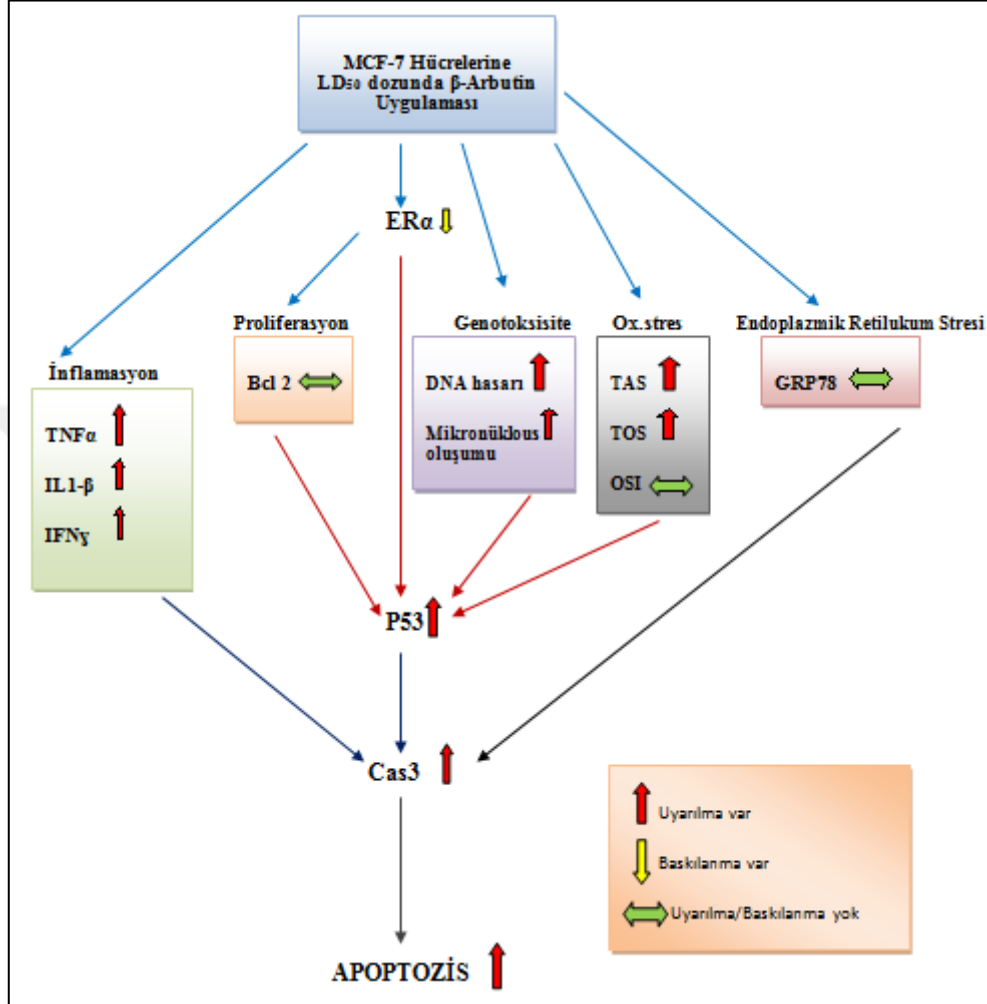
Literatürde arbutinin östrojen benzeri etkiler gösterebileceği ile ilişkili çalışmalar olduğu görülmektedir. Bu çalışmalardan biri olan Chinese Yam (*Dioscorea opposite*

Thunb.) bitkisinden izole edilen arbutinin östrojen reseptör- β 'yi ve östrojenin membran reseptörü olarak görev yapan bir G proteini olan GRP30'u uyarak östrojenik etkiler gösterebileceği ifade edilmektedir (Zeng *et al.* 2018). Fakat arbutinin ER sinyal yolunun üçüncüsü olan östrojen reseptör- α 'yı nasıl etkilediği ile ilgili herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanılamamıştır. Bu bağlamda sunulan tez çalışmasında MCF-7 hücrelerinde arbutinin ER- α 'ya etkisi immunohistokimyasal olarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde MCF-7 hücrelerinde arbutinin ER- α 'yı uygulandığı tüm dozlarda baskıladığı belirlenmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan MCF-7 hücre hattı bir ER⁺ meme kanseri hücre hattı olması nedeni ile östrojen reseptörü sinyal yolunun bir aktif madde tarafından nasıl etkilendiği kanser ilerlemesi ve tedavisi açısından önem arz etmektedir. Çünkü ER'leri meme dokusunda bulunan hücrelerde proliferasyonu uyarak apoptozu baskılamaktadır (Carroll 2016 and Bean *et al.* 2014). Bu açıdan değerlendirildiğinde meme kanserinde ER'lerinin baskılanmasının proliferasyonu baskılayarak veya apoptozu uyarak antikanserojen etkili olabileceği bilinmektedir. Zaten mevcut tedavi yöntemlerinin bir kısmı da ER'lerinin etkilerinin baskılanması esasına dayanmaktadır. Bu açıdan değerlendirildiğinde β -arbutinin MCF-7 hücrelerinde ER- α 'yı baskılıyor olması meme kanserinde antikanserojenik etkileri olabileceğini akla getirmektedir. Nitekim elde edilen bulgular yüksek dozda (LD₅₀ dozunda) arbutinin etkin bir şekilde antikanserojen etkili olabileceğini bize göstermektedir (Şekil 4.1). Çünkü sunulan çalışmada β -arbutinin MCF-7 hücrelerine LD₅₀ dozunda uygulandığında Caspase 3 ve p53 düzeylerini artırarak apoptozu uyurabileceğini göstermektedir.

Yüksek dozlardaki β -arbutinin MCF-7 hücrelerinde apoptozu hangi mekanizmalarla uyardığının belirlenebilmesi için deney gruplarında apoptozla birlikte; inflamasyon, oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi ve genotoksisite düzeyleri de analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında özellikle LD₅₀ dozunda MCF-7 hücrelerine uygulanan β -arbutinin hangi mekanizmalar aracılığı ile antikanserojenik etki göstermiş olabileceği (Şekil 4.7) özetlenmeye çalışılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde apoptozun uyarılmasında oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stresinin rol oynamadığı söylenebilir. Çünkü yapılan analizlerde β -arbutinin MCF-7 hücrelerinde

oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stresini etkilemediği anlaşılmıştır (Çizelge 4.3; Çizelge 4.4).



Şekil 4.7 LD₅₀ dozunda MCF-7 hücrelerine uygulanan β-arbutinin antikanserojenik etkilerinin oluşmasına aracılık eden mekanizmalar.

Laboratuvar çalışmaları sonucu elde edilen bütün sonuçlar bir araya getirildiğinde LD₅₀ dozunda MCF-7 hücrelerine uygulanan β-arbutinin inflamasyonu ve genotoksisiteyi artırarak p53 ve Caspase 3 aracılığı ile apoptozu uyarmış olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.7). Bununla birlikte bir maddenin hücre veya organizma üzerinde genotoksik etkiler (DNA hasarı ve mikronükleus oluşumu) oluşturmasında en temel yollardan birisi, o maddenin oksidatif stres aracılığı ile genotoksik etkilerini açığa çıkarmasıdır. Fakat sunulan çalışmada LD₅₀ dozunda MCF-7 hücrelerine uygulanan β-arbutinin oksidatif stres oluşturmada DNA hasarı ve mikronükleus oluşumunda artışa

neden olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuç β -arbutinin genotoksisiteyi direkt DNA sarmalını etkileyerek meydana getiriyor olabileceğini akla getirmektedir. Bunun anlaşılabilmesi için β -arbutinin DNA sarmalı üzerindeki olası etkileşimleri ile ilgili ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kliniklerde, deney hayvanları ve hücre kültürü modellerinde yapılan bilimsel çalışmalarla hidrokinonların organizmada oksidatif stres, DNA hasarı gibi oluşumları uyurabileceği gösterilmiştir (Westerhof *et al.* 2005, Horita ve *et al.* 2005, Levitt 2007, Jurica *et al.* 2017). Arbutinin de bir hidrokinon türevi bileşik olduğu düşünülürse, sunulan bu çalışmada da gösterildiği üzere özellikle yüksek dozlarda genotoksik etkileri olabileceği olasıdır. Hücrelere LD₀ dozunda β -arbutin uygulandığında hem DNA hasarı (comet skorları) hem de mikronükleus oluşumuna istatistiki düzeyde herhangi bir etkisi olmadığı belirlendi. Bununla beraber LD₁₀ ve LD₅₀ dozlarında uygulanan β -arbutinin genotoksik etkili olabileceği belirlendi. Literatürde de yapılan çalışmalar hidrokinon gibi arbutinin de genotoksik etkiler gösterebileceğine işaret etmektedir. Örneğin deney hayvanlarıyla yapılan bir çalışmada 200 mg/kg dozunda hidrokinon ve arbutinin düşük derecede de olsa genotoksisite oluşturabileceği belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada ratların beyaz kan hücre sayılarını hidrokinonun artırırken arbutinin azalttığı rapor edilmektedir (Jurica *et al.* 2018).

Genotoksisiteyle beraber β -arbutinin MCF-7 hücrelerinde apoptozu uyarmasında rol oynayan diğer mekanizmanın proinflamatuvar mekanizma olduğu belirlenmiştir. İnflamasyon; çeşitli stres koşullarına karşı organizmayı koruyabilmek için immun sistem tarafından meydana getirilen bir savunma mekanizması veya bir immun yanıt olarak tanımlanabilir. Bu yanıt çok farklı sinyal yollarını aktive edebilir. Bazen organizmayı koruyacak sinyal yolları aktive olurken, bazen de kanser gelişimini tetikleyecek sinyal yolları aktive olabilir. Hangi sinyal yolunun aktive olacağı inflamasyonun akut veya kronik olması ile ilişkilidir (Sheikholeslami *et al.* 2017). Organizma açısından koruyucu bir cevap olarak gelişen inflamasyon akut olanıdır. Akut inflamasyonda immun sistem uyarılarak, immun hücrelerin sitotoksik aktiviteleri sayesinde zararlı bakteri, virüs veya kanser hücreleri gibi organizma açısından olağan/normal olmayan hücrelerle mücadele eder (Disis 2010).

İnflamasyonun oluşmasında rol alan önemli metabolik yollardan biri, proinflatuvar metabolik yol olarak bilinen NFkB sinyal yoludur. NFkB sinyal yolu içsel veya dışsal proinflatuvar sinyallerden etkilenecek inflamasyonun oluşmasına aracılık edebilir. Fakat içsel veya dışsal etkilere karşı hücre veya organizmanın oluşturduğu inflamatuvar yanıtı rağmen çeşitli etkilerle NFkB sinyal yolunun uyarılması devam ederse akut inflamasyon, kronik hale gelmeye başlar. Kronik inflamasyonda NFkB sinyal yolunun aşırı uyarılması antiapoptotik genlerin aktive olmasına neden olabilir. Bu gibi durumlarda apoptoz baskılanır. Görevini yapamayan hücreler apoptozla parçalanıp yok edilemediği için, bölünmeye, çoğalmaya devam ederek kanserin başlamasına neden olabilmektedir (Hoesel and Schmid 2013, Sheikholeslami *et al.* 2017).

Kanserin geliştiği doku ve hücrelerde yani tümör mikro ortamında immun hücreleri ve immun hücrelerine ait inflamatuvar mediatörlerin (stokinler ve kemokinler gibi) etkileri, kanserojen veya antikanserojen etkiler oluşmasına sebep olabilir. Hangi etkinin öne çıkacağı çoğunlukla oluşan inflamasyonun türüyle ilişkilidir (Sheikholeslami *et al.* 2017). Kanser hücreleri açısından 4 tür inflamasyondan söz edilebilir. Bunlar; akut inflamasyon, kanser gelişiminde rol oynayan kronik inflamasyon, kanser geliştikten sonra tümörün neden olduğu inflamasyon ve son olarak da hastalığın tedavisi amacıyla uygulanan tedavilerin meydana getirmiş olabileceği inflamasyon şeklinde sıralanabilir. Bu inflamasyon türlerinden biri olan akut inflamasyonda immun hücreler kendilerini ve organizmayı korumak adına kanser hücrelerini otofajiye (kendi kendini yok etme) veya apoptoza sürükleyebilir. Örneğin MCF-7 hücreleri ile LPS kullanılarak toksikasyon modeli oluşturulan *in vitro* bir çalışmada, TNF- α seviyelerinin yükselişyle oluşan akut inflamasyonun bax/bcl-2 oranını artırarak proliferasyonu durdurduğu, apoptozu ise uyardığı ifade edilmektedir (Li *et al.* 2019). Arbutin gibi bir antioksidan olan timokinonun MCF-7 hücrelerindeki antikanserojen etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, timokinonun antikanserojenik etkilerini östrojen ve interferon sinyal yolları aracılığı ile gösterebileceği belirtilmektedir (Motaghed *et al.* 2014). Başka bir çalışmada ise TNF- α ve IFN- γ 'nın MCF-7 hücrelerinde hücre büyümesini inhibe ederek apoptoza neden olduğu belirtilmektedir (Wahyu *et al.* 2016).

Sunulan çalışmada da özellikle yüksek dozda (LD₅₀ dozunda) β -arbutin uygulandığında proinflatuvar stokin (TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ) düzeylerinin önemli bir şekilde artarak oluşan akut inflamatuvar yanıtın apoptozun şekillenmesinde (Şekil 4.7) rol oynadığı söylenebilir. MCF-7 hücrelerinde arbutinin apoptoza etkileri ve ilişkili olabilecek mekanizmalarla ilgili herhangi bir literatüre rastlanılamamıştır. Bu açıdan değerlendirildiğinde elde edilen sonuçlar yeni araştırmalara ışık tutacağı söylenebilir. Bununla beraber farklı hücre hatlarında arbutinin apoptoza etkilerine ilişkin bazı bulgular mevcuttur. Bu bulguları ortaya koyan çalışmaların birisinde insan böbrek hücrelerinde (HK-2 hücre hattı) yüksek glukozun neden olduğu apoptoza düşük dozlardaki (10, 30 ve 50 μ M) arbutinin etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar yüksek glukozun apoptozu uyardığı HK-2 hücrelerinde arbutinin; p53 ve Caspase 3'ü baskılayarak ve Bcl-2'yi ise uyararak antiapoptotik etkili olabileceğini göstermektedir (Lv *et al.* 2019). Başka bir çalışmada ise hidrojen peroksitle oksidatif hasar oluşturulan retinal ganglion hücrelerinde (RGC) arbutinin apoptoza etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular düşük dozlardaki (100 μ M) arbutin uygulamalarının p53 ve caspase 3 aracılığı ile apoptozu baskılayarak, hücre canlılığını artırdığını göstermektedir (Zhao *et al.* 2019). Bu çalışmalar düşük dozlarda arbutinin farklı hücre hatlarında apoptozu baskılayarak, hücreyi koruyucu rol oynayabileceğini göstermektedir.

Arbutin gibi birçok antioksidan düşük dozlarda organizma ve hücreler için koruyucu rol üslenirken yüksek dozlarda apoptozu uyararak, proliferasyonu baskılayarak sitotoksik etkili olabilmektedir. Düşük dozlarda koruyucu yüksek dozlarda ise sitotoksik etkili olan bu tür biyoaktif maddeler kanser hücrelerinde antikanserojen etkileri nedeniyle uzunca yıllardır araştırma konusu olmuştur. Örneğin MCF-7 hücrelerinde bir antioksidan olan quercetinin özellikle yüksek dozlarda hücre viabilitesi ve proliferasyonunu azaltabileceği gösterilmiştir (Schröder *et al.* 2019). Quercetinin MCF-7 hücrelerinde bax'ı uyararak, Bcl-2'yi ise baskılayarak Caspase kaskadını aktive ederek, caspase 3 aracılığı ile apoptoza neden olabileceği belirtilmektedir (Khorsandi *et al.* 2017). Benzer şekilde başka bir antioksidan curcuminin de MCF-7 hücrelerinde Caspase 3 ve NFkB ekspresyon düzeylerini artırarak apoptozu uyardığı (Calaf *et al.* 2018), bu etkileri nedeni ile meme kanseri hücrelerinde antikanserojenik etkiler gösterdiği belirtilmektedir.

Sunulan bu çalışmada da düşük dozlarında MCF-7 hücrelerinde sitotoksik etkileri olmadığı (Berdowska *et al.* 2013) daha önce belirlenmiş olan arbutinin, yüksek dozlarda antikanserojenik etkileri olabileceği bulundu. Bu antikanserojenik etkinliğin oluşmasına β -arbutinin oluşturduğu genotoksisite ve inflamasyon aracılığı ile aktive edilen p53 ve Caspase 3'ün apoptozu uyarmasının ve aynı zamanda β -arbutinin ER- α 'yı baskılamasının aracılık ettiği belirlenmiş oldu.

Sunulan çalışmadan elde edilen sonuçlar kısaca özetlenecek olursa;

- Yüksek dozda (LD_{50} dozunda) arbutinin etkin bir şekilde antikanserojen etkili olabileceğini görülmüştür. Antikanserojen etkinlikte β -arbutinin α -arbutine göre daha iyi olduğu belirlenmiştir.
- LD_{50} dozunda arbutinin antikanserojen etkisinin oluşmasında oksidatif stres ve endoplazmik stresi ile ilgili mekanizmaların etkili olamadığı belirlenmiştir.
- Buna karşın LD_{50} dozunda β -arbutinin antikanserojen etkilerinin oluşmasında p53 ve Caspase 3 aracılı apoptozun etkili olduğu saptanmıştır.
- Ayrıca söz konusu apoptozun uyarılmasında, MCF-7 hücrelerinde LD_{50} dozunda β -arbutinin inflamasyonu ve genotoksisiteyi artırması aracılığı ile aktive olan mekanizmaların rol alabileceği belirlenmiştir.
- β -arbutinin düşük dozlarda (LD_0 dozunda) MCF-7 hücrelerinde Caspase 3'ü baskılaması nedeni ile apoptozisi baskıladığı söylenebilir. Bu kanserle mücadele adına istenen bir durum değildir. Çünkü apoptozis baskılanırsa kanser hücreleri çok daha hızlı üreyebilir. Bu nedenle meme kanserli kişilerin arbutin içerikli ürünleri tüketirken bilinçli olmaları gerekmektedir. Ama bu konuda net konuşabilmek için çalışmaların hem farklı hücre modellerinde hem de deney hayvan modellerinde tekrarlanması gerekmektedir.
- MCF-7 hücrelerinde β -arbutinin LD_{50} dozunda genotoksik ve inflamatuvar etkileriyle uyarılan p53 aracılığıyla apoptotik caspas 3'ün aktivasyonunu artırdığı ve aynı zamanda ER'lerinin aktivitesini azalttığı düşünülürse , β -arbutinin bu etkilerini nasıl oluşturduğunun araştırılması tedavide yeni bir bakış açısı geliştirilmesine katkı

sağlayabilir. Ama bunun için β -arbutinin, ER sinyal yolu ve DNA ile etkileşimlerini de ele alan daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Hem meme kanseri tedavisinde hem de diğer kanser türlerinin tedavisinde yan etkileri nedeniyle toksik olmayan, çok hedefli ve ilaç direnci oluşturmeyen yeni tedavi protokollerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda toksik etkileri kısıtlı olan doğal aktif maddeler iyi bir alternatif olmaya devam etmektedir. Nitekim bu alanda yapılan çalışmalar doğal aktif maddelerin kanser tedavisinde yeni çözümlerin geliştirilmesine imkan sağlayabileceğine işaret etmektedir. Bu bağlamda sunulan çalışmayla meme kanserli hastalarda β -arbutinin olası yararlı/zararlı etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Arbutinin kozmetik ürün olarak krem ve sabunlarda, cilt beyazlatma ajanı olarak ise kliniklerde kullanıldığı düşünülürse, kanser hastası olan bireylerdeki olası yararlarının veya zararlarının belirlenmesi önemlidir. Bu açıdan bakıldığında sunulan çalışma ile özellikle β -arbutinin meme kanserine olası fayda/zararları in-vitro bir modelleme ile belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen bulguların hem klinisyenlere hem de literatüre katkı yapacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adam, B., Kıyıcı, A ve Ardıçoğlu, Y. (2013). Temel ve Klinik Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 362- 64.
- Aggarwal, BB., Vijayalekshmi, RV. and Sung, B. (2009). Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res*, **15(2)**: 425–30.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002). Molecular biology of the cell, 4th ed. Newyork, Çeviri Editörleri: Buyru N, Dalay N, Özgüç M, Öztürk M, Sakızlı M. (2008), Hücrenin Moleküler Biyolojisi, TÜBA Yayınları, Ankara, 1313-1361
- Anand, P., Kunnumakara, AB., Sundaram, C., Harikumar, KB., Tharakan, ST., Lai, OS. (2008). Cancer is a preventabledisease that requires major lifestyle changes, *Pharm. Res.* **25(9)**: 2097-2116.
- Andrejeva, G. and Rathmell, JC. (2017). Similarities and distinctions of cancer and immune metabolism in inflammation and tumors. *Cell Metabol*, **26(1)**: 49–70.
- Barabutis, N., Schally, A. and Siejka, A. (2018). P53, GHRH, Inflammation and cancer. *EBioMedicine*, **37**: 557–562.
- Baykara, O. (2016). Kanser tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, **5(3)**: 154-165.
- Bean, LA., Ianov, L. and Foster, TC. (2014). Estrogen receptors, the hippocampus, and memory. *Neuroscientist*, **20(5)**: 534-45.
- Berdowska, I., Zieliński, B., Fecka, I., Kulbacka, J., Saczko, J. and Gamian, A. (2013). Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells. *Food Chem.*, **141(2)**: 1313-21.
- Boissy, RE., Visscher, M. and DeLong, MA. (2005). DeoxyArbutin: a novel reversible tyrosinase inhibitor with effective in vivo skin lightening potency. *Exp Dermatol*, **14(8)**: 601-8.
- Botelho1, FA., Ferreira, CM., França, LJ., França, LE., Cristina, A. and França , H.(2013). Breastfeeding and its Relationship with Reduction of Breast Cancer. A Review, *Asian Pac J Cancer Prev.* **13(11)**: 5327-5332.

- Bower, J.E. (2012). Inflammation and cancer-related fatigue: mechanisms, contributing factors, and treatment implications. *Brain Behav Immun*, **30(0)**: 48-57.
- Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, **72**: 248-54.
- Bray, FB., Ferlay, J., Soerjomataram, I ., Siegel, RL., Torre, LA. and Jemal, A.(2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *Cancer J. Clin.*, **68(6)**: 394–424.
- Calaf, GM., Ponce-Cusi, R. and Carrión, F. (2018). Curcumin and paclitaxel induce cell death in breast cancer cell lines. *Oncol Rep*, **40(4)**: 2381-2388.
- Carroll, JS. (2016). Mechanisms of oestrogen receptor (ER) gene regulation in breast cancer. *Eur J Endocrinol*, **175(1)**: 41-9.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2002). 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. **360(9328)**: 187-95.
- Couteau, C. and Coiffard, L. (2016). Overview of Skin Whitening Agents: Drugs and Cosmetic Products. *Cosmetics*, **3**: 27.
- Cheng, S.L., Liu, R.H., Sheu, J.N., Chen, S.T., Sinchaikul, S. and Tsay, G.J. (2007). Toxicogenomics of A375 human malignant melanoma cells treated with arbutin. *J. Biomed. Sci.* **14(1)**: 87–105.
- Deisinger, PJ., Hill, TS. and English, JC. (1996). Human exposure to naturally occurring hydroquinone. *J Toxicol Env Health*, **47(1)**: 31-46.
- Dingel, Çg. and Kul, O. (2016). Patojenik Apoptozis ve Tanı Yöntemleri. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **5 (1)**: 86-108.
- Disis, ML. (2010). Immune regulation of cancer. *J Clin Oncol*, **28(29)**: 4531-8.
- DK, Hinch, AE, Oliver. and JH, Crowe. (1999). Lipid Composition Determines the Effects of Arbutin on the Stability of Membranes. *Biophys J.*, **77(4)**: 2024-2034.
- Düzgün, A., Alaçam, H. and Okuyucu, A. (2012). Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı. *Deneyisel ve Klinik Tıp Dergisi*, **29**: 95-100.

- EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group). (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials, **365(9472)**: 1687-717.
- Ersin, G., Çelik, S., Ulasli, SS., Özyürek, A., Hazman, Ö., Günay, S., Özdemir, M. and Ünlü, M. (2016). Comparison of the Anti-inflammatory Effects of Proanthocyanidin, Quercetin, and Damnacanthol on Benzo(a)pyrene Exposed A549 Alveolar Cell Line, *Inflammation*, **(39) 2**: 744-51.
- Fasoulakis, Z., Kolios, G., Papamanolis, V. and Kontomanolis, EN. (2018). Interleukins Associated with Breast Cancer. *Cureus*, **10(11)**: e3549.
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, HH., Haydon, RC., He, TC. and Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis.* **5(2)**: 77-106.
- Fenton, A . and Panay, N. (2015). What influences the age of menopause?, *Climacteric*. **18(6)**:767-8.
- Ferreira, A., Jerônimo, A., Gabrielly,Â., Freitas, Q. and Weller, M. (2017). Risk factors of breast cancer and knowledge about the disease: an integrative revision of Latin American studies, *Cien Saude Colet.*,**22(1)**:135-149.
- Fisher, B., Costantino, JP., Wickerham, DL., Cecchini, RS., Cronin, WM., Robidoux, A., Bevers, TB., Kavanah, MT., Atkins, JN., Margolese, RG et al. (2005).Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *Journal of the National Cancer Institute*, **97(22)**: 1652–1662.
- Garcia-Jimenez, A., Teruel-Puche, JA., Berna, J., Rodriguez-Lopez, JN., Tudela, J. and Garcia-Canovas, F. (2017). Action of tyrosinase on alpha and beta-arbutin. A kinetic study. *PLoS One*. **12(5)**: e0177330
- Gompel, A., Somaï, S., Chaouat, M., Kazem, A., Kloosterboer, HJ., Beusman, I., Forgez, P., Mimoun, M. and Rostène, W. (2000). Hormonal regulation of apoptosis in breast cells and tissues,*Steroids*, **65(10-11)**: 593-8.

- Gyori, B.M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P.S., Hsu, D. and Clement, M.V. (2014). OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*, **2**: 457-465.
- Hazman, Ö., Bozkurt, MF., Fidan, AF., Uysal, FE. ve Çelik, S. (2018). The Effect of Boric Acid and Borax on Oxidative Stress, Inflammation, ER Stress and Apoptosis in Cisplatin Toxication and Nephrotoxicity Developing as a Result of Toxication. *Inflammation*, **41**: 1032-1048.
- Hoesel, B. and Schmid, JA. (2013). The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*, **12**: 86.
- Horita, M., Wang, DH., Tsutsui, K, et al.(2005). Involvement of oxidative stress in hydroquinone-induced cytotoxicity in catalase-deficient Escherichia coli mutants. *Free Radic Res*, **39**: 1035–41.
- Hosford, SK., Wells, JD., Traphagen, NA., Fields, JL., Hampsch, R., Kettenbach, A., Demidenko, E. and Miller, T. (2019). Estrogen therapy induces an unfolded protein response to drive cell death in ER⁺ breast cancer. *Mol. Oncol.* **13(8)**: 1778 – 1794.
- Hu, ZM., Zhou, Q., Lei, TC., Ding, SF. and Xu, SZ. (2009). Effects of hydroquinone and its glucoside derivatives on melanogenesis and antioxidation: Biosafety as skin whitening agents. *J Dermatol Sci*, **55**: 179-84.
- Isnaini, I., Permatasari, N., Mintaroem, K., Prihardina, B. and Widodo, AM. (2018). Oxidants-Antioxidants Profile in the Breast Cancer Cell Line MCF-7. *Asian Pac J Cancer Prev.* **19(11)**: 3175–3178.
- Jasmine, D., Lee, BS., Qiuyin, Cai., PhD, Xiao Ou Shu., MD. and Sarah J. Nechuta, PhD. (2017). The Role of Biomarkers of Oxidative Stress in Breast Cancer Risk and Prognosis: A Systematic Review of the Epidemiologic Literature. *Journal of Women's Health*, **26 (5)**: 467-482.
- Jemal, AR., Siegel, J., Xu, E. and Ward, E. (2010). Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.*, **60 (5)**: 277 – 300.
- Jiang, L., Wang, D., Zhang, Y., Li, J., Wu, Z. and Wang, Z. (2017). Investigation of the pro-apoptotic effects of arbutin and its acetylated derivative on murine melanoma cells. *International Journal of Molecular Medicine Retweeted*, **41(2)**:1048-1054.

- Jimenez, GA., Antonio, J., Puche, T., Berna, J., Lopez, JNR., Tudela, J. and Canovas, GF. (2017). Action of tyrosinase on alpha and beta-arbutin: A kinetic study. *Plos one*, **12(5)**: e0177330.
- Joyce, MK., McInerney, MN., Waters, SP., Sweeney, JK ., Barry, K . and Kerin, JM. (2015). Symptomatic Breast Cancer Diagnosis and Multimodal Management in Women Aged 40 to 50 Years; Consequences of Current Mammographic Screening Programs. *Clinical Breast cancer*, **15(2)**: 125-130.
- Jurica, K., Benković, V., Sikirić, S., Brčić, Karačonji I. and Kopjar, N. (2018). The effects of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) water leaf extract and arbutin upon kidney function and primary DNA damage in renal cells of rats. *Nat Prod Res*. **10(6)**: 1-4.
- Jurica, K., Karačonji, IB., Benković, V. and Kopjar, N. (2017). In vitro assessment of the cytotoxic, DNA damaging, and cytogenetic effects of hydroquinone in human peripheral blood lymphocytes. *Arh Hig Rada Toksikol*, **68(4)**: 322-335.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlıoğlu, M., Başpınar, N. ve Tiftik, MA. (2013). *Biyokimya*, 5.basım, ISBN: 978-605-133-450-9, Nobel Yayınları, Ankara
- Khorsandi, L., Orazizadeh, M., Niazvand, F., Abbaspour, MR., Mansouri, E. and Khodadadi, A. (2017). Quercetin induces apoptosis and necroptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Bratisl Lek Listy*, **118(2)**: 123-128.
- Kiato, S. and Sekine, H. (1994). α -D-glucosyl transfer to phenolic-compounds by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of α -arbutin. *Biosci Biotechnol Biochem*, **58(1)**: 38–42.
- Koyuncuoğlu, F., Tekin, S., Konar, V. and Sandal, S. (2013). İnsan Meme Kanseri Hucre Serileri (MCF-7) Uzerine Apelin-13'un Etkilerinin Araştırılması: In Vitro Bir Çalışma, *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*.**1**: 23-28.
- Kurosu, J., Sato, T., Yoshida, K., Tsugane, T., Shimura, S., Kirimura, K., Kino, K. and Usami, S. (2002). Enzymatic synthesis of α -arbutin by α -anomer- selective-glucosylation of hydroquinone using lyophilized cells of *Xanthomonas campestris* WU-9701. *J Biosci Bioeng*, **93(3)**: 328–330.
- Lauby, B., Dossus, L., Marant, C. and His, M. (2019). Obesity and Cancer. *Bullutin du Cancer*, **106 (7-8)**: 635-646.
- Lee, HJ. and Kim, KW. (2012). Anti-inflammatory effects of arbutin in

- lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *Inflamm Res*, **61(8)**: 817-25.
- Lee, JD., Cai ,Q ., Shu, XO. and Nechuta, SJ. (2017). The Role of Biomarkers of Oxidative Stress in Breast Cancer Risk and Prognosis: A Systematic Review of the Epidemiologic Literature. *Journal of Women's Health*, **26(5)**: 467-482.
- Lee, WS., Yoo ,WH. and Chae, HJ. (2015). ER Stress and Autophagy. *Current Molecular Medicine*, **15(8)**: 735-45.
- Levitt, J. (2007). The safety of hydroquinone: a dermatologist's response to the 2006 Fedral Register. *J Am Acad Dermatol*, **57(5)**: 854–72.
- Libson, S. and Lippman, M. (2014). A review of clinical aspects of breast cancer. *International Review of Psychiatry*, **26(1)**: 4–15.
- Li, W., Song, K., Wang, S., Zhang, C., Zhuang, M., Wang, Y. and Liu, T. (2019). Anti-tumor potential of astragalus polysaccharides on breast cancer cell line mediated by macrophage activation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, **98**: 685-695.
- Li, Y., Meng, X., Gan, RY., Zhang, JJ. and Li, HB. (2017). Dietary Naturel proucts for Prevention and Treatment of Breast Cancer. *Nutrients*, **9(7)**: 728.
- Loman, N ., Bladström, A., Johannsson,O., Borg,Å. and Olsson,H. (2003). Cancer incidence in relatives of a population-based set of cases of early-onset breast cancer with a known BRCA1 and BRCA2 mutation status. *Breast Cancer Res*, **5(6)**: 175-186.
- Lowe, JM., Menendez, D., Bushel, PR., Shatz, M., Kirk, EL., Troester, MA., et al. (2014). p53 and NF- kappaB coregulate proinflammatory gene responses in humanmacrophages. *Cancer Res*, **74(8)**: 2182–92.
- Lv, L., Zhang, J., Tian, F., Li, X., Li, D. and Yu, X. (2019). Arbutin protects HK-2 cells against high glucose- induced apoptosis and autophagy by up-regulating microRNA-27a. *Artif Cells Nanomed Biotechnolm*, **47(1)**: 2940-2947.
- Matthew, H., Ralph, JD., Anna, D., Janice, ED., Christian, F., Michelle, FG., Lee, WJ., Young, KH., Anne, L., Michael, AL., Jason, WL., Valter, DL., Costas, AL., Eoin, M., Mahya, M., Gregory, M., Vinayak, M., Michael, PM., Peter, LP., Brad, P., Lizzia, R., Jeffrey, CR., Sharanya, S., Matthew, GVH., Kathryn, EW. and Target , VT. (2015). Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis. *Semin Cancer Biology*, **35**: 129–150.

- Mathew, S. and Adlercreutz, P. (2013). Regioselective glycosylation of hydro- quinone to α -arbutin by cyclodextrin glucanotransferase from *Thermoanaerobacter* sp. *Biochem Eng J*, **79**: 187–193.
- Miao, F., Shi, Y., Fan, ZF., Jiang, S., Xu, SZ. and Lei, TC. (2016). Deoxyarbutin Possesses a Potent Skin-Lightening Capacity with No Discernible Cytotoxicity against Melanosomes. *PLoS One*, **11(10)**: e0165338.
- Mika, T., Masahiro, K and Yoshimi, N. (2014). Alleviation effect of arbutin on oxidative stress generated through tyrosinase reaction with L-tyrosine and L-Dopa. *BMC Biochemistry*, **15**: 23.
- Motaghed, M., Al-Hassan, FM. and Hamid, SS. (2014). Thymoquinone regulates gene expression levels in the estrogen metabolic and interferon pathways in MCF7 breast cancer cells. *Int J Mol Med*, **33(1)**: 8-16.
- Murata, M. (2018). Inflammation and cancer. *Nature*, **420 (6917)**: 860-7.
- Neagu, M., Constantin, C., Popescu, ID., Zipeto, D., Tzanakakis, G., Nikitovic, D., Fenga, C., Stratakis, CA., Spandidos, DA. and Tsatsakis, AM. (2019). Inflammation and Metabolism in Cancer Cell-Mitochondria Key Player. *Front Oncol*, **9**: 348.
- Nishimura, T., Kometani, T., Takii, H., Terada, Y. and Okada, S. (1994). Acceptor specificity in the glucosylation reaction of *Bacillus-sustilis* X-23 α - amylase towards various phenolic-compounds and the structure of kojic acid glucoside. *Journal Ferment Bioeng*, **78(1)**: 37–41.
- Norbert, N., Hans, JB., Roland, H., Korkmaz, S., Sel, S., Frank, HÜ., Aoife, W., Andreas, S., Stefan, W., Anne, E., Lykkefeldt, Albert, R. and Thomas, K. (2014). Differential Response to α -Oxoaldehydes in Tamoxifen Resistant MCF-7 Breast Cancer Cells. *Plos One*, **9(7)**: e104322.
- Nordlund, JJ., Grimes, PE., Ortonne, JP. (2006). The safety of hydroquinone. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. **20(7)**: 781-7.
- Odutola, MK., Olukomogbon, T., Igbinoba, F., Otu, IT., Ezeome., Hassan, R., Agba, EJ. and Adebamowo SN. (2019). Cancers Attributable to Overweight and Obesity From 2012 to 2014 in Nigeria: A Population-Based Cancer Registry Study. *Front Oncol*, **9**: 460.

- Olumide, YM., Akinkugbe, AO., Altraide, D., Mohammed, T., Ahamefule, N., Ayanlowo, S., Onyekonwu, C. and Essen, N. (2008). Complications of chronic use of skin lightening cosmetics. *Int J Dermatol*, **47(4)**: 344–53.
- Omori, A., Yoshimura, Y., Deyama, Y. and Suzuki, K. (2015). Rosmarinic acid and arbutin suppress osteoclast differentiation by inhibiting superoxide and NFATc1 downregulation in RAW 264. 7 cells. *Biomed Rep*, **3(4)**: 483-490.
- Onat, T., Emerk, K. ve Sözmen, YS. (2006). İnsan Biyokimyası. In:Burçak,G., Hormonlar, 2. Basım, Palme Yayıncılık, Ankara, 551-554.
- Ortiz-Ruiz, CV., Berna, J., Rodriguez-Lopez, JN., Tomas, V. and Garcia-Canovas, F. (2015). Tyrosinase-catalyzed hydroxylation of 4-hexylresorcinol, an antibrowning and depigmenting agent: a kinetic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63(31)**: 7032-40.
- Özcan, H. ve Oskay, Ü. (2013). Menopoz döneminde semptom yönetiminde kanıta dayalı uygulamalar. *Göztepe Tıp Dergisi*, **28(4)**: 157-163,
- Palucka, AK. and Coussens, LM. (2016) .The Basis of oncoimmunology. *Cell*, **164(6)**: 1233–47.
- Peng, C., Arthur, D., Liu, F., Lee, J., Xia, Q ., F., Lavin, MF . and Jack, C. (2013). Genotoxicity of hydroquinone in A549 cells, *Cell Biol Toxicol*. **29(4)**: 213-227.
- Pfaffl, MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res*, **29(9)**: e45.
- Pinder, M.C. and Buzdar, A.U. (2008). Endocrine therapy for breast cancer. In Hunt, K. K.; Robb, G. L.; Strom, E. A.; Ueno, N. T., eds. Breast cancer, (M.D. Anderson Cancer Care Series). New York: Springer. 411–434.
- Rawal, R., Bertelsen, L. and Olsen, HJ. (2006). Cancer incidence in first-degree relatives of a population-based set of cases of early-onset breast cancer. *European Journal Of Cancer*, **42(17)**: 3034–3040.
- Rodrigues, P., Marco, G., Furriol, J., Mansego, LM., Alonso, PM., Neira, GA., Escudero, JCM., Benitez, J., Lluch, A. and Chaves, JF. (2014). Pilar Eroles Oxidative stress in susceptibility to breast cancer: study in Spanish population. *BMC Cancer*, **14**: 861.

- Rosenberg, LU ., Einarsdóttir ,K ., Friman, El ., Wedre ,S ., Dickman ,PW ., Salon, P. and Magnusson, C. (2006). Risk factors for hormone receptor-defined breast cancer in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **15(12)**: 2482-8.
- Rutkowski, D.T. and Kaufman, R.J. (2004). A trip to the ER: Coping with stress. *Trends Cell Biol*, **14(1)**: 20-28.
- Sateesh, R., Rao, AR., Budugu, SR., Mutheeswariah, Y., Narendra, H., Phaneendra, BV. and Lakshmi, AY. (2019). Oxidative stress in relation to obesity in breast cancer. *Indian J Cancer*, **1**: 41-44.
- Schröder, L., Marahrens, P., Koch, JG., Heidegger, H., Vilsmeier, T., Phan-Brehm, T., Hofmann, S., Mahner, S., Jeschke, U. and Richter, DU. (2019). Effects of green tea, matcha tea and their components epigallocatechin gallate and quercetin on MCF-7 and MDA-MB-231 breast carcinoma cells. *Oncol Rep*. **41(1)**: 387-396.
- Schulster, M., Bernie, MA. and Ramasamy, R. (2016). The role of estradiol in male reproductive function. *Asian Journal of Andrology*, **18(3)**: 435–440.
- Seo, ES., Kang, J., Lee, JH., Kin, GE., Kim, GJ. and Kim, D. (2009). Synthesis and characterization of hydroquinone glucoside using *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. *Enzym Microb Technol*, **45(5)**: 355–360.
- Setiawan, VW., Monroe, KR., Wilkens, LR., Kolonel, LN., Pike, MC. and Henderson, BE. (2009). Breast Cancer Risk Factors Defined By Estrogen and Progesterone Status: The Multiethnic Cohort Study. *American Journal of Epidemiology*, **169(10)**: 1251-1259.
- Shah, R., Rosso, K. and Nathanson, SH. (2014). Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol*, **5(3)**: 283-298.
- Sheikholeslami, A., Nabiuni, M. and Arefian, E. (2017). Suppressing the molecular signaling pathways involved in inflammation and cancer in breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 by miR-590. *Tumour Biol*. **39(4)**: 1010428317697570.
- Sheng-Yi, S., Zhao, Z., Zhang-Nv, Y., Fang, X., Hang-Jing, L., Zhi-Yong, Zhu., Wen, Shi., Jianmin, Jiang., Ping-Ping, Yao., and Han-Ping, Zhu . (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*, **13(11)**: 1387–1397.

- Shiau, AK., Barstad, D., Loria, PM., Cheng, L., Kushner, PJ., Agard, DA and Greene GL. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, **95(7)**: 927–937.
- Sisinni, L., Pietrafesa, M., Lepore, S., Maddalena, F., Condelli, V., Esposito, F. and Landriscina, M. (2019). Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Breast Cancer: The Balance between Apoptosis and Autophagy and Its Role in rug Resistance. *Int J Mol Sci*, **20(4)**: pii: E857.
- Suau, R., Cuevas, A., Valpuesta, V. and Reid, M.S. (1991). Arbutin and sucrose in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Phytochemistry*, **30(8)**: 2555–2556.
- Strober, JW. and Brady, MJ. (2019). Dietary Fructose Consumption and Triple-Negative Breast Cancer Incidence. *Front Endocrinol* , **10**: 367. PMC6581676.
- Tatar, M. and Tatar, T. (2019). Endoplazmik Retikulum Stresi ve İlişkili Hastalıklar. *Osmangazi Tıp Dergisi*, **41(3)**: 294-303.
- Tumminia, A., Vinciguerra, F., Parisi ., Graziano, M., Sciacca, L., Baratta, R. and Frittitta ,Lucia. (2019). Adipose Tissue, Obesity and Adiponectin: Role in Endocrine Cancer Risk. *Int J Mol Sci*, **20(12)**: 2863.
- Valko, M., Rhodes, CJ., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. **160(1)**: 1-40.
- Wahyu, Widowati., Harry, Murti., Diana, KJ. and Sutiman, B. (2016). Sumitro, M. Aris Widodo, Nurul Fauziah, Maesaroh Maesaroh and Indra Bachtiar, Selective Cytotoxic Potential of IFN- γ and TNF- α on Breast Cancer Cell Lines (T47D and MCF7). *Asian Journal of Cell Biology*, **11(1)**: 1-12.
- Wang, W., Unlu, J., Yongxia, C., Qinchuan, W., Ushani, J., Xiao, L., Qun, Wei., Ji, W., Hanchu, X., Cong, C., Bin, X., Wenxian, H., Linbo, W., Wenhe, Z and Jichun, Z. (2017). Exosome: emerging biomarker in breast cancer. *Oncotarget*, **8(25)**: 41717-41733.

- Wen, Wang., Zack, Zu., Michael, Costanzo., Charies, Boone., Carol, A.Lange. and Chad L.Myers. (2017). Pathway-based discovery of genetic interactions in breast cancer. *PLoS Genetic*, **13(9)**: e1006973.
- Wesolowski, R. and Ramaswamy, B. (2011). Gene Expression Profiling: Changing Face of Breast Cancer Classification and Management. *Gene Expression*, **15(3)**: 105-115.
- Westerhof, W. And Kooyers, TJ. (2005). Hydroquinone and its analogues in dermatology-a potential health risk. *J Cos Dermatol*, **4(2)**: 55–9.
- White, P. and Kaestner, PW. (2009). Gene Expression Analysis in Diabetes Resarch. *Methods Mol Biol*, **560**: 239-61.
- Wu, Y. and Vadgama, JV. (2016). Androgen Receptor as a Potential Target for Treatment of Breast Cancer. *Int J Cancer Res Mol Mech*, **3(1)**: 2381-3318.
- Xu, WH., Liang, Q., Zhang ,YJ. and Zhao, P. (2015). Naturally occurring arbutin derivatives and their bioactivities. *Chem Biodivers*, **12(1)**: 54-81.
- Yılmaz S. (2014). Borik Asitin Antioksidan Aktivitesinin Hücre Kültüründe Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yu, S., Wang, Y., Tian, Y., Xu, W., Bai, Y., Zhang, T. and Mu, W. (2018). Highly efficient biosynthesis of α -arbutin from hydroquinone by an amylosucrase from *Cellulomonas carboniz*. *Process Biochem*, **68**: 93–99.
- Yunlu, Jia.,Yongxia, Chen., Qinchuan, Wang., Ushani, Jayasinghe., Xiao , Luo., Qun, Wei., Ji, Wang., Hanchu, XiongiCongChen., Bin, Xu., Wenxian, Hu., Linbo, Wang., Wenhe, Zhao and Jichun, Zhou. (2017). Exosome: emerging biomarker in breast cancer. *Oncotarget*, **8(25)**: 41717-41733.
- Zeng, M., Zhang, L., Li, M., Zhang, B., Zhou, N., Ke, Y., Feng, W. and Zheng, X. (2018). Estrogenic Effects of the Extracts from the Chinese Yam (*Dioscorea oppositifolia* Thunb.) and Its Effective Compounds in Vitro and in Vivo. *Molecules*, **23(2)**: pii: E11.
- Zhao, W., Wang, S., Qin, T. and Wang, W. (2019). Arbutin attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative injury through regulation of microRNA-29a in retinal ganglion cells. *Biomed Pharmacother*, **112**: 108729.

- Zhong, G., Qin, S., Townsend, D., Schulte, BA., Tew, KD. and Wang, GY. (2019). Oxidative stress induces senescence in breast cancer stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **514(4)**: 1204-1209.
- Zhou, X., Zheng, YT., Wei, XM., Yang, KD., Yang, XK., Wang, YT., Xu, LM., Du, LQ. and Huang, RB. (2011). Sucrose isomerase and its mutants from *Erwinia rhapontici* can synthesise α -arbutin. *Protein Pept Lett*, **18(10)**: 1028–1034.
- Zhu, X., Tian, Y., Zhang, W., Zhang, T., Guang, C. and Mu, W. (2018). Recent progress on biological production of α -arbutin. *Appl Microbiol Biotechnol*, **102(19)**: 8145-8152.

İnternet Kaynakları

- İnt. Kyn. 1. Basın Odası Haberleri, Türkiye İstatistik Kurumu, Sayı: 24/2017, (http://www.tuik.gov.tr/basinOdasi/haberler/2017_24_20170504.pdf), 03.07.2019, **15:24**.
- İnt. Kyn. 2. Türkiye Kanser istatistikleri, TC Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Kurumu, Ankara.(2016).([http://www.onkoloji.gov.tr/attachments/article/8653/Ana%20Rapor%202016%20\(v01.2\).pdf](http://www.onkoloji.gov.tr/attachments/article/8653/Ana%20Rapor%202016%20(v01.2).pdf)), 03.07.2019, **15: 29**.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşe Nur SARIOVA
Doğum Yeri ve Tarihi : Sandıklı 23.02.1988
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : 05058361995

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Özel Afyon Zafer Lisesi
Lisans : Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü(2009-2013)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :

Özel Afyonkarahisar ÜSTEK Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi (2015-2017).

Afyon Sınav Temel Lisesi (2017-2018)

Özel Afyon AOSB Rahmiye Sare Palalı Tekn. Koleji (2018-.....)