

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TGF- β , HESPERİDİN VE KUERSETİNİN MCF-7 HÜCRESİNİN
uPA AKTİVİTESİ ÜZERİNE VE PAI-1 EKSPRESYONUNA
ETKİSİ**

Hatice Müge SAMANCI DURSUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

KONYA-2015

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TGF- β , HESPERİDİN VE KUERSETİNİN MCF-7 HÜCRESİNİN
uPA AKTİVİTESİ ÜZERİNE VE PAI-1 EKSPRESYONUNA
ETKİSİ**

Hatice Müge SAMANCI DURSUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 13202013 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2015

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Hatice Müge SAMANCI DURSUN tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ali ÜNLÜ
Selçuk Üniversitesi

İmza

Danışman: Prof. Dr. Ali ÜNLÜ
Selçuk Üniversitesi

İmza

Üye: Yrd. Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU
Selçuk Üniversitesi

İmza

Üye: Yrd. Doç. Dr. Hatice TÜRKDAĞI
Selçuk Üniversitesi

İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ali Ünlü yönetiminde hazırlanmış olup, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur.

Yüksek lisans eğitimim sırasında beni her zaman yüreklendiren, destek olan, kendimi geliştirmemde bana yol gösteren, öğrencisi olmaktan onur duyduğum değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ali Ünlü' ye,

Benden ilgilerini esirgemeyen, bana güvendiğini her an hissettiren insani ve ahlaki değerleri ile de örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hüsamettin Vatansev'e

Değerli bilgi ve deneyimleri ile eğitim sürecimde eşsiz katkıları bulunan, manevi desteğini her zaman hissettiğim değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Bahadır Öztürk' e

Tanıdığım ilk günden beri tüm özverisi, iyi niyeti ile bireysel ve bilimsel desteğini daima hissettiğim, engin bilgi ve tecrübeleriyle meslek hayatımı şekillendiren değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Sedat Abuşoğlu'na

Eğitimim esnasında bana destek ve emek veren Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyesi hocalarıma, araştırma görevlilerine, tüm mesai arkadaşlarıma özellikle laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Emine Nedime Korucu'ya, Yük. Kimyager Gülsüm Tekin'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak beni her zaman koşulsuz seven, sınırsızca destekleyen, hayattaki en büyük moral kaynağım olan çok değerli canım annem Ayla Samancı ve babam İsmail Hakkı Samancı başta olmak üzere tüm aileme, her zaman yanımda olan beni her daim motive eden ve özellikle tez yazım aşamamda yardımlarını esirgemeyen çok kıymetli eşim Yük. Biyolog Ömer Dursun'a yürekten teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER ve KISALTMALAR	v
-------------------------------	---

1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	3
1.1.2. Kanserin Karakteristik Özellikleri	4
1.2. Hücre Siklusu ve Siklusa Etkili Faktörler	5
1.3. Hücre Büyümesini Uyarın Moleküller	7
1.4. Protoonkogenler ve Onkogenler	8
1.5. Tümör Baskılayıcı Genler	8
1.6. DNA Onarım ve Apoptosis Genleri	9
1.7. Meme Kanseri	9
1.7.1. Meme Kanseri Etkili Onkogenler	10
1.7.3. Meme Kanseri Etkili Diğer Genler	15
1.7.4. Ailesel Meme Kanseri ve Yatkınlık Genleri	16
1.7.5. Meme Kanseri Risk Faktörleri	17
1.7.6. Meme Kanseri Tedavisi	17
1.8. Sitokinler	18
1.8.1. Transforming Growth Factor- β	19
1.9. Plazminojen Sistem:	24
1.9.1. Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 (PAI-1):	26
1.9.2. Doku tipi Plazminojen Aktivatörü (tPA):	28
1.9.3. Ürokinaz tipi Plazminojen Aktivatörü (uPA):	28
1.9.4. Solid Tümörlerde Plazminojen Aktivatörlerin Durumu:	29
1.10. Flavonoidler	30
1.10.1. Flavonoidlerin Biyosentezi	32
1.10.2. Flavonoidlerin Biyolojik Önemi	32
1.10.3. Diyetel Flavonoidler ve Kanseri	33
1.10.4. Hesperetin	34
1.10.5. Kuersetin	36
2. GEREÇ ve YÖNTEM	39
2.1. Gereçler	39
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	39
2.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar gereçleri	40

2.2. Metod	41
2.2.1. Hücre Kültürü	41
2.2.2. Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemi	42
2.2.3. Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Hücre Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi	44
2.2.4. TGF- β 'nın MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi.....	44
2.2.5. Hesperetinin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi.....	45
2.2.6. Kuersetinin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi.....	45
2.2.7. Hücrelerin Protein Analizi	45
2.2.8. MCF-7 Hücre Hattında uPA Aktivitesinin Ölçülmesi	47
2.2.9. MCF-7 Hücre Hattında PAI-1 Düzeyinin Ölçülmesi.....	49
2.3. İstatistik Analizleri.....	51
3. BULGULAR	52
3.1. Çalışılacak Hücre Sayısının Optimizasyonu	52
3.2. TGF- β 'nın MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi	52
3.3. Hesperetinin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi	53
3.5. Hücrelerin IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	58
3.6. TGF- β , Hesperetin, Kuersetin Uygulanan ve Kontrol Grubundaki Hücrelerin uPA Aktivitesi Ölçümü Sonuçları.....	60
3.7. TGF- β , Hesperetin, Kuersetin Uygulanan ve Kontrol Grubundaki Hücrelerin PAI-1 Düzeyi Ölçümü Sonuçları.....	63
4. TARTIŞMA	67
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	74
6. KAYNAKLAR	75
7. EKLER.....	89
EK A: Etik Kurulu Kararı	89
8. ÖZGEÇMİŞ.....	90

SİMGELER ve KISALTMALAR

aFGF	Asidik Fibroblast Büyüme Faktörü
AMH	Antimullerian Hormon
Bax	Proapoptotik gen
Bcl-2	Antiapoptotik gen
bFGF	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
BMP	Kemik Morfogenetik Proteinleri
BRCA1	Meme kanserine yatkınlık geni
BRCA2	Meme kanserine yatkınlık geni
BSA	Bovin Serum Albumin
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CerbB-2 (Her2/neu)	Büyüme faktörü reseptörü
c-myc	Onkogen
c-ras	Onkogen
c-abl	Onkogen
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır sülfat penta hidrat
DM	Diyabetes Mellitus
DMEM	Dulbecco'nun modifiye Eagle vasatı
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ECM	Ekstraselüler matriks
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMT	Epitelyal Mezenkimal Geçiş
EPO	Eritropoietin
ER	Östrojen Reseptörü
FBS	Fetal Bovin Serum
GM CSF	Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör
GTP	Guanozin 3 fosfat
HER	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü
IC ₅₀	Inhibition concentration fifty
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IGF-2	İnsülin benzeri büyüme faktörü-2

IFN	İnterferon
IL-1	İnterlökin-1
Ile	Izoleusin
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat
KOH	Potasyum hidroksit
LIF	Lösemi İnhibitör Faktör
Lys	Lizin
MCF-7	Meme kanseri hücre serisi
MEK-ERK	Sinyal iletim yolu
MMP	Matriks metalloproteinaz
MPF	Maturation Promoting Factor
µM	Mikromolar
NaOH	Sodyum hidroksit
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
NCI	Uluslararası Kanser Enstitüsü
NGF	Nöral Büyüme Faktörü
p15	Tümör baskılayıcı gen
p21	Tümör baskılayıcı gen
p53	Tümör baskılayıcı gen
PA	Plazminojen Aktivatörleri
PAI-1	Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
PDGF	Platelet Orjinli Büyüme Faktörü
PR	Progesteron Reseptörü
PSG	Penisillin streptomycin glutamin
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ribo Nükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TAM	Tümör İlişkili Makrofajlar
TβR	Transforme Edici Büyüme Faktörü Reseptörü
TGF-α	Transforme Edici Büyüme Faktörü-alfa
TGF-β	Transforme Edici Büyüme Faktörü-beta
TNF	Tümör nekroz faktörü

tPA	Doku Tipi Plazminojen Aktivatörü
uPA	Ürokinaz Tipi Plazminojen Aktivatörü
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TGF- β , Hesperitin ve Kuersetinin MCF-7 Hücresinin uPA Aktivitesi Üzerine ve PAI-1 Ekspresyonuna Etkisi

Hatice Müge Samancı Dursun
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2015

Sitokin ailesinin başlıca üyesi olan transforme edici büyüme faktörlerinden TGF- β ; hücrenin proliferasyonu, diferansiasyonu, motilitesi, adhezyonu ve ölümü gibi hücresel süreçleri düzenleme yeteneğine sahiptir. Epidemiyolojik ve deneysel in vivo ve vitro çalışmalarda kanser üzerine etkinliği gösterilmiştir.

Bitki kaynaklı flavonoidler, özellikle antiproliferatif ve antioksidan özellikleri taşıması yönüyle son zamanlarda araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Hücre kültürü ve deney hayvan çalışmalarıyla, karsinogenezde flavonoidlerin kanser önleyici etkilerinin olduğu ortaya konmuştur. Fakat antikanserojenik olarak değerlendirilen flavonoidlerin halen moleküler etki mekanizmaları anlaşılamamıştır.

Çalışmamızda TGF- β ve flavonoid türünde olan, kuersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksi flavon) ve hesperetin (3',5,7-trihidroksi-4'-metoksiflavon)'in, MCF-7 meme kanseri hücre serisinde, farklı konsantrasyon ve sürelerde hücre proliferasyonu üzerine etkisini, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle (xCELLigence,) ortaya koymayı amaçladık. Ayrıca proteazlardan biri olan uPA ve inhibitörü olan PAI-1 üzerine ne gibi etki ettiğini ortaya koyarak birbirleriyle bağlantılarını açıklamaya çalıştık.

Bu amaçla hücre kültürü laboratuvarında TGF- β , hesperetin ve kuersetinin farklı konsantrasyonları ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin doz ve zaman bağımlı olarak proliferasyonunun inhibisyonu gözlemlendi. Hücrelerin proliferasyonundaki değişiklikler, gerçek zamanlı hücre algılama sistemi kullanılarak değerlendirildi. Hücre sayısındaki değişiklikler, mikro elektrot içeren özel hücre kültürü kuyucuklarında, deney süresince 15'er dakika boyunca bir sürekli olarak izlendi. Bu sistemde belirlenen IC₅₀ dozuyla hazırlanmış olan hücre lizatlarından alınan örneklerde, uPA aktivitesi ve PAI-1 düzeyi analizleri gerçekleştirildi.

Sonuç olarak, TGF- β , hesperetin ve kuersetinin meme kanseri hücresi proliferasyonunu doz ve zamana bağımlı olarak inhibe ettiği ve bunu uPA aktivitesini ve PAI-1 düzeyini etkileyerek gösterdiği gözlenmiştir. Bu değerlendirmeye birlikte, TGF- β , hesperetin ve kuersetinin hücre proliferasyonuna etki mekanizmasıyla ilgili daha ileri çalışmalar bu konuda aydınlatıcı olacaktır.

Anahtar Sözcükler: hesperetin; kuersetin; MCF-7; TGF- β ; uPA aktivitesi.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The Effect of TGF- β , Hesperetin and Quercetin on uPA Activity and PAI-1 Expression of MCF-7 Cell Line.

Hatice Müge Samancı Dursun
Department of Medical Biochemistry

MASTER / KONYA-2015

TGF- β , which is one of the transformer growth factors and the main member of Cytokine family, is able to arrange cellular processes like cell proliferation, differentiation, motility, and adhesion and cell death. Its efficiency on cancer in epidemiological and experimental in vivo and vitro studies is shown.

Phyto-flavonoids have recently drawn the attention of researchers for anti-proliferative and antioxidant features. With cell culture and experimental animal studies, it was revealed that flavonoids had anti-carcinogenic effects in carcinogenesis. However, molecular effect mechanisms of flavonoids that are considered as anti-carcinogenic still can't be understood.

In our study, it is aimed to prove the effect of quercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksi flavon) and hesperetin (3',5,7-trihidroksi-4'-metoksiflavon), which are in type of TGF- β and flavonoid, on cell proliferation in different concentration and durations through real-time cell electronic sensing system (xCELLigence,). Besides, the study reveals how it has an effect on uPA, one of the proteases and its inhibitor, PAI-1 and their links with each other.

To this end, inhibition of MCF-7 cells' proliferation in a dose and time dependent manner is observed in cell culture laboratory. These MCF-7 cells have been treated with different concentrations of TGF- β , hesperetin and quercetin. Changes in cells' proliferation have been evaluated by using real-time cell sensing system. Changes in cell number have been monitored in every 15 minutes during the experiment in special cell culture boxes containing microelectrode. In the patterns of cell lysates prepared with IC₅₀dose determined in this system uPA action and PAI-1 level analyses have been conducted.

Consequently, it is observed that TGF- β , hesperetin and quercetin inhibits proliferation of breast cancer cell in a dose and time dependent manner and also that it indicates this by effecting uPA action and PAI-1 level. With this fact, further studies on TGF- β , hesperetin and quercetine's mechanism of action on cell proliferation will be informative.

Key Words: hesperetin; MCF-7; quercetin; TGF- β ; uPA.

1. GİRİŞ

Meme kanseri tüm dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümördür ve kanser ölümlerinin başta gelen nedenidir (Jemal ve ark2011, Youlden ve ark2012). Ülkemizde akciğer kanserinden sonra 2. sırada görülen kanserdir. Meme kanseri; meme dokusundaki hücrelerin farklılaşması ve kontrolsüz büyümesi sonucu lokal gelişen tümör oluşumu ve/veya tümörün diğer dokulara metastaz yapması durumudur. Meme kanseri; yaş, sigara kullanımı, fertil-çağ süresi, sosyo-ekonomik çevrenin etkileri gibi pek çok çevresel ve genetik faktörünün etkisi altında gelişim gösteren bir kanser tipidir (Baum2002).GLOBOCAN verilerine göre 2012 yılında Dünya’da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakasının geliştiği ve en çok tanı konulan kanserlerin sırasıyla akciğer kanseri (%13,0) ve meme kanseri (%11,9) olduğu belirtilmiştir (Globocan 2012).

Kanser oluşumu, "transforming growth factor beta" (TGF- β) gibi birçok büyüme faktörlerinin de rol aldığı çeşitli patogenetik mekanizmalar ile açıklanmıştır. TGF- β "nodal", "activin", BMP ("bone morphogenic protein") ve AMH ("antimullerian hormone")’ı de kapsayan, doku homeostazının sürdürülmesi ve embriyonik gelişimin kontrolünde önemli rolleri olan geniş bir sitokin ailesinin başlıca üyesidir.TGF- β hücre bölünmesi (proliferasyon), farklılaşması(diferansiasyon), adhezyon, morfogenez,ekstraselüler matriks oluşumu ve programlı hücre ölümü gibi çeşitli hücresel süreçlerinkontrolünü sağlamaktadır. Bu büyüme faktörünün sinyalizasyon yolu birçok farklı yollar ile etkileşerek hücrenin homeostazını sağlamaktadır (Siegel ve Massague 2003,Feng ve Derynck 2005,Ten ve Hill 2004).

Son yıllarda TGF- β ’nın kanser gelişimindeki rolünün araştırılması büyük bir önem kazanmıştır. TGF- β hem tümör supresör, hem de onkogen gibi davranabilmektedir. TGF- β epitelyal hücrelerin bölünmesini baskılayarak tümör supresif etkisini göstermektedir. Tümör hücreleri bu büyüme faktörünün antitümöral etkisini yok etmektedir. Tümöral dokularda TGF- β onkogenik özellikler göstererek, kontrolsüz proliferasyon, metaplazi, displazi ve aplazi gelişmesi,invazyon ve metastaz gibi olayların gerçekleşmesine aracılık etmektedir (Derynck2001, Wakefield ve Romerts 2002)

Plazminojen aktivatörleri (PA'lar) ve plazminin fonksiyonları arasında fibrinoliz, doku yapılanması, hücre migrasyonu ve doku yıkımı sayılabilir. Plazmin aktivasyonu pıhtı yıkımında, inflamasyonda, tümör yayılımında, yara iyileşmesinde, angiogenez ve trofoblast invazyonunda rol alır. Tümör hücreleri invazyon için proteolitik aktiviteye ihtiyaç duyar; plazmin ile beraber diğer doku yıkım enzimleri de tümör hücre metastazında rol alır. Plazminojen ve plazminojen aktivatörleri hücre yüzeyine bağlanır ve plazminojen plazmine dönüşür. Tümör dokusunda ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (uPA) ve/veya bunun inhibitörü plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1)'in yüksek düzeylerinin kötü prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur. Plazminojen aktivasyonu, plazminojen aktivatör inhibitörleri ileregüle edilmektedir. PAI-1, serpin sınıfından bir proteazdır. uPA ve doku tipi plazminojen aktivatörünün (tPA) asıl regülatörü PAI-1'dir (Scherrer ve ark.1999).

Flavonoidler gıdalarda en yaygın bulunan polifenollerdir. Yaklaşık 6500 farklı flavonoid bilinmektedir (Saldamlı 2007). Genel olarak 6 sınıfa ayrılırlar; flavonlar, flavonoller, flavononlar, catechinler, antosiyanidinler, izoflavonlar(Ross ve Kasum 2002).

Flavonoidlerle in vivo ve iv vitro olarak yapılan çalışmalar kansere karşı koruyucu birçok mekanizmada rol oynadığını göstermiştir.

Bunlar; östrojenik/antiöstrojenik aktivite, antiproliferasyon, hücre siklusunun durdurulmasının ve apoptozisin indüksiyonu, oksidasyonun engellenmesi, deoksifikasyon enzimlerinin indüksiyonu, immün sistemin düzenlenmesi ve hücre içi sinyal iletimindeki değişikliklerdir (Diane ve ark. 2001).

Antioksidan, anti-inflamatuar, anti-allerjik, hipolipidemik, damar koruyucu ve anti-karsinojenik etkiye sahip olan Hesperetin, portakal ve limonda en çok bulunan flavonoid grubu bileşiklerinden olan bir flavanondur (Erlund ve ark. 2001). Yapılan çalışmalarda Hesperetinin insan meme ve andorojen bağımlı prostat kanser hücrelerinde proliferasyonu baskıladığı saptanmıştır (Lee ve ark.2010).

Kuersetin flavonoidlerin en önemli bileşiği ve flavanoller grubundandır. Soğan, salatalık, brokoli, domates, çay, kırmızı şarap, yemişler, zeytinyağı ve elma kabuğunda bol miktarda bulunur (Lu ve ark.2005).

Kuersetin'in biyolojik etkilerinin; anti-kanser, anti-viral, anti-

trombotik, antiiskemik, anti-inflamatuar, anti-alerjik olduğu, arterosklerozisi ve koroner kalp hastalıklarını önleyici bir etkisinin olduğu, sellüler immüneyi stimüle ettiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Gryglewski ve ark.1987, Deschner ve ark. 1991, Hertog ve ark. 1993, Formica ve Regelson 1995).

Meme kanseri tüm dünyada kadınlarda en yaygın görülen kanser tipidir. Hastalığın erken tanısı tedavi şansını arttırsa da metastatik formunda oldukça yüksek mortalite ve morbidite ile seyretmektedir. Hastalığın primer tümör boyutundan çıkıp invasiv forma dönüşmesi mortalite ve morbidite açısından önemlidir. Literatürde TGF- β erken evrelerde, tümör hücre proliferasyonu inhibe ederek bir tümör baskılayıcı rolündeyken geç aşamalarında ise, tümör hücre invazyonu ve metastazını uyararak tümörü agreve ettiği belirtilmektedir. Literatürler PAI-1 düzeyinin invazyon açısından önemli bir markır olduğu ve primer doku PAI-1 düzeyinin kötü prognostik faktör olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmanın amacı; TGF- β , Hesperetin ve kuersetinin antitümoral etkinliklerinin invaziv parametrelerden olan uPA ve PAI-1 üzerine etkisini hücre düzeyinde araştırmaktır. Literatürde TGF- β 1 ile çalışılmış yayınlar bulunmaktadır. Bu yüzden bizde çalışmamızı TGF- β 2 ile çalışmayı planladık.

1.1. Kanser

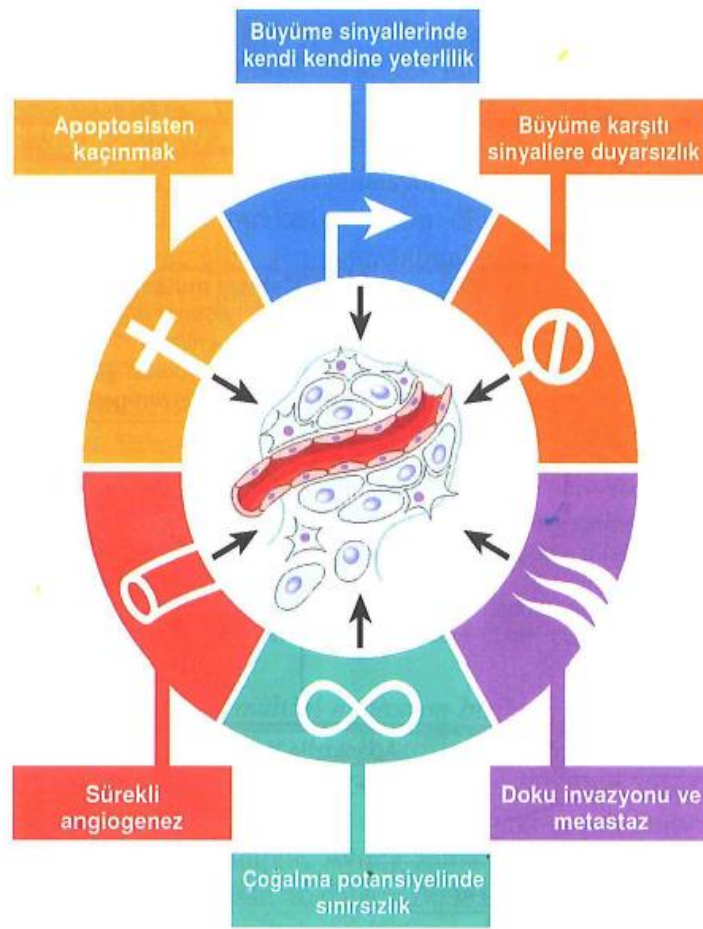
Kanser büyüme özellikleri bozulmuş hücrelerin klonal yayılımıdır. Somatik ve genetik hastalıkların en sık, en yaygın ve aynı zamanda en komplike olanıdır (Futreal ve ark 2001).

Tüm kanserler, DNA dizisindeki birtakım anormalliklerle oluşmaktadır. Kanserlerin %10-15'inin, kalıtsal olduğu %85-90'lık kısmının ise yaşam boyunca canlı hücrelerdeki DNA'nın, mutajenlere maruz kalması, hücre DNA'sındaki hafif progressif değişiklikler ve replikasyonda hatalar oluşması ile şekillendiği düşünülmektedir. Bazen oluşan bu mutasyonlardan biri, içinde bulunduğu hücrenin büyümesini ve bu hücreden türeyen bir kanser klonunun oluşmasını sağlar.Kanser multifaktöryel olup, bakterilerden virüslere, radyasyondan kalıtıma, çevresel faktörlerden beslenme alışkanlığına ve kimyasallara kadar birçok faktör kanser oluşumuna neden olmaktadır (Williams 1992, 2001).

Kansere sebep olan etmen her ne olursa olsun, sonuçta hücrenin genetik malzemesinde bozulma meydana gelir. Tek bir gendeki mutasyondan çok, birkaç gende birden oluşan hasar (hücre sayısının artması yönünde çalışan genler onkogenler, tümör önleyici genler ve DNA onarım genleri) kanser oluşumunda rol oynamaktadır. Kanserde değişikliğe uğramış genler, normalde doku homeostazisi ve hücre büyümesini düzenleyen üç ana biyolojik yolu (hücre siklusu, apoptoz ve diferansiasyon) etkiler (Corn ve El-Deiry 2002).

1.1.2. Kanserın Karakteristik Özellikleri

Tek bir genin mutasyonu kanser oluşumu için yeterli değildir. Karsinogenez, çok sayıda gende mutasyon birikimi sonucu kansere özgü fenotipik ve genetik değişikliklerin oluşumuyla çok basamaklı olarak gerçekleşir. Her kanserde kısmi veya tam olarak birçok malign fenotipik değişiklikler gözlenmektedir(Kumar ve ark. 2007).

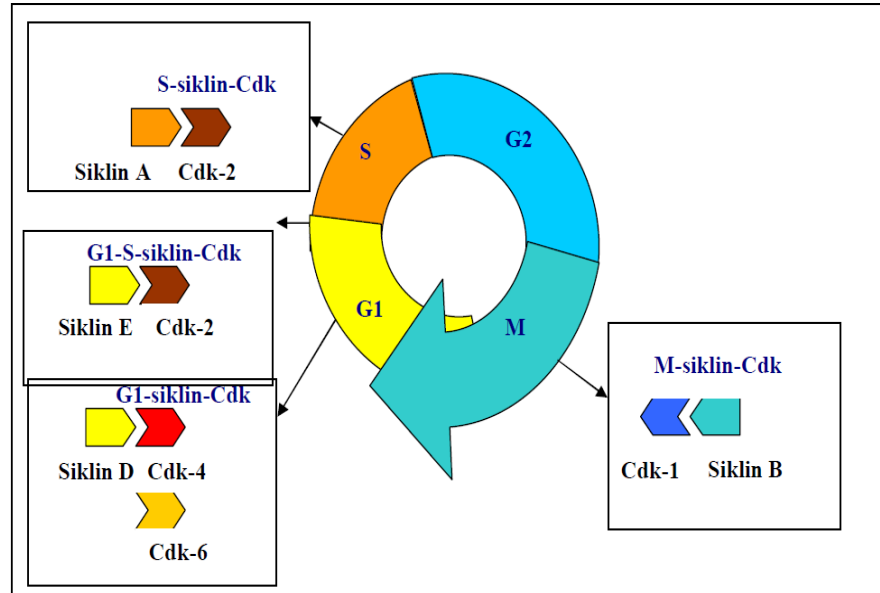


Şekil 1.1. Kanserın Karakteristik Özellikleri (Kumar ve ark 2007).

1.2.Hücre Siklusu ve Siklusa Etkili Faktörler

Hücre siklusunun kontrol noktalarında ve düzenlenmesinde oluşan anormallikler kanser gelişimine yol açar. Mutasyona uğramış hücre siklusu bileşenlerinin bazıları onkogen ve tümör baskılayıcı gen (antionkogenler, hemerogenler, şatogenler) olarak da bilinir (Pucci ve Giordan 1999).

Hücre siklusu, hücre büyümesi ve hücre çoğalması için programlanmıştır (Ho ve Dowdy 2002). Organizmanın yürüttüğü bir program olan ve hücreler arasında farklılık gösteren hücre döngüsünün süresi, bir dakika ile bir sene arasında değişmektedir.Hücre siklusu dört evrede gerçekleşmektedir. (Şekil 1.2)



Şekil 1.2. Hücre döngüsünde görev alan siklinler ve döngüdeki yerleri (Çoğulu ve ark 2007).

1. S evresi (Sentez): DNA replikasyonu, kromozom çiftlenmesi, RNA ve protein sentezi gerçekleşir.
2. G-2 evresi (G=Gap): DNA replikasyonu olmaz, RNA ve protein sentezi devam eder.
3. M evresi (Mitoz): Mitoz ve sitokinez gerçekleşir.
4. G-1 evresi: İlk bölünmede oluşan eşhücrelerin tekrar hücre bölünmesine girmeden S evresine hazırlandığı evredir. DNA replikasyonu olmaz. RNA ve protein sentezi devam eder.

Mitozdan G-1 evresine geçen hücreler bölünmeye devam etmekte yada bölünmeleri durmaktadır. G-1 ve S evresi arasındaki G-0 evresi ise, son farklılaşmasını tamamlamış hücrelerin dinlenme evresidir. Bölünmesi duran ve tüm biyokimyasal olayların aktif olarak sürdüğü hücrelerin geçtiği, G-0 evresindeki hücre tekrar bölüneceği zaman döngüye G-1 evresinden katılmaktadır. Büyüme faktörleri, sitokinler ve tümör virüsleri gibi mitojenik iletiler, hücrenin S evresine geçiş hazırlıkları yaptığı G-1 evresine girmesini sağlar. Hücre döngüsünün kontrol altında tutulduğu noktalar G-1, G-2 evrelerinde ve M evresinin son aşamalarında bulununmaktadır (Weinberg 1995, Ho ve Dowdy 2002).

Hücre döngüsünün her aşaması siklinler olarak bilinen bir dizi protein ailesi tarafından düzenlenmekte ve bir grup siklinin görevini tamamlamasından sonra, diğer grup aktif hale gelmektedir (Heuvel ve Harlow 1993, Sriver ve ark 2001, Ho ve Dowdy 2002). Hücre kopyalanması kesin bir hücrel mekanizma ile yönlendirilmektedir. Bu mekanizmanın motoru, hücrenin metabolik aktivitelerini ve hücre bölünmesini düzenleyen, hücre döngüsü evrelerini kontrol eden siklin-bağımlı kinazlardan (CDKs) oluşmaktadır (Kopnin 2000, Sriver ve ark 2001). Hücre döngüsünün özel fazlarında sentezlenen değişik siklinler, bağlandıkları bu inaktif CDK moleküllerini aktive etmektedirler (Ho ve Dowdy 2002, Weinberg 1995 Heuvel ve Harlow 1993).

Hücre bölünme evresi öncesinde, DNA hasarının engellendiği ve/veya tamir edildiği aşamalar yer almaktadır. Bu döngünün evreleri, büyüme faktörleri, sitokinler, onkogenler, siklinler, CDK gibi proteinler ve MPF (Maturation Promoting Factor) ile birlikte düzenlenmekte, evrelerin herhangi birinde aksaklık (DNA hasarı) olduğunda, tümör baskılayıcı genler döngüyü hemen durdurmaktadır. Sentezlenen DNA hasarlı veya replike edilmemişse döngü M evresine girmeden G-2 evresinde durdurulmaktadır. G-1 evresinde, saptanan DNA hasarı orta derecede ise tümör baskılayıcı gen (p53) tarafından p21 proteininin sentezlenmesi sağlanmaktadır. Siklin CDK kompleksi inhibe edilerek döngü G-1 veya G-2 evresinde durdurulmakta veya askıya alınmaktadır. Eğer DNA hasarı çok büyük ise, p53 hücrenin apoptoza girmesine sebep olmaktadır (Pediconi ve ark 2003, Kopnin 2000).

1.3. Hücre Büyümesini Uyarın Moleküller

Hücre bölünmesini kontrol eden mekanizmalardaki bir bozukluk, kontrolsüz hücre bölünmesine ve aşırı hücre çoğalmasına neden olur. Hücre bölünme ve büyümesinden sorumlu biyokimyasal mekanizmalar, hücre çekirdeğindedir ve ekstrasellüler düzenleyici moleküllerle (mitojenler) yönlendirilir. Hücre büyümesini uyarın moleküller, büyüme faktörleri ve sitokinlerdir. Büyüme faktörleri, hücre büyüme ve proliferasyonu olaylarının başlamasında temel rolü oynayan; hücre bölünmesini uyarın veya inhibe eden veya özelleşmiş hücreye farklılaşmasını başlatan peptidlerdir. DNA sentezi için, büyüme faktörü-reseptör etkileşimi yoluyla sinyal iletiminde yer alan faktörler, “mitogenesisin büyüme faktörü proto-onkogen yolu” olarak isimlendirilen kaskat sistemini oluşturur. (Onat ve ark 2002, Cotran ve ark 1998).

Büyüme faktörlerini ve reseptörlerini kodlayan genlerin mutasyonu, büyüme faktörlerini onkogenik hale getirmektedir. Büyüme faktörleriyle ilişkili protein kinaz reseptörlerinin bağlandığı ileti yolundaki proteinlere bağlanan bazı onkoproteinler, büyüme faktörlerinin etkilerini engellemekte veya değiştirmektedir. Aktif büyüme faktörü reseptöründen uyarını alan ve çekirdeğe ulaştıran bu onkoproteinlerin önemli üyeleri arasında c-ras ve c-abl bulunmaktadır. Ras gibi onkogen türleri, büyüme faktör genlerinin aşırı üretimine yol açmakta ve hücreyi transforme edici büyüme faktörü- α (TGF- α) gibi büyüme faktörlerinin aşırı salınımına yönlendirmektedir. Değişmiş büyüme sinyalinin sonucu sıklıkla kanserdir. (Onat ve ark 2002, Cotran ve ark 1998).

Sitokinler hücre döngüsü ve büyümesindeki kontrol mekanizmasında etkili olmakta veya bu fonksiyonları üstlenen diğer moleküllerin üretimini uyarmaktadır. Mitoz, hücre göçleri, hücre yaşamı ve hücre ölümü olaylarında düzenleyicidirler. Hücre çoğalma hızını etkileyen sitokinler hücrenin farklılaşma durumunu ve/veya farklılaşmış fonksiyonlarından bazılarının da ekspresyonunu değiştirmektedirler. Büyüme hormonları ile aynı mekanizma veya farklı mekanizmalarla etkili olup, büyüme faktörlerinin izledikleri hücresel yollarda etki gösterebilmektedirler (Onat ve ark 2002, Abbas ve Lichtman 2003).

1.4. Protoonkogenler ve Onkogenler

Protoonkogenler, hücrelerin sinyal ileti mekanizmasında (büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz için alınan iletiler) işlev gören birçok proteinin sentezinden sorumlu genlerdir. Normal hücre büyümesinin düzenlenmesinde işlev gören proteinler (büyüme faktörleri, büyüme faktörlerinin reseptörleri, ileti çeviricileri ve transkripsiyon faktörleri), protoonkogenler ve onkogenler tarafından sentezletilmektedir. Hücre ileti yollarındaki proteinleri kodlayan protoonkogenlerin (sis, hst-1, int-2, erb-B1, erb B2, fms, ret, ras, abl, myc, N-myc, cyclin D, CDK4 vb.) mutasyona uğramaları sonucunda, büyüme faktörlerinin çok fazla üretimi, hücre membranı ve çekirdek arasındaki ara yolların kontrolsüz uyarılması, transkripsiyon faktörlerinin sentezinin artması, hücre bölünmesine engel olunamaması gibi sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Büyümenin düzenlemesini kontrol eden proteinler olan protoonkogenlerin, onkogen haline dönüşümü hücre büyümesinin kontrol mekanizmasını bozmakta, kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmalarına ve büyümelerine yol açmaktadır. Büyüme ve diferansiasyonun biyokimyasal yollarında yeralan enzimlerin aktivitesini ve ekspresyonunu bozan mutasyonlar onkogenезin aktivasyonu ile sonuçlanabilir (Cotran ve ark 1998, Scriver ve ark 2001, Onat ve ark 2002).

Normal koşullarda transformasyon oluşturmayan protoonkogenler; delesyonlar, eklentiler, gen amplifikasyonları, nokta mutasyonları, DNA yeniden düzenlenmeleri ve translokasyonlar gibi genetik değişimlerle aktive olarak, onkogen haline dönüşmektedirler. (Liu ve Wang 1994, Kopnin 2000, Scriver ve ark 2001).

1.5. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerin belirlenmesi, hücre büyümesinin düzenlenmesinin ve kanser oluşu mekanizmasının anlaşılmasına önemli katkılar sağlamıştır (Corn ve El-Deiry 2002). Normalde hücre bölünmesini baskılayan proteinleri kodlayan tümör baskılayıcı genlerin, birinde veya birkaçındaki mutasyon tümör oluşumuna neden olmaktadır. Onkogenlerin aksine mutant tümör baskılayıcı genlere bağlı kontrolsüz hücre büyümesi, genetik olarak resesiftir ve etkili olması için her iki kromozom çiftinin de defektif geni içermesi gerekmektedir. Kromozom çiftlerinden biri sağlamsa hastalık ortaya çıkmamakta fakat bu bireyin her hücresinde

genin bir hasarlı kopyası bulunmaktadır. pRb, p53 veya p21 proteinini kodlayan genlerin her iki kopyasında bulunan mutasyonun, hücre büyümesinin baskılanmasını engellemesi sonucu tümör oluşmaktadır. Tümör suppressor genler, ilk kez kalıtsal kanserlerde tanımlanmıştır. İlk bulunan kanser baskılayıcı gen, retinoblastoma (Rb) genidir. Rb loküsünde heterozigot olan hücre normaldir ve normal Rb geninde heterozigotluğun kaybı kanser gelişmesine yol açmaktadır (Almasan ve ark 1995, Kopnin 2000, Scriver ve ark 2001).

1.6. DNA Onarım ve Apoptosis Genleri

İnsan hücreleri DNA hasarını onarabilme yeteneğine sahiptirler. Hücreler, DNA'da çevresel etkiyle ve replikasyon esnasında oluşan spontan hasarların onarılmaması durumunda, neoplastik transformasyona uğramaktadır. DNA onarım genleri, organizmanın diğer genlerdeki (protoonkogen, tümör baskılayıcı gen, apoptoz genleri) onarılması mümkün hasarları onararak, dolaylı olarak hücre proliferasyonunu etkilemektedir. DNA onarım genlerinde işlev kaybı için, her iki alel birden inaktive olmalıdır. Böylece bu genlerin tümör baskılayıcı genler gibi davrandığı düşünülebilir. DNA onarım genlerinde kalıtsal mutasyon olanlarda kanser riski bulunmaktadır. Yaşamsal işlevini bitiren hücreler programlanmış hücre ölümü (Apoptoz) ile yok edilmektedirler. Hücrede apoptozun düzenlenmesinde sistein proteazlar (kaspazlar; kaspaz-8, 9 ve 3) ve Bcl-2 (kaspaz aktivasyonunu düzenlerler) gen ailesi olmak üzere iki protein ailesi önemli rol oynar.

Apoptozu düzenleyen genlerin mutasyonu da kanser oluşumuna yol açmaktadır. Hücrenin yaşaması apoptozu uyaran ve inhibe eden genlere bağlıdır. Bu genler; Bcl-2 (antiapoptotik), Bax ve p53 (apoptotik) genleridir (Kopnin 2000).

1.7. Meme Kanseri

Meme kanseri, bütün dünyada kadınlar arasında en sık rastlanan kanser türüdür. Erkeklerde çok nadir olup, tüm meme kanserlerinin %1'i kadardır. Görülme sıklığı gittikçe artmakta olan meme kanseri, kanserden ölüm nedenleri arasında da ikinci sırada yer almaktadır (Aslan ve ark 2007, Yarbrow ve ark 2010). Uluslararası Kanser Enstitüsü (NCI) 2000-2004 verilerine göre her sekiz kadından birinde hayatı boyunca meme kanseri gelişebileceği ve her 30 kadından

birinin meme kanseri nedeniyle öleceği tahmin edilmektedir (Curado ve ark 2007). IARC online güncel veri tabanı olan GLOBOCAN 2012 verilerine göre 2012 yılında dünya’da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm olmuştur. Dünya’da tanı konulan kanserler; akciğer (%13,0), meme (%11,9) ve kolon (%9,7) olduğu belirtilmiştir (Cancer 2013). Ülkemizdeki duruma bakıldığında ise, sağlık bakanlığı istatistiklerine göre tüm kanser türleri arasında meme kanseri görülme oranının %24 olduğu ve kadınlarda daha yaygın görüldüğü bildirilmektedir. Ülkemizde mevcut verilere göre meme kanseri görülme sıklığının, doğu bölgelerimizde 20/100.000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100.000 oranında olduğu tahmin edilmektedir (Özmen ve ark2009, Somunoğlu 2009).

Meme, süt bezleri ve üretilen sütü meme başına taşıyan kanallardan oluşur. Meme kanseri, lobülleri ya da süt kanallarını oluşturan hücrelerin kontrolsüz çoğalmaları ve vücudun çeşitli yerlerine giderek çoğalmaya devam etmeleriyle gelişmektedir. Meme kanserleri, kanser hücrelerinin lokalize olduğu yere veya yayılma eğilimlerine göre sınıflandırılabilirler. Süt kanallarından kaynaklanan kansere duktal karsinom, lobüllerden kaynaklanan kansere de lobüler karsinom adı verilmektedir. Eğer kanser hücreleri kaynaklandıkları yerle sınırlı kalırlarsa in situ, yayılma eğilimi gösterirlerse invaziv meme kanseri olarak adlandırılırlar. Meme kanseri metastazları akciğer, kemik, lenf nodu ve beyinde ortaya çıkmaktadırlar (Society 2007).

1.7.1. Meme Kanserinde Etkili Onkogenler

Memekanserinin ortaya çıkışına, ilerlemesine ve metastazına katılan birçok faktörün varlığı bilinmektedir (Beckmann ve ark 1997). Meme kanserlerinin bir bölümü, bazı onkogenlerde ve tümörbaskılayıcı genlerde meydana gelen çeşitli değişimler sonucu ortaya çıkar.Meme için ayırıcı özellikler taşıyan onkogenler bulunmaktadır. Hem normal hemde kanserli meme dokularında çoğunlukla saptanan bu özel onkogenler ras,myc ve cerbB-2 (veya HER2/neu) olarak sıralanabilir (Klijn ve ark 1992).

Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR);Hücre membran reseptörü olan EGFR ailesi; EGFR, HER2, HER3 ve HER4’den oluşur. EGFR, tirozin kinaz

aktivitesine sahiptir. Bu aileye ait üyeler transfosforilasyon sonucu bir seri etkileşimler ile heterodimerler oluşturabilirler ve farklı protein ailelerinin aktivasyonunu düzenlerler. EGF'nin reseptörüne bağlanması ile reseptörün uyarılır ve EG hücre içine alınır, aynı zaman EGFR'nin otofosforilasyonuna ve diğer hücre içi substratların fosforilasyonuna yol açar. Bu yol ile nukleusta transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu artar, hücre bölünmesi uyarılır. Hücre membranından nukleusa doğru sinyal iletiminin aktarılmasında proto-onkogen ailesinden bazı üyeler (ras, src ailesi gibi) buna aracılık etmektedir. Bu sinyal iletim şelalesinde yer alan bir çok proto-onkogen çeşitli kanserlerde etkili bulunmuştur. Bu şelale boyunca ortaya çıkan onkogenik mutasyonlar devamlı olarak mitozu aktifleyen sinyallerin taşınmasında rol alırlar (Klijn ve ark 1992, Dickson ve Lippman 1997, Gelmann 1998). EGFR gen amplifikasyonun kötü prognoz ile ilişkili olduğu birçok karsinomda gösterilmiştir (Klijn ve ark 1992).

Kanser hücrelerinde EGFR gen amplifikasyonunun gözlenmesi onun onkogen olduğunun göstergesidir. Hormona bağımlı ve bağımsız meme kanseri hücre soyları karşılaştırıldığında ER yokluğu ve yüksek EGFR düzeyleri gözlenmektedir. Meme tümörlerinde yüksek EGFR düzeyleri, ER'den bağımsız olarak kötü prognozla ilişkisini gösterir (Klijn ve ark 1992).

459 hasta ile yapılan prospektif bir çalışmada EGFR ekspresyonu ile hem hastalıksız dönem hemde yaşam süresi arasında oldukça yakın bir bağlantı olduğu tespit edilmiştir. EGFR ekspresyonunun özellikle invazif lobular karsinomlu hastalarda daha önemli olduğu, EGFR ekspresyon seviyesi yüksek olan bu hastalarda diğer meme kanser alt tiplerine göre survinin çok kısa olduğu bildirilmiştir ve bu tip için önemli bir prognostik belirteç olabileceği vurgulanmıştır (Sainsbury ve ark 1988, Dickson ve ark 1997).

CerbB-2 (HER2/Neu); HER-2/Neu, diğer adı ile cerbB-2 veya p185 olarak isimlendirilen bu onkogen 17. kromozomda q12 ye yerleşmiştir ve protein ürünü hücre bölünmesi ve farklılaşmasına katılır. Ancak gen amplifikasyonu ve aşırı ekspresyon nedeniyle kanser patogeneze katılan bu onkogen, meme kanserleri için önemli bir prognostik belirteç olarak kabul edilmektedir. CerbB-2 onkoproteini plazma membranına yerleşmiş EGFR'ne benzer bir membran reseptördür (Yamamoto ve ark 1986).

CerbB-2, meme kanseri araştırmalarında ve tedavisinde en yoğun çalışılan onkogenlerden biridir. HER2 ve diğerk üyeler (HER1, HER3 veya HER 4) arasındaki liganda bağılı bir heterodimerizasyon cerbB-2 sinyal yolunu aktifler. Bu onkogonenin kopya sayılarının yüksek bulunuşu, tümör şiddeti ile doğıru orantılı olarak saptanmıştır (Perren 1991, Öztürk ve ark 1998, Erensoy ve ark 1998, Kurebayashi2001).

Erken dönem meme kanserinde cerbB-2 gen amplifikasyonu kötü prognoz ile yakın ilişkili bulunmuştur. Çok sayıdaki çalışma ile cerbB-2 amplifikasyonunun diğerk kötü prognostik faktörlerin varlığı, tedaviye düşük cevap ve lenf nodu pozitif meme kanserlerinde hastaların yaşam süreleriyle ilişkili olduğı, tek başına bir prognostik faktör olabileceğı desteklenmiştir. CerbB-2 ekspresyonu ile ilgili verilerin çoğı lenf nodu pozitif hastalardan elde edilmesine rağımen uzun süreli takip sonrasında lenf nodu negatif hastalarda da cerbB-2 amplifikasyonu olanların daha kötü prognoza sahip oldukları gözlenir (Allred ve ark 1992).

Sinyal iletimi ile ilişkili Nuklear Onkogenler

Farklı dokularda büyümeyi indükleyici steroidlerin ve büyüme faktörlerinin etkileri nukleer protoonkogenler aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Hücrelerin mitojenle etkileşimlerinden kısa bir süre sonra c-fos, c-myc, c-myb ve c-jun proto-onkogenleri indüklenir. Bu onkogenlerin indüksiyonu ile hücre proliferasyonu arasında bir bağlantı vardır. Meme kanserinde östrojen ve progesteron ile c-myc, c-fos ve c-jun proto-onkogenlerinin aktişeştikleri gösterilmiştir (Burg ve ark 1992).

c-Mycgeni kromozom 8q24'e yerleşmiştir. c-myc proteini hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptoz ile ilişkili genlerin transkripsiyonlarını düzenleyen bir fosfoproteindir. c-myc'in gen amplifikasyonu ise hücre döngüsünün bozulmasına neden olur ve p53'e bağılı yoldan hücrenin apoptoza gönderilmesinde rol oynar. c-myc geninin aşırı üretimi veya gen yapısındaki değışiklikler meme kanserine neden olmaktadır. Myc ekspresyonu tek başına meme karsinogenezi için yeterli olabilir. Hatta myc'in hormona yanıt vermeme veya kemoterapiye dirençten sorumlu olduğı ileri sürölür. Yaşlı kadınlarda meme kanseri ile c-myc proto-onkogeni arasında yakın bir ilişki bulunmuştur. c-myc gen amplifikasyonu

memekanserindeki en sık rastlanan genetik değişikliklerden biridir. (Germann 1998, Liao ve ark 2000, Osborne ve ark 2004).

Ras proteinleri 21 kD'dur (p21) ve G proteinleri ailesinden olup guanosin nukleosidlerini bağlama yeteneğindedir. Sinyal iletiminde önemli bir aracı moleküldür. Genellikle plazma membranındaki büyüme faktörü reseptörlerinin sitoplazmik parçalarına yakın bölgeye yerleşirler ve GTP ile aktiflenir ve protein kinazlar ile ilişkiye girerek mitozun aktiflenmesinde rol alırlar. Ras'ın onkogenik özellik kazanması nokta mutasyonu veya gen ekspresyonunun artışı ile olur (Dickson ve Lipp 1997, Germann 1998, Lintig ve ark 2000).

Mutasyonların ve amplifikasyonun nadiren gözlenmesi ras gen aktivasyonunun diğer mutasyon mekanizmaları tarafından etkilendiğini gösterir. Meme kanserlerinde ras onkogenlerinde en sık rastlanan mutasyon aşırı ekspresyondur. H ras'ın artmış ekspresyonu lenf nodu metastazlarında ve ileri histolojik dereceye sahip tümörlerde görülmüştür. (Whittaker ve ark 1986).

H-ras1 allel kaybının histolojik grade III tümörlerde, östrojen ve/veya progesteron reseptör kaybı ve kötü klinik gelişime sahip hastalar ile önemli derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir (Theillet ve ark 1986). Böylece H-ras1 lokusunun genotipik analizi meme kanser riski taşıyan hastaların tayininde prognostik bir değer olabileceği ileri sürülmüştür. p21 in seviyelerinin, hormon cevap veren meme kanser vakalarının herbirinde yüksek bulunmasına rağmen hormon ile ilişkisiz tümör vakalarında da saptanmıştır (Pethe ve Shekhar 1999).

Siklinler, Sikline bağımlı kinazlar ve inhibitörleri

Siklinler, sikline bağımlı kinazlar (CDK) ve inhibitörleri (CDKI) hücre döngüsünü doğrudan kontrol eden proteinlerdir. Meme kanserlerinde siklin-D1 (PRAD1) ve siklin-E'nin prognostik faktör olabilecekleri ileri sürülmüştür (Kemomarsi ve ark 1995, Zukerberg ve ark 1995).

Meme kanserlerinde tespit edilen bir diğer gen kromozom 9p21'e yerleşen CDK-2 dir. Meme kanseri hücrelerinde bu genin yerleştiği kromozom bölgesinin mutasyonu ve homozigot delesyonu bildirilmiştir (Cairns ve ark 1995). CDKI-4

(siklin bağımlı kinaz inhibitör-4)'ün ise delesyon yada mutasyon taşıdığı bilinmektedir. Amplifiye siklinleronkogen gibi davranırken siklin inhibitörlerinde tümör baskılayıcı olma olasılığı yüksektir (Dickson ve Lippman 1997).

CDK aktifleşince Rb (retinoblastoma) ve diğer bazı nüklear proteinleri fosforiller ve G0 fazının geçilip hücrenin mitozaya girmesi sağlanır. CDK'ların işlevleri siklinler tarafından düzenlenir. SiklinD1 ve siklinE ekspresyonlarındaki aşırı artışlar hücre döngüsünün kontrolünün bozulmasına yol açar. (Kemomarsi ve ark 1995).

Steroid Reseptörleri

Östrojen reseptörü (ER), Progesteron reseptörü (PR);ER ve PR gen regülasyonunda rol alan reseptörlerdir. ER geni, ER'nin bir alt ünitesini kodlar. Bu alt ünite farklı proteinler ile örn: ısı şok proteini ile kompleks oluşturur ve ER aktif formu ortaya çıkar. Meme kanserlerinde ER genine ait alternatif kırılma olayları ile farklı protein sentezleri ve mutasyonları gözlenmiştir. PR geni ise meme dokusunda 3 farklı izoformu kodlar. Homodimer veya heterodimerler oluşturarak rol alırlar. Meme kanserlerinde ER ve PR izoformlarının çeşitliliği dimerizasyonda önemli farklılıklara, ayrıca ligandın bağlanma özgüllüğünde değişikliklere neden olarak hedef genin farklı bir şekilde düzenlenmesine neden olabilirler (Smith ve Toft 1993).

Meme kanserinin gelişmesinde dişi seks hormonları nın rolü vardır ve her zamangeçerli olmasa da, antihormonal terapiye cevap verdikleri için tümörlerde ER veya PR'nün tayini iyi prognoz olarak kabul edilir. Tümörün prognozu açısından ER tayininin daha güvenilir olması için östrojen ile düzenlenen PR protein düzeyine de bakılır. Meme kanseri ER pozitif dokularda PR'de pozitif bulunur. Hormona bağımlı meme kanserlerinde ER ve PR'nün aktivasyonu normale göre daha fazladır. Hormona cevapsız olanlarda, ya reseptörde bir mutasyon veya reseptör kontrolündeki bir proteinin etkisi veya reseptör izoformlarının farklı seçiminden dolayı olabilir(Dickson ve Lippman 1997).

1.7.2. Meme Kanserinde Etkili Tümör Baskılayıcı Genler

P53 geni 17. kromozomun p13-1 bandına yerleşmiştir ve moleküler ağırlığı 53 kD'luk nuklear bir proteini kodlar. UV ışık, karsinojenler ve sitostatiklerin

DNA'da oluşturdukları hasarı ortadan kaldırmak üzere aktifleşir. Hasar düzeltilemez ise hücre apoptoza yönlendirilir. P53 geninin her iki alleldeki kaybı (heterozigotluk kaybı) veya nokta mutasyonları çeşitli tümörlerde ve meme kanserlerinde gösterilmiştir. Meme kanserlerinde 17p'nin kaybı ile malign histopatolojik özellikler arasında yakın ilişki vardır (Lane 1992, Norberg ve ark 1996, Cattoretti ve ark 1998, Sirvent ve ark 2001).

Meme kanserlerinde aşırı p53' protein üretimi kötü prognoz için bir indikatördür. Meme kanserlerinde yapılan çalışmalar, p53 ekspresyonu ile yüksek tümör derecesi, yüksek proliferasyon indeksi, aneploidi ayrıca ER ve PR yokluğu arasında yakın ilişki olduğu fikrinde birleşilmiştir. Bu parametreler kısa ömür ile ilişkili olduğundan p53 pozitifliği kötü prognoz ile de yakın ilişkilidir (Sirvent ve ark 2001).

Meme kanserlerinde P53 mutasyonlarının tespiti in situ'dan invazif karsinomaya geçiş için bir marker olarak kullanılabilir. In situ duktal karsinomlar da p53 mutasyonu gözlenmediği, buna karşılık meme karsinogenezinin erken devrelerinde p53'ün mutasyona uğradığı bildirilmiştir. Primer meme kanserli vakalarda p53, %15 oranında pozitif saptanmış, EGFR pozitif ve ER-negatif vakalarda ise anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ve p53'ün meme kanserinin prognozundaki önemi belirtilmiştir (Cattoretti ve ark 1998).

1.7.3. Meme Kanserinde Etkili Diğer Genler

Bcl-2 - Apoptoz genleri; Bcl-2 mitokondrion, endoplazmik retikulum ve nukleus membranına yerleşik bir proteindir ve apoptotik hücre ölümü ile ilişkilidir. Meme tümör dokularında Bcl-2 nin aşırı ekspresyonunu gösteren çalışmalar vardır. Genelde Bcl-2 ekspresyonu ER varlığı ile yakın ilişki gösterirken EGFR ve p53 ekspresyonu ile ilişkisi yoktur. Bcl-2 ekspresyonunun bağımsız bir prognostik faktör olduğu konusunda yeterli destek yoktur. Duktal meme karsinomlarında apoptoz kaybı ile ilişkili Bcl-2 aşırı ekspresyonunun, p53 negatif tümörler arasında, hastalığın ilerlemesi ile yakın ilişkisinin yanında ilave genetik lezyonlarında katkısı olduğu bildirilmiştir (Sierra ve ark 2000).

Telomeraz; Meme kanserlerinde ve diğer birçok kanser ile ilişkili bulunan bir diğer gen ve gen ürünüde telomerazlardır. Bu enzim DNA replikasyonu sırasında

kısalan kromozom ucundaki tekrarlanan DNA dizilerinin (telomerlerin) tamamlanmasında rol alır. Telomeraz somatik hücrelerde aktivasyon göstermez iken kanser hücrelerinde ve germ hücrelerinde, ayrıca, sürekli bölünen hücrelerde aktiftir. (Gelmann 1998, Herbert ve ark 2001).

ATM geni (Mutant ataxia-telangiectasia); ATM resesif olarak kalıtılır. Kromozom 11 de yerleşmiştir. ATM geni çok uzun ve komplekstir, çok sayıda çeşitli ve mutasyonlar gözlenir. İki hasarlı (mutant) allel hastalık gelişimine neden olur. Meme kanseri için yüksek risk taşır. Bir mutant allel taşıyanlarda ise meme kanseri riskinin çok yüksek olduğu gösterilmiştir. ATM taşıyıcıları oldukça yaygındır. 1/200 ila 1/100 kadında bu mutasyon orta derecede artmış genetik risk olarak kalıtılır. Toplumdaki meme kanserinin %2-7 sinden bu gen sorumludur (Ahmed ve Rahman 2006).

1.7.4. Ailesel Meme Kanseri ve Yatkınlık Genleri

Kalıtsal meme kanserinde nadir gözlenen yüksek penetransa sahip meme kanserine yatkınlık genleri olarak BRCA1 ve BRCA2 genleri bulunmuştur (Polyak 2002).

BRCA1 ve BRCA2 genleri; BRCA1 geni, kromozom 17q21'e, BRCA2 ise kromozom 13q12'e yerleşik bir gendir. BRCA1 geni 1863 aminoasitlik (aa) , BRCA2 geni ise 3418 aa'lık bir proteini kodlar. Her iki protein de hücrenin diğer bazı proteinleri ile bağlanarak işlev görür.

BRCA1 ve BRCA2 proteinlerinin; hücre proliferasyonunun kontrolünde tümör baskılayıcı proteinler, DNA hasarına ve tamirine katılan proteinler, transkripsiyonun düzenlenmesinde rol alan proteinler, hücre siklusunun kontrol noktalarının önemli proteinleri ve DNA'da rekombinasyonda rol alan proteinler ile yakın ilişkileri gösterilmiştir.

BRCA1 ve BRCA2'deki mutasyonlar ve BRCA proteinlerinin inaktivasyonu tümör baskılayıcı proteinlerin ve diğer "genom koruyucu" rolü olan proteinlerinde inaktivasyonuna neden olarak hücreyi tümör oluşumuna götürürler (Miki ve ark 1994, Wooster ve ark 1994, Polyak 2002).

1.7.5. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanserine neden olan tek bir faktör bulunmamakla beraber birtakım risk faktörlerinin bu hastalığa yakalanma ve gelişim sürecini hızlandığı belirtilmektedir(Topuz ve ark 2003). Meme kanserinin görülme sıklığı, bu risk faktörleriyle bağlantılı olarak değişkenlik göstermektedir(Aslan ve Gürkan 2007). Meme kanseri oluşumundan sorumlu birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Bunlar;

- Yaş
- Ailevi meme kanseri öyküsü
- Doğurganlık öyküsü
- Kişisel meme kanseri öyküsü
- Menstrüel aktivite
- Meme kanseri gelişimine yatkın genleri taşımak
- Geçirilmiş meme biyopsisi
- Işınlanma (radyoterapi)
- Erken menarş
- Östrojen replasman tedavisi
- Oral kontraseptiflerin kullanılması
- Alkol ve sigara kullanımı
- Obezite ve beslenme alışkanlıkları
- Geç menopoz
- Emzirme
- Doğum ve ilk doğum yaşı
- Over veya uterus kanser öyküsü

1.7.6. Meme Kanseri Tedavisi

Meme kanserinin tedavisi, tanı konulduğunda hastalığın safhası, kanserin hücre yapısı, reseptör durumu, onkogenlerin olup olmaması, hastanın yaşı, hastanın sağlık durumuna göre farklılıklar gösterir. Günümüzde meme kanseri tedavisi genel cerrahi, tıbbi onkoloji, radyasyon onkolojisi, patoloji, radyoloji ve nükleer tıp gibi uzmanlık dallarının koordineli çalışması, doğru tedavinin seçimi ile etkili bir noktaya gelmiştir.

1) Cerrahi tedavi: Cerrahi operasyonun birkaç farklı uygulaması vardır. Bu

uygulamalar temelde iki ana gruba ayrılır. Bunlardan birincisi meme koruyucu cerrahisi denilen kanserli dokunun ve/veya çevresindeki invazyon riski taşıyan bir miktar sağlıklı dokunun alınıp çıkartıldığı cerrahi operasyondur. Diğeri ise, radikal mastektomi denilen memenin tümünün alınması işlemidir.

2) Radyoterapi: Radyoterapi tümör dokusuna yada tümör çıkarıldıktan sonra çevre dokuya verilen yüksek enerjili lokal ışın tedavisidir. Meme koruyucu cerrahi sonrasında korunan meme dokusuna yapılan radyoterapinin lokal nüks riskini %70-80 oranlarında azaltıldığı bilinmekte olup, günümüzde radyoterapi rutin olarak meme koruyucu tedavi sonrasında kullanılmaktadır. Radyoterapi, koltuk altı lenf nodlarının ileri safhada olduğu durumlarda da uygulanmaktadır.

3) Kemoterapi: Kanser hücrelerini öldürmek ya da tümör büyümesini durdurmak üzere farklı ilaç veya ilaç kombinasyonlarının ağızdan veya damardan verilerek bu sayede diğer organlara yayılan tümörlerin yok edilmesini hedefleyen bir tedavi yöntemidir. Meme kanserinde etkili bir tedavi yöntemidir.

4) Hormon Tedavisi: Kanser hücrelerinin büyümek için ihtiyaç duyduğu hormonları engellemek amacı ile uygun hormonların hastaya verilmesi yöntemidir. Östrojen hormonu, meme kanseri hücrelerinin içerdikleri hormon reseptörlerini etkileyerek kanser hücrelerinin proliferasyonunu engellemektedir. Hormon reseptörü-pozitif meme kanserlerinde hormon tedavisi östrojen aktivitesini durdurarak olumlu etkiler göstermektedir.

5) Biyolojik Tedavi: Monoklonal antikorlar ve bazı spesifik aşilar aracılığı ile vücut savunma sistemlerinin harekete geçirilmesi esasına dayanan bir tedavi yöntemidir. Trastuzumab gibi bazı monoklonal antikorlar, meme kanserinde aşırı miktarda eksprese edilen HER2/neu proteinine bağlanarak onları inaktive eder.

Bu sayede kanserli hücrelerin büyümesi ve bölünmesi önlenir (<http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-tedavisi.html>).

1.8. Sitokinler

Hücrel düzenleyici proteinler olan sitokinler, çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanarak hedeflenen hücrelerin davranışlarını etkileyen moleküllerdir. Her sitokin kendine özgü hücre yüzey reseptörüne bağlanarak, hücre içi sinyal yollarının etkinliğinin değişmesine sebep olur. Bu değişimler diğer moleküller için hücre yüzey reseptörlerinin sayısının artması ya da

hücrenin kendi etkilerinin değişmesine neden olabilir. Hücrelerden sitokinelere gelen yanıt genellikle gen ifadesinin değişimidir. Böylece hücreler yeni fonksiyonlar geliştirebilir ya da proliferere olurlar. Sitokinler yapısal ve fonksiyonel benzerlikler ile etki mekanizmaları dikkate alınarak sınıflandırılmaktadır (Koleske ve Young 1994). Sitokinler 6 gruba ayrılmaktadır.

1. Büyüme Faktörleri (Epidermal büyüme faktörü, EGF; İnsülin benzeri büyüme faktörü-1, IGF-1; İnsülin benzeri büyüme faktörü-2, IGF-2; Platelet orjinli büyüme faktörü, PDGF; Nöral büyüme faktörü, NGF; Asidik fibroblast büyüme faktörü, aFGF; Bazik fibroblast büyüme faktörü, bFGF vb)
2. Lenfokinler (İnterlökin-1a, IL-1a; IL-1b; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5 vb.)
3. Koloni Stimüle eden faktörler (Granülosit/makrofaj koloni stimuli eden faktör, GM-CSF; Multi-CSF; Eritropoietin, EPO; Lösemi İnhibitör faktör, LIF)
4. Transforme edici büyüme faktörleri (TGF- α ; TGF- β)
5. Tümör nekroz faktörleri (TNF- α ; TNF- β)
6. İnterferonlar (IFN- α ; IFN- β ; IFN- γ)

1.8.1. Transforming Growth Factor- β

Transforming growth factor- β (TGF- β), 25 kDa ağırlığında homodimerik bir proteindir ve 3 izoforma sahiptir. TGF- β_1 , TGF- β_2 ve TGF- β_3 lenfosit/makrofajların da dahil olduğu çeşitli normal ve transforme olmuş hücreler tarafından üretilir (Onat ve ark 2002).

TGF- β "nodal", "activin", BMP ("bone morphogenic protein") ve AMH ("antimüllerian hormone")'ı de kapsayan, doku homeostazının sürdürülmesi ve embriyonik gelişimin kontrolünde önemli rolleri olan geniş bir sitokin ailesinin başlıca üyesidir (Feng ve Derynck 2005).

Hücre proliferasyonu karşıtı sinyalleri düzenleyen moleküllerin en önemlilerinden biri olan TGF- β süper ailesi, organizmanın gelişimini çok yönlü kontrol eden ekstrasellüler büyüme faktörlerinin büyük bir grubudur. Organizmanın tüm dokularının gelişiminde, homeostazisinde ve onarımında çok önemli rol oynayan TGF- β ailesi, yapısal olarak ilişkili çok sayıda polipeptid yapıda büyüme faktörleri içerir. Bunların her biri hücrenin proliferasyonu, diferansiasyonu, motilitesi,

adhezyonu ve ölümü gibi hücrel süreçleri düzenleme yeteneğine sahiptir (Massague1998).

TGF- β hem tümör baskılayıcı supresör, hem de onkogen gibi davranabilmektedir. TGF- β epitelyal hücrelerin bölünmesini baskılayarak tümör supresif etkisini göstermektedir. Tümör hücreleri bu büyüme faktörünün antitümöral etkisini bertaraf etmektedir. Tümöral dokularda TGF- β onkogenik özellikler sergileyerek, kontrolsüz proliferasyon, metaplazi, displazi ve aplazi gelişmesi (epitelyal-mezenkimal geçiş = EMT), invazyon ve metastaz gibi olayların gerçekleşmesine aracılık etmektedir(Derynck ve ark 2001, Wakefield ve Romerts 2002).

TGF- β Sinyalizasyon Yolu

TGF- β sinyal yolağının aktivasyonu ligandın reseptörlerine bağlanması ile başlar. Hücre membranında TGF- β tip I (T β RI) ve TGF β tip II (T β RII) olmak üzere iki tip reseptör bulunur. TGF- β tip III reseptörleri (T β RIII) TGF β 'nin ilk iki tip reseptörlerine bağlanmasını kolaylaştırır. TGF- β tip II reseptörün membran dışı bölgesine, sonra da tip I reseptörüne bağlanır. Oluşan ligand/reseptör kompleksi ikişer T β RI ve T β RII içeren bir heterotetramerdir. T β RI ve T β RII reseptörleri serin/treonin kinaz özelliğindedir. TGF- β 'nın tip II reseptörüne bağlanması, bu reseptörün kinaz aktivitesinin ortaya çıkmasını ve tip I reseptörün yapısında bulunan GS (glisin, serin) bölgesinin fosforilasyonunu sağlamaktadır. Bu şekilde aktiflenmiş T β RI sitozolde bulunan Smad proteinlerin fosforillenmesini sağlar (Shi ve Massague 2003).

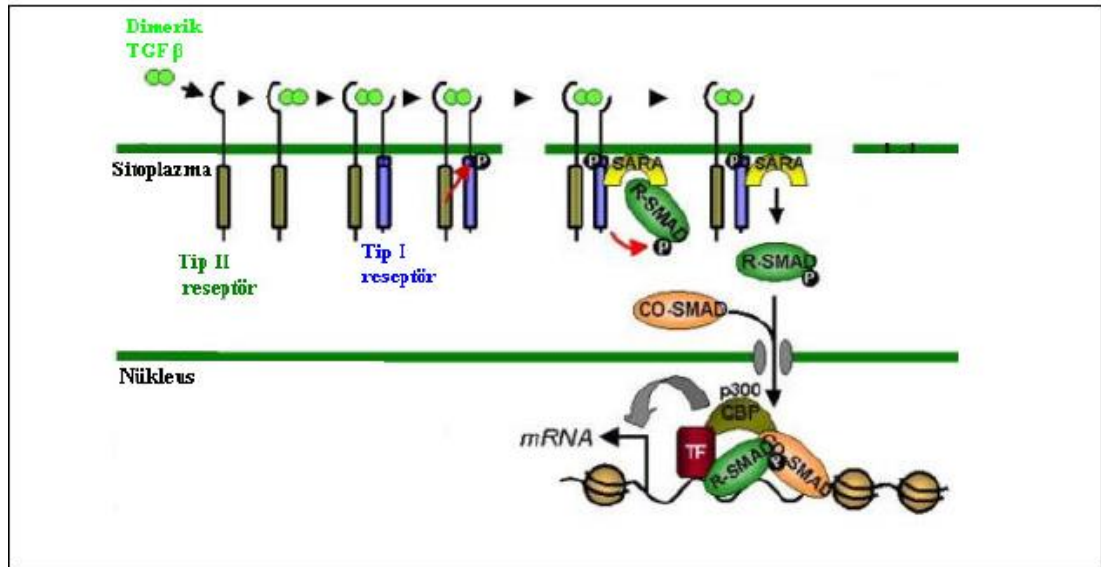
Smad'lar, yapısal ve fonksiyonel olarak 3 alt gruba ayrılır:

(a) Reseptör ileregüle edilen Smad'lar (R-Smad'lar); TGF-beta ailesi reseptör kinazlarının direkt substratlarıdır,

(b)“common-partner” Smad'lar (Co-Smad'lar); R-Smad'larla birleşerek sinyal iletimine katılırlar,

(c)inhibitor Smad'lar (I-Smad'lar); diğer 2 grubun sinyal fonksiyonunu inhibe eden antagonistler (Soyoz ve Özçelik 2007, Kaminska ve ark 2005).

R-Smad'lar da kendi içlerinde 2 alt gruba ayrılırlar; BMP Smad'lar ve TGF-beta/aktivin Smad'lar. BMP Smad'lar, Smad 1 ve birbirine yakın homologlardan olan Smad 5 ve Smad 8'ten oluşmakta olup, BMP reseptör I'in substratları ve BMP sinyallerin aracılığı olarak görev yaparlar. TGF-beta/aktivin Smad'lar ise Smad 2 ve 3'ten oluşur ve TGF-beta ile aktivin sinyallerinin aracılığı olarak görev yaparlar. Memeli epitel hücrelerinde Smad 2 ve 3, gelişimin inhibisyonuna ve haberci genlerden TGF-beta ve aktivinin transkripsiyonunun aktivasyonuna aracılık ederler. R-Smad'lar sinyal iletimi görevlerini yerine getirmek için diğer bir Smad'a ihtiyaç duyarlar. Omurgalılarda, Co-Smad'lar grubuna dahil olan Smad 4'tur. R-Smad'lar fosforile olduğu zaman Smad 4'le birleşerek hücre nükleusuna girerler. Bu kompleks nükleus içinde yalnız DNAbağlanma alt birimi ile birleşik halde bulunabilirler ve spesifik promotör elemanlarına bağlanarak hedef genleri aktive ederler. TGF-beta sinyal yolunda negatif regülatör olarak görev yapan I-Smad'lar, Smad 6 ve Smad 7'den oluşurken; Smad 6, BMP sinyallerini, Smad 7 ise TGF-beta ve BMP sinyallerinin her ikisini de inhibe eder (Soyoz ve Özçelik 2007, Kaminska ve ark 2005).

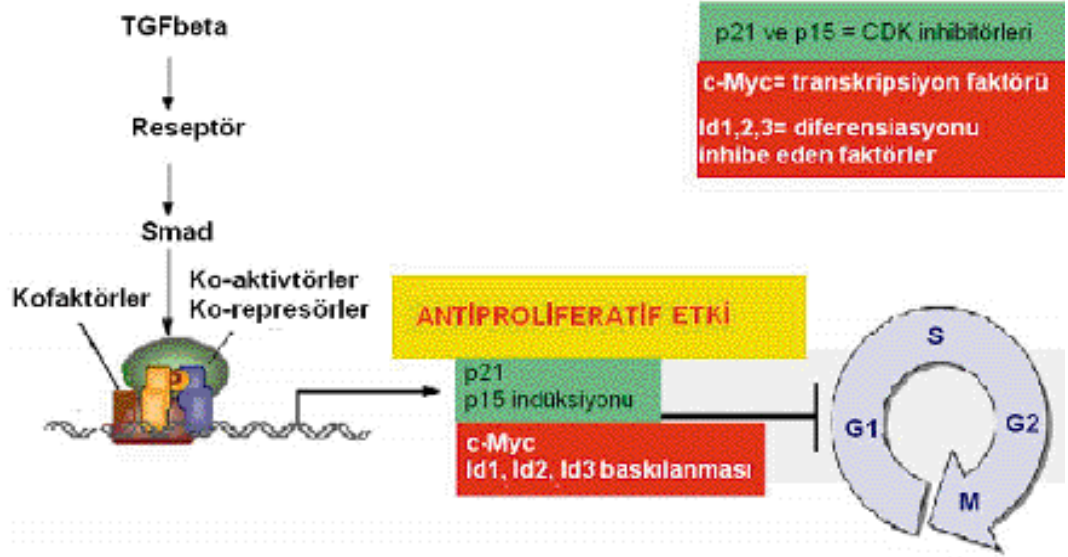


Şekil 1.3. TGF- β signalizasyon yolu (Derynck ve Zhang 2003).

TGF- β 'nin fonksiyonları

TGF- β 'nin antiproliferatif etkisi; TGF β 'nin normal hücrelerde başlıca fonksiyonu proliferasyonu baskılaması ve diferansiasyonu hızlandırmasıdır. Epitelyal ve hematopoetik hücrelerde TGF- β antiproliferatif etkilidir ve hücre siklusunun G1 fazında durmasını sağlamaktadır (Siegel ve ark 2003).

TGF- β hücre siklusunun ilerlemesi için gerekli olan sikline bağımlı kinazların (CDK) inhibitörleri olan p21 ve p15 proteinlerinin sentezini aktifler (Pardali ve ark 2000, Seoane ve ark 2001). Ayrıca, bir transkripsiyon faktör olan c-Myc, ve diferansiasyonu inhibe edici faktörler olan Id1, 2 ve 3 genlerinin inaktivasyonunu sağlamaktadır (Chen ve ark 1994, Iavarone ve ark 2002).



Şekil 1.4. TGF- β 'nin antiproliferatif etkisini sağladığı aracı moleküller.

TGF- β 'nin proapoptotik etkisi; Bazı hücre tiplerinde TGF- β , apoptozu indüklemektedir. TGF- β Smad yolun etkisi ile TIEG-1 (TGF- β -inducible-early-response gene) geni indüklenir. TIEG-1 apoptozu indükleyen ve proliferasyonu baskılayan bir transkripsiyon faktörüdür (Tachibana ve ark 1997). Hepatoma hücrelerinde ise TGF- β tarafından başlatılan apoptoz sürecin indüksiyonu DAPK (death-associated protein kinase)'ın aktivasyonu ile gerçekleştirilir (Jang ve ark 2002). Mide kanser hücrelerinde TGF- β Fas reseptörlerine bağlanarak sitozolde çeşitli kaspazların aktivasyonunu ve hücrenin apoptozu uğramasını sağlamaktadır (Kim ve ark. 2004). Prostat kanser hücrelerinde TGF- β 'nin başlattığı apoptoz sürecine ARTS (apoptoz regülörü) ve Daxx (Fas reseptörlerine bağlanan) proteinlerinin de katıldığı bildirilmiştir (Larisch ve ark 2000, Perlman ve ark 2001).

TGF- β 'nin anti-inflamatuar etkisi: TGF- β bilinen en güçlü immünsupresif moleküllerden biridir. TGF- β immün sistemin efektör T (Th1 ve Th2) ve sitostatik T hücrelerini baskılayarak, düzenleyici T-reg hücrelerini ise aktifleyerek immün ve inflamatuar cevabı baskılamaktadır (Li ve ark 2006).

Kanser Oluşumu ve TGF- β

Kanser oluşumunda TGF- β bazı durumlarda tümör supresör, bazen de onkogen gibi davranabilmektedir. Normal durumlarda hücreler TGF- β 'nın sitostatik ve diferansiasyonu hızlandırıcı etkisini kullanırlar. TGF- β yolunda bir duraksama olduğunda hiperplazi gelişir. Hiperplazide hücre çoğalması kontrol altındadır. Premalign durumlarda ise hücreler TGF- β 'nın proapoptotik etkisini kullanırlar. TGF- β yolunun baskılanmasıyla hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başlar ve neoplaziler (tümörler) oluşmaktadır. Tümör hücrelerinde TGF- β 'nın antiproliferatif ve tümör supresif etkisi ortadan kalkar. TGF- β onkojenik özellikler kazanır, kanser hücreleri TGF- β kendi avantajları için kullanıp kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başlar, tümör komşu dokulara yayılır (invazyon) ve metastazlar oluşur (Massague2008).

TGF- β sinyalizasyon yolu sitoplazmik kolu elemanlarının genlerindeki mutasyonlar, bu yolun inaktivasyonuna çeşitli kanserlerin gelişmesine neden olurlar. Tip II reseptör geninde meydana gelen delesyon veya duplikasyonlar, reseptörün inaktivasyonuna veya kinaz özelliğinin kaybına neden olurlar. Kolon, mide, akciğer, karaciğer, safra kesesi ve over kanserlerinde Tip II reseptör mutasyonları sık görülmektedir (Levy ve Hill2006).

Tip I reseptör geninde oluşan mutasyonlara özofagus, over, baş/boyun bölgesi kanserlerinde sık rastlanılmaktadır (Kaklamani ve ark 2004). Ayrıca, ekspresyonun azalmasına neden olan her iki reseptör genin promoter bölgesindeki mutasyonlar, akciğer, prostat, mesane ve mide kanserlerinde görülür (Levy ve Hill2006). TGF- β yolundaki kilit rollerine rağmen kanserde RSmad genlerinde mutasyonlara daha az rastlanılmaktadır. Kolon, mide kanserlerin ve lenfomaların çok küçük bir kısmında Smad2 ve Smad3 proteinlerinin ekspresyonu azalmıştır. Smad 2 ve 3'ün aksine, pankreas karsinomlarının %50 ve kolon kanserlerin %10'nunda Smad4 geninde bir mutasyon söz konusudur (Levy ve Hill 2006, Sjoblom ve ark 2006). TGF- β yolundaki inhibitör etkili Smad6 ve Smad7 genlerinin artmış ekspresyonu da endometrium ve tiroid kanserine neden olabilmektedir(Cerutti ve ark 2003, Dowdy ve ark 2005).

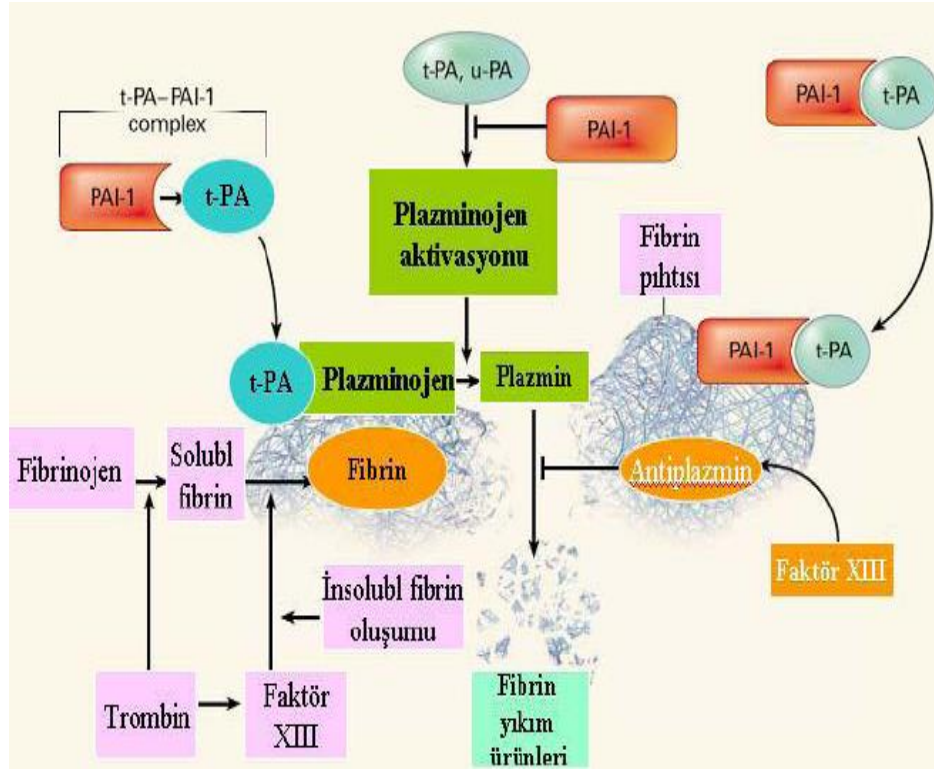
TGF- β yolu sitoplazmik kolu elemanlarının genlerindeki mutasyonlar kolorektal, pankreas, over, mide ve baş/boyun bölgesi kanserlerine neden olur. Bununla birlikte, meme, prostat, glioma, melanom ve hematopoetik hücre kanserlerinde TGF- β yolun sitoplazmik kolu etkilenmezken, yolun nükleer kolunda bazı değişiklikler meydana gelir. (Jen ve ark 1994, Krimperfort ve ark 2007). p15 ve p21 proteinlerinin yokluğunda TGF- β tümör süpresif etkilerini gösterememektedir. (Padua ve ark. 2008). Kanserde TGF- β 'nin anti-tümöral ve anti-inflamatuar immün cevabı baskılanır. TGF- β bir onkogen gibi davranmaya başlar. TGF- β 'nin hücre/hücre etkileşimi üzerindeki kontrol mekanizması bozulur ve TGF- β 'nin etkisi ile hücre/hücre adhezyon reseptörü olan "Ecadherin" sentezi baskılanır. Birçok kanser tiplerinde "E-cadherin" genin baskılandığı bildirilmiştir (Padua ve ark 2009).

Hücreler arasında adhezyonun bozulması ile birlikte hücreler hareketlilik kazanır ve metaplazi, displazi ve anaplaziye öncülük eden epitelyal-mezenkimal geçiş (epithelial-mesenchymal transdiferentiation=EMT) süreci başlatılmış olur (Miettinen ve ark 1994, Off ve ark 1996).

1.9. Plazminojen Sistem:

Fibrinolizis, kompleks zimojen aktivatör ve inhibitörleri içeren hemostatik sistem tarafından fibrinin yıkılmasıdır. Fibrinolitik sistem aktivitesi plazminojen aktivatörün etkisi ile inaktive prekürsör plazminojenden aktif plazmin üretimi ile tanımlanır. Plazminojen kan dolaşımında bulunan fibrinolitik sistemin bir üyesidir. Arjinin-Valin bağının kırılmasıyla aktif formu olan plazmine dönüştürülür. Plazmin ise fibrinolitik yoldaki en önemli son üründür. Plazminin aktivasyonunda ve inhibisyonunda çeşitli mediatörler etkilidir. İnsanda doku tipi plazminojen aktivatörü (tPA) ve ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (uPA) olmak üzere iki majör plazminojen aktivatörü bulunur. Bu aktivatörlerin ikisi de endotelde sentezlenir. Plazminojen aktivitesi fibrin, uPA, tPA reseptör ve plazminojen reseptörleri ile artmaktayken, PA inhibitörleri varlığında veya direkt plazmin inhibisyonu ile azalmaktadır (Eitzman ve ark 1997). En önemli plazminojen aktifleştirici ajan tPA'dır. tPA vasküler endotel hücreleri tarafından sentezlenip kan dolaşıma salınır ve fibrinolizisin başlamasında önemli rol almaktadır. Plazmin fibrin, fibrinojen, faktör V ve faktör VIII' i parçalar. Doku plazminojen aktivatörü üzerindeki bölgeler fibrine bağlanmada, fibrine özgü plazminojenin aktifleştirilmesinde rol oynar. Fibrin

varlığında t-PA' nın plazminojen etkinleştirici özelliği belirgin bir şekilde artar. Dolaşımdaki t-PA PAI-1 tarafından inhibe edilmektedir (Irigoyen ve ark 1999).



Şekil 1.5.Fibrinolitik yolların aktivasyonu ve inhibisyonu (Irigoyen 1999).

tPA'nın çok büyük kısmı plazmada PAI-1, antiplasmin ve C1-inhibitör gibi inhibitörlerle kompleks yapmış şekilde dolaşır. Fibrinolitik sistemde PAI-1 inaktivasyonu artmış plazmin oluşumuna neden olur. PAI-1 plazminojenden plazmin oluşumunu inhibe ederek koagülasyon ve fibrinolitik sistem dengesinde önemli rol oynar. Artmış plazmin fibrinolitik etki ile birlikte doku matris metalloproteinaz (MMP) aktivasyonuna yol açar. Aktif MMP de ekstraselüler matris (ECM) yıkımına neden olur. Fizyolojik olarak plazmada küçük konsantrasyondaki tPA'ya bağlı olarak az miktarda plazmin üretilir. Plazminojen aktivasyonu spesifik ve hızlı çalışan PA/PAI ile düzenlenir (Kohler ve Grant 2000, Ercan 2004).

En az dört tane PA inhibitörü bulunmaktadır, bunlar PAI-1, PAI-2, PAI-3 olarak da bilinen aktive protein-C inhibitörü ve proteaz neksindir. Her ne kadar in vitro olarak pek çok PA inhibitörü gösterilmişse de en önemli intravasküler PA inhibitörü PAI-1'dir (Eitzman ve ark 1997).

1.9.1. Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 (PAI-1):

PAI-1 fibrinolizisin güçlü bir inhibitörüdür. Serin proteinaz inhibitör (serpin) ailesindedir ve diğer proteaz inhibitörleri gibi kanda bulunur. PAI-1 diğer serpin inhibitörleri gibi hedef proteaza irreversibl bağlanarak intihar inhibitörü gibi davranır ve sodyum dodesil sülfat (SDS) bölgesi ile kararlı kompleks oluşturur. tPA ve ürokinazın major fizyolojik inhibitörüdür. PAI-1 plazmada ortalama 20 ng/mL (0.5nM) gibi çok düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır ve yarı ömrü yaklaşık 6-7 dakikadır (Morice ve ark. 2008). Üç tipi vardır (PAI-1, PAI-2, PAI-3) (Dawson ve ark. 1993). 7. kromozomda (7q21.3-q22) kodlanmış olup 12.2 kb yer kaplayan 9 ekson, 8 intron içermektedir. 379 aminoasitten oluşan tek zincirli globüler glikoprotein yapısındadır (Strandberg ve ark 1988, Lijnen ve Colle 1986). Moleküler ağırlığı 45-kDa'dır ve reaktif peptit zinciri Arg 345-Met 346 bölgesinde lokalizedir. Bu bölge PAI-1'in asıl fizyolojik bölgesidir (Lijnen 2005). Yapısal olarak anjiotensinojen, antitrombin ve alfa-2 antiplazminin dahil olduğu diğer serpinlere benzer (Lijnen ve Collen 1986, Lijnen 2005) PAI-1'in kaynağı trombositler, monosit, makrofaj, endotel, plazma, fibrosarkom hücreleri ve hepatositlerdir. PAI-1'nin endotelden sentezlendiği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda PAI-1 endotel hücre kültüründe üretilmiştir (Tapiovaara ve ark. 1996, Samad ve ark. 1996, Lijnen 2005). PAI-1 karaciğer, vasküler doku ve yağ dokusu başta olmak üzere farklı dokularda aktif olarak sentezlenebilir (Vaughan 2005). PAI-1 için endotel önemli bir sentez bölgesidir ve PAI-1 hormonal, metabolik veya inflamatuvar uyaran yokluğunda bile endotelial hücre kültürlerinde bolca sentezlenmektedir (Lijnen ve Collen 1997, Vaughan 2005). PAI-1'in büyük kısmı ise aktive trombositlerden salınmaktadır. PAI-1 trombositler dışında hücrelerde depolanmaz, sentezden sonra hızlıca salınır ve salındıktan çok kısa süresince PAI-1 inhibitör aktivitesini kaybetmektedir. PAI-1'e bağlanan plazma ve periselüler matriks komponenti olan vitronektin PAI-1'in aktif konformasyonunu stabilize eder. (Winman 1995, Tapiovaara ve ark 1996, Lijnen 2005).

PAI-1 sentezi platelet-derived growth faktör (PDGF), trombin, interleukin-1 (IL-1), transforming growth faktör- β (TGF- β), fibroblast büyüme faktörü ve endotoksin gibisitokinlerle düzenlenmektedir. Östrojen ve insülin gibi hormonlar da PAI-1 üretimini düzenlemektedir (Vaughan 2005).

PAI-1 plazmada bir glikoprotein olan vitronektin ile kompleks olarak dolaşmakta ve vitronektin PAI-1'in stabilize olmasını sağlamaktadır. tPA ve uPA ile kompleks oluştuğunda bu bağlanma geri dönüşlüdür. Fizyolojik olarak vitronektin-PAI-1 kompleksi ECM'de inhibitör formda bulunur. Vitronektinin çokluğu PAI-1 aktivitesinin korunmasına neden olur. pro-uPA, ürokinaz reseptörlerine (uPAR) bağlanır bağlanmaz aktive olur. Aktive olan uPA'nın hücre yüzeyindeki uPAR'a bağlanması PAI-1 ile inhibe edilir (Czekay ve ark2003). İntegrinler ve büyüme faktör reseptörleri uPAR'a bağlanmayı aktive etmektedir (Liu ve ark 2002).

Yüksek plazma PAI-1 düzeyleri sepsis, miyokard infarktüsü gibi akut hastalıklar ve kanser, ateroskleroz, tip II diyabetes mellitus (tip-II DM) gibi kronik hastalıklarda görülmektedir. PAI-1'in bu hastalıkların gelişmesindeki rolü oldukça karışıktır. PAI-1'in plazminojen aktivatör regülasyonu ile fibrinolizisi etkileyerek veya hücre migrasyonunun regülasyonu ile doku yeniden şekillenmesini etkilediği düşünülmektedir (Natalia ve ark. 2007).

PAI-1 ve Tümör Hücreleri:

Plazminojen aktivatör sistemi solid tümör gelişimi, invazyonu ve metastazında rol almaktadır. uPA yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda periselüler proteolizis aracılığıyla tümör hücre invazyonu ve artmış anjiogenezden sorumludur (Andreasen ve ark 1997). Meme, akciğer, kolon, over, mide ve böbrek kanserlerinde yapılan çalışmalarda PAI-1'in kötü prognostik faktör olduğu saptanmıştır. PAI-1'in tümör hücre apoptozisini inhibe ederek tümör büyümesine neden olduğu gözlenmiştir (Kwaan ve ark 2000).

Solid tümörlerde olduğu gibi lösemide de koagülasyon ve/veya fibrinoliz anormallikleri bulunmaktadır. Lösemili hastalarda fibrinolitik dengesizliğin uygunsuz plazminojen aktivasyonu ile oluştuğu ileri sürülmektedir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki lösemik hücrelerden PAI-1 ve PAI-2 sentezlenmektedir.

Plazminojen aktivasyonu invaziv davranışlara katkıda bulunur (Scherrer ve ark.1999). Plazmin aktivasyonu pıhtı yıkımında, inflamasyonda, tümör hücre yayılımında, yara iyileşmesinde, anjiogenez ve trofoblast invazyonunda rol alır. Tümör hücreleri invazyon için proteolitik aktiviteye ihtiyaç duyar, plazmin ile

beraber diğer doku yıkım enzimleri de tümör hücre metastazında rol alır. Tümör dokusunda uPA ve/veya bunun inhibitörü PAI-1'in yüksek düzeyleri kötü prognoza neden olmaktadır (Tapiovaara ve ark 1996).

1.9.2. Doku tipi Plazminojen Aktivatörü (tPA):

İki önemli plazminojen aktivatörlerinden biri olan tPA 527 aminoasitten oluşan birglikoproteindir. 72-kDa ağırlığında serin proteazdır. Primer olarak fibrinolizis ve trombolizisi aktive eder. tPA ilk olarak melanoma hücre kültürü ve uterusu gösterilmiştir. uPA gibi tek zincirli enzim olarak salgılanır. Hem tek zincirli hem de iki zincirli tPA enzimatik olarak aktiftir. tPA'nın ağır-A-zinciri fibrinojenle homolog olan parmak bölgesini içerir ve plazminojen, protrombin ve uPA ile homolog bölge içerir. Hafif zincir ise enzimin aktif bölgesini içermektedir. tPA primer olarak endotel hücrelerinde sentez edilir ve salgılanır. Dolaşımdaki yarı ömrü yaklaşık 5 dakika gibi oldukça kısadır. Tek başına plazminojenin zayıf aktivatörüdür. fibrin varlığında t-PA'nın plazminojene afinitesi artmaktadır. Ekstravasküler hücrelerde de sentezlenmesine rağmen, t-PA plazminojenin intravasküler aktivatörüdür (Tapiovaara ve ark 1996, Stuart ve ark 2009).

1.9.3. Ürokinaz tipi Plazminojen Aktivatörü (uPA):

Tek zincirli uPA veya proürokinaz 411 aminoasitten oluşan bir glikoproteindir. Serinproteaz bölgesinde epidermal büyüme faktörü benzeri bölge, plazminojen benzeri bölge ve katalitik bölgeden oluşan triadı bulundurur. Plazmin ve kallikrein tarafından tek zincir uPA'daki Lys 159-Ile 159 peptit bağı kırılır ve disülfid bağı iki zincirli u-PA oluşur. 10. kromozomda lokalize, 11 ekson tarafından kodlanır ve 6.4 kb büyüklüğündedir. Endotel hücreleri, makrofajlar, renal epitel hücreleri ve bazı tümör hücreleri tarafından sentezlenmektedir. İdrar ve plazmada düşük konsantrasyonda saptanabilir (Lawn ve ark 1992, Webb ve ark 2001).

Lokal fibrinolizis, doku yeniden düzenlenmesi, hücre migrasyonu, inflamasyon, tümör invazyonu, aterosklerotik plak oluşumu ve yara iyileşmesinde rol alır (Schmitt ve ark 1995).

İki zincirli uPA hafif A zinciri ve ağır B zincirini içermektedir. Her iki form daplazminojeni aktive etmekte ancak sadece ağır zincir uPA reseptörlerine (uPAR, CD87) bağlanabilmektedir. uPA'nın fibrine afinitesi tPA'dan daha azdır. Bu nedenle hem fibrin varlığında hem de yokluğunda efektif plazminojen aktivatörüdür. Kanseri invazyonu ve metastazında uPA-uPAR ve PAI-1 önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda çeşitli kanserlerde düzeyleri artmış bulunmuştur. uPA ölçümünün özellikle meme kanserlerinde prognostik faktör olarak kullanılabilirliği üzerinde durulmaktadır (Duffy ve Duggan 2004).

1.9.4. Solid Tümörlerde Plazminojen Aktivatörlerin Durumu:

Metastaz oluşumu için invazyon şarttır. İnvazyon ve neovaskülarizasyon tümör hücrelerinin yayılımını sağlar. Tümör tarafından indüklenen anjiogenezi tümörünün dağılımı için kapı görevi görür. U-PA bağımlı plasminojen aktivasyonunun anjiogenezin regülasyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Anjiogenezi 1-3 mm'den daha küçük solid tümörlerin yayılımı için gerekli ve sıklıkla tümör gelişiminin erken döneminde ortaya çıkan bir olaydır. Anjiogenezinin inhibisyonu, solid tümörlerin büyümesini inhibe eden önemli bir olaydır. Tümör anjiogenezi tümör hücreleri tarafından salınan pek çok pozitif ve negatif regülatör ve özellikle tümör ile ilişkili makrofajlar TAM' lar olmak üzere tümörle ilişkili konak hücreleri ile ilişkilidir. TAM' lar uygun stimulus ile aktive olduğunda tümör anjiogenezinde önemli rol oynayan maddeleri salar. Bu maddeleri proteazlar ve büyüme faktörleri (asidik fibroblast büyüme faktörü FGF, bazik FGF, granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör GM-CSF, tümör büyüme faktörü alfa TGF α , insülin benzeri büyüme faktörü bir IGF-1 ve sitokinler (Tümör nekrozi faktörü alfa TNF α , interlökin altı IL-6, interlökin sekiz IL-8) oluşturur. TAM' lar, anjiogenezi inhibe edecek maddeleri de salma özelliğine sahiptir, bunu PA'nın spesifik inhibitörlerini salarak yapar. UPA'nın anjiogenik faktörler tarafından indüklenerek kapiller endotel hücrelerinin migrasyonunda rol aldığı bilinmektedir.

Özellikle meme kanserinde, agresiflik ve invazyon ile ilişkili olduğu bilinen UPA'nın aksine PAI-2 düzeyinin yüksek olmasının prognozu olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (Ingrid ve ark 1998).

Kolon kanser hücre kültürleriyle yapılan, subendotelyal hücre matriks degradasyonunun incelendiği bir çalışmada, uPA üreten kolon kanser hücrelerinin yapmış olduğu matriks degradasyonu kültüre PAI-2 eklenmesi ile önlenmiştir (Baker ve ark 1990). UPA'nın tümör hücre invazyonunda proteolitik etki gösterdiği ve metastaz sırasında PAI-1 ile aktivitesinin regüle edildiği bilinmektedir. Meme kanserli hastalarda yüksek uPA ve PAI-1 düzeyinin kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Foekens ve ark 1995).

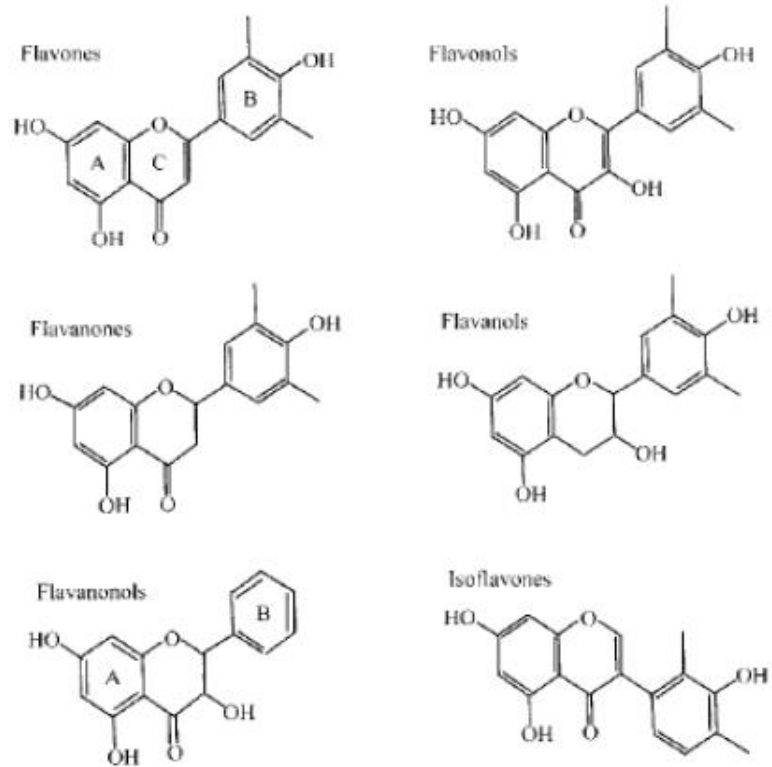
Plazminojen aktivatörleri bazı normal ve malign hücrelerden salınır. Gastrointestinal karsinomlu 80 hastanın yer aldığı bir çalışmada, ürokinaz antijen, doku tipi plasminojen aktivatör antijen ve plazminojen aktivatör inhibitör düzeyleri belirlenmiştir. Pankreas ve kolorektal karsinomlu hastalarda metastazdan bağımsız olarak plazma ürokinaz seviyeleri yüksek bulunurken, safra kesesi veya gastrik karsinomu olanlarda kontrollerle karşılaştırıldığında uPA düzeyinde artış saptanmamıştır (Johannes ve ark 1987). Maligniteler sırasında oluşan asitlerde fibrinolitik sistemin aktive olduğu görülmüştür. Plazmin/antiplazmin ve t-PA/ PAI-1 oranlarının malign olmayan asitlerle karşılaştırıldığında, malignitelerde arttığı gösterilmiştir. Malign asitlerde artan predominant protein t-PA'dır (Buo ve ark 1995).

1.10. Flavonoidler

Flavonoidler, bitkisel kaynaklı besinlerde doğal olarak bulunan ve yaklaşık 6500 farklı çeşidi olan, polifenolik bileşiklerdir (Saldamlı 2007). Ortak bir fenilbenzopiron (C6-C3-C6) yapısına sahiptirler, doymuşluk düzeyine ve merkezi piron halkasının açılmasına göre sınıflandırılırlar. Flavonlar, flavanoller, isoflavonlar, flavonoller, flavanonlar ve flavanonoller olmak üzere genel olarak 6 sınıfa ayrılırlar. (Middleton ve Kandaswami, 1986; Harbone ve Williams, 2000).

Çizelge 1.1. Flavonoidlerin alt sınıfları ve besinsel kaynakları (Ren ve ark 2003).

Flavonoid alt grupları	Flavonoidler	Temel besin kaynakları
Flavonoller	Kaempferol, myricetin, quercetin, rutin	Soğan, kiraz, elma, brokoli, lahana, domates, böğürtlen, çay, kırmızı şarap, karabuğday
Flavonlar	Apigenin, chrysin, luteolin	Maydonoz, kekik
İsoflavonlar	Daidzein, genistein, glycitein, formononetin	Soya fasülyesi, baklagiller
Flavanoller	Catechin, galocatechin	Elma, çay
Flavanonlar	Eriodictyol, hesperitin, naringenin	Portakal, greyfurt
Flavanonoller	Taxifolin	Limon, narenciye



Şekil 1.6. Flavonoidlerin kimyasal yapıları (Ren ve ark 2003)

Flavonoidler, yenilen meyve ve sebzelerde bol olarak bulunmaktadır. Gnlktketilen miktarının birkaç yüz miligram olduğu tahmin edilmektedir (Hollman ve Katan 1999). Flavonoidlerin birçok tıbbi bitkide de bulunduğu belirtilmiştir. Flavonoidleri içeren bitkisel ilaçlar tüm Dünya’da özellikle in’de kullanılmaktadır (Di Carlo ve ark 1999, Samuelsen 2000).

Doğada yaygın halde hemen hemen tüm bitki familyalarında bulunurlar. Meyve, sebze, tahıl, çay, kahve ve kırmızı şarap oldukça fazla miktarda flavonoid içerir. Bitkisel kaynaklı flavonoidlerin biyokimyasal ve farmakolojik aktiviteleri oldukça geniştir. Antioksidan, damar açıcı, anti-inflamatuar, antibakteriyel, immün-uyarıcı, antiallerjik ve antiviral etkileri bu aktiviteler arasındadır (Gao ve ark 2003). Aynı zamanda, insanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalar flavonoidlerin KVH ve kanser hastalıklarına yakalanma riskini azalttığı belirlenmiştir (Cirico ve Omaye 2006).

1.10.1. Flavonoidlerin Biyosentezi

Biyosentez araştırmalarından elde edilen bilgilere göre flavonoidlerin A halkasının asetil koenzim-A moleküllerinden veya  molekül malonil koenzim A’dan, B ve C halkalarının ise fenil alanin gibi fenil propanoid bileşiklerinden meydana geldiği saptanmıştır. A halkasını meydana getiren asetat üniteleri ile B ve C halkalarını meydana getiren fenil propanoid bileşiklerinin kondensasyonu ile kalkonlar oluşur (Küçükislamoğlu 1996, Byrne 1996, Li 2006, Martens ve Mithofer 2005).

1.10.2. Flavonoidlerin Biyolojik nemi

Bazı flavonoidlerin biyolojik aktivite göstermesinden dolayı, flavonoidlere karşı ilgi 1940’lı yıllardan itibaren artmaya başlamıştır. Bu ilginin başlıca nedenlerinden biri, 1936 yılında limon kabuklarından elde edilen flavonoidli bir preparatın P-vitamin aktivitesi göstermesi olmuştur (Harmandar ve Bilaloğlu 1997).

Flavonoid araştırmalarının en aktif alanını insan sağlığına sağladığı katkılaroluşturmaktadır. Farklı araştırma grupları flavonoidlerin, antiinflamatuar, antioksidan, antimikrobiyal, antibakteriyel ve antikanserojenik

etkiler gösterdiğini tespit etmişlerdir (Harborne ve Williams2000, Le Marchand1996, Shirley2002).

Flavonoidlerin ilk olarak belirlenen biyolojik özelliği kılcal damar duvarlarına olumlu etkileridir. Bu bileşikler kılcal damarlarda kan sızdırmanın önlenmesinde,kırılgnalık ve geçirgenliğin ortadan kalkmasında olumlu etkiler göstermişlerdir.

Flavonoidler kan damarlarına etkileri ile birlikte, zayıf kalp kuvvetlendirici maddeler olarakta bilinirler. Başka bir araştırma sonuçlarına göre quercetin, rutin ve bazı flavonoller zayıf kalbi kuvvetlendirme, nabızı normalleştirme özelliğine sahiptirler.Flavonoidlerin en önemli özelliklerinden biri de, karaciğer fonksiyonuna olumlu etkileridir. Flavonoidlerin safra salgılanmasını hızlandırdıkları, karaciğerin barbiturat ve arsenik gibi bileşiklere karşı detoksikasyonuna etki ettikleri açıklanmıştır (Harmandar ve Bilaloğlu 1997).

Flavonoidlerin bitkilere renk verme, UV ışınlarından koruma gibi özellikleri olduğuda tespit edilmiştir. Bu nedenle kozmetik ürünlerde özellikle koruyucukremlerde önemli bir katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Shirley1997). Bunlardan başka flavonoidler, bitkilerde enerjinin dönüşümüne ve büyüme hormonlarına etki ederler.Ayrıca solunumu ve fotosentezi düzenleme ve bulaşıcı hastalıklara karşı savunmafonksiyonlarına sahiptirler (Zeback ve ark 1989).

1.10.3. Diyetel Flavonoidler ve Kanser

Meyve ve sebze tüketiminin kanser riskini azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Steinmetz ve Potter1991a, Steinmetz ve Potter1991b, Steinmetz ve Potter1996, Ziegler ve ark 1996). 1997 yılında; Dünya Kanser Araştırma Vakfının, Amerikan Kanser Araştırma Enstitüsü ile birlikte hazırladığı raporda, 30 yılı aşkın yapılan epidemiyolojik araştırmalar incelenmiş ve diyet ile kanser arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Buna göre; meyve ve sebze tüketiminin akciğer, mide, ağız, yutak, özofagus, kolon ve rektum kanser riskiyle ters orantısı olduğu sonucuna varılmıştır (Anonim 1997).

Flavonoidler birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. Kanser önleyici etkileri; anti-mutajenik, anti-proliferatif, anti-oksidan etki ve hücre sinyal iletimi, hücre siklus

kontrolü ve anjiogenezdeki rollerinden kaynaklanır (Hertog ve ark1992). Flavonoidlerin karsinogenezi inhibe ettikleri *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarlagösterilmiştir (Caltagirone ve ark2000, Miyagi ve ark 2000). Flavonoidlerin hücre döngüsünün ilerlemesini durdurduğu belirtilmiştir (Ren ve ark 2003). Bunu anahtar regülatörler olan Cdk'ların aktivitesini ve düzenlenmesini değiştirerek yaptıkları belirtilmiştir (Senderowicz 1999, Senderowicz 2001). Flavonoidlerin bazı kanser hücre hatlarında apoptozise neden olduğu; DNA topoizomeras I/II aktivitesinin inhibisyonunu (Markovits ve ark 1989,Wang ve ark 1999, Bailly 2000; Sukardiman ve ark 2000), reaktif oksijen türlerini (ROS) azalttığı (Lee ve ark 2002), ısıya duyarlı proteinlerin gen seviyesinde anlatımını düzenlediği belirtilmiştir (Rong ve ark 2000).

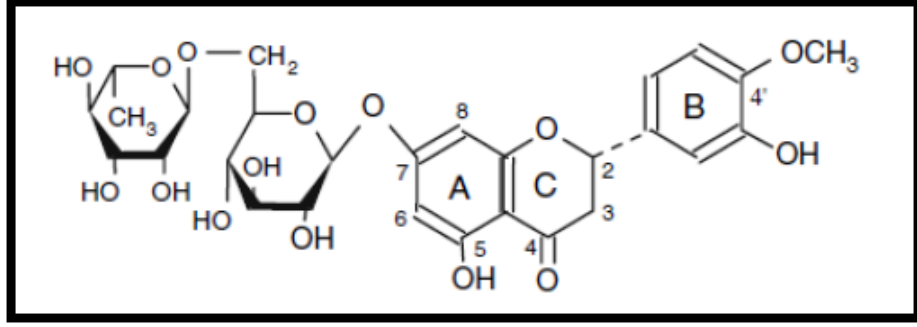
Birçok flavonoidin normal insan hücrelerine toksik etkisi bulunmamasınarağmen, kültüre edilmiş insan kanser hücre hatlarının pek çoğunun da hücrebölünmesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Hirano ve ark 1994, Kawaii ve ark 1999, Kuntz ve ark 1999, Wenzel ve ark 2000, Pouget ve ark 2001). Anti-proliferatif etkinin moleküler mekanizması da tümör oluşumuna neden olan prooksidan oluşum sürecinin baskılanması ile olduğu belirtilmiştir. Prooksidan enzimler çeşitli tümör başlatıcılar tarafından aktive edilmekte, flavonoidler ise bu enzimleri inhibe etmektedir. Özellikle ksantin oksidaz (Chang ve ark 1993; Chan ve ark 1995), COX veya LOX (Markovits ve ark 1989; Iwashita ve ark 2000; Mutoh ve ark 2000).

1.10.4. Hesperetin

Bir flavonoid olan hesperetin; flavanon hesperitin ve disakkarit rutinozdanmeydana gelmiştir. Hesperetin, portakal ve limonda en çok bulunan flavonoiddir. Bumeyvelerin kabukları ve zarlari çok yüksek konsantrasyonda hesperetin içerirler. Hesperetin, turunçgil bioflavonoidi olarak sınıflandırılır (Erlund ve ark 2001).

Çok sayıda memeli hücre sisteminde çeşitli biyolojik etkileri vardır. *in vitro* ve *invivo*çalışmalarda antimikrobiyal, antiviral, antihipertansif, hipolipidemik, antidiabetik, analjezik, antiülserojen, antialerjik, vazodilatör özelliği, antineoplastik, anti-inflamatuvar, antioksidan, analjezik, antihepatotoksik ve kemik dansite kaybının

azaltıcı etkileri gösterilmiştir. Sıçanlarla yapılan çalışmada portakal ve mandalina suyunda bulunan Hesperetinin kolon ve akciğer kanserini azaltması yanı sıra ateroskleroz, kolesterol ve trigliserid seviyesini azalttığı gösterilmiştir. Hesperetin askorbik asit sentezinde de rol oynamaktadır (Berkarda ve ark 1998, Guardia ve ark2001, Etcheverry ve ark 2008).



Şekil 1.7. Hesperetinin Kimyasal Yapısı (Etcheverry ve ark 2008).

Hesperetinin Antikarsinojenik Etkisi

Hesperetinin kuvvetli antienflamatuar özelliği yanında karsinogenezde etkinliği çalışmalarla gösterilmiştir (Berkarda ve ark 1998). Erkek fare idrar torbaları üzerinde Hesperetin/diosmin kombinasyonu kullanılarak antikarsinojenik etki incelenmiştir. Kombinasyonun, N-bütül-N-(4-hidroksibütül) nitrozamin ile indüklenen karsinogenezisi tümör başlangıç fazında 8 hafta boyunca süren tedavi sonucunda inhibe ettiği görülmüştür. Ayrıca sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada 500 ppm/kg dozda Hesperetinin karsinogenezisi inhibe ettiği tespit edilmiştir (Yang ve ark 1997). Bir başka çalışmada, tek başına Hesperetin ve diosmin/Hesperetinkombinasyonu verildiğinde, hem 4-nitrokuinolin-1-oksitle başlatılan tümör gelişiminin inhibe olduğu hem de azoksimetanla indüklenen sıçan kolon karsinogenezisine karşı kemopreventif etki geliştiği saptanmıştır. Bu sonuçlar artan hücre proliferasyonunun baskılanması sonucunda olduğu bildirilmiştir (Tanaka ve ark 1997).

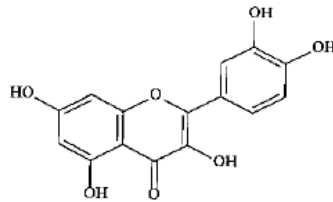
Hesperetinin aynı zamanda 4-nitrokuinolin-1-oksitle indüklenen ağız kanserini inhibe ettiği, lezyonların sayısını, dil dokusundaki poliamin seviyelerini ve hücre proliferasyonunu azalttığı bulunmuştur (Tanaka ve ark 1994). Hesperetinin insan meme ve androjen bağımlı prostat kanser hücrelerinde proliferasyonu baskıladığı saptanmıştır.(Lee ve ark 2010). Hesperetinin hepatosellüler karsinom

hücrelerinde matriks metalloproteinaz-9 gen ekspresyonunun uyardığı asetaldehiti inhibe ettiği bulunmuştur(Yeh ve ark 2009).

1.10.5. Kuersetin

Kuersetin, birçok bitki ve bitkisel besin kaynaklarında yaygın olarak bulunan bir bioflavonoidtir (Graefe ve ark 1999). Sık tüketilen yiyeceklerin çoğunda; elma, soğan, çay, kiraz ve çilek gibi yumuşak kabuklu meyveler, lahana, brokoli gibi yeşil yapraklı sebzelerde, çoğu tohumda, yemişlerde, çiçekler, kabuklar ve yapraklarda hatta medikal bitkiler; Ginkgo biloba, hypericum perforatum (St. John's Wort), Sambucus canadensis (Elder)'de ve pek çoğunda bulunmaktadır (Williamson ve Manach 1999,Häkkinen ve ark 2005).

Tüm flavonoidler, hidroksil (OH) gruplarının bağlandığı 3 halkalı molekül yapısına sahiptir. Flavonoidler besinlerde glikozit formunda bulunurlar. Yani, merkez halkaya bağlanmış bir şeker (rhamnose, glukoz, galaktoz) molekülüne sahiptirler. Kuersetin; rutin, quercetrin, isoquercetrin ve hyperoside gibi bir aglikondur, yani glikozit formdadır. Kuersetin hariç bu moleküllerin hepsi aynı yapıya sahiptir; kuersetin'in C halkasındaki hidroksil grubu bu moleküllerde, spesifik bir şeker molekülü ile yer değiştirmiş olarak bulunur (Cody 1986, 1988).



Şekil 1.8. Kuersetinin kimyasal yapısı (Han ve ark 2001).

Kuersetin'in biyolojik etkilerinin; anti-kanser, anti-viral, anti-trombotik, antiiskemik, anti-inflamatuar, anti-alerjik olduğu, arterosklerozisi ve koroner kalphastalıklarını önleyici bir etkisinin olduğu, sellüler immüniteyi stimule ettiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Grylewski ve ark 1987, Deschner ve ark 1991, Hertog ve ark 1993, Formica ve Regelson 1995).

Kuersetin'in genel etkisi, antioksidant aktivitesinden kaynaklanır. Bu özelliğisayesinde, kuersetinoksijen radikallerini savar, ksantin oksidaz'ı ve in vitro

lipidperoksidasyonunu baskılar. Tek başına veya askorbik asit ile birleşerek, deridekinörovaskülatör yapılara zarar veren oksidatif hasarın insidansını azaltır (Conguer ve ark 1998, Monograph 1998, Ratna ve Simonelli 2002).

Kuersetin'in anti-inflamatuar etkisi ise, inflamasyon oluşturan enzimler(cyclooxygenase, lipoxxygenase) üzerine baskılayıcı etkisinden ileri gelir (Monograph 1998, Lamson ve Brıgnal 2000, Gee ve Jhonson 2001).

Glukozun sorbitole dönüşümünü katalizleyen aldoz redüktaz enzimi, göz içinönemli olup, diyabetik katarakt oluşumunda rol oynar. Kuersetin insan lens aldozredüktaz'ın etkili bir inhibitörüdür (Monograph 1998, Cornish ve ark 2002).

Kuersetin ayrıca, Herpes simplex virus tip 1, polio-virus tip 1, parainfluenza virüs tip 3 ve respiratory syncytial virus (RSV) infektivitesini ve hücrel replikasyonu azaltır (Monograph 1998).

Kuersetin'in hücre büyümesini (Duthie ve ark 1997), glikolizisi (Nass-Arden ve Breitbart 1990), laktat dehidrogenaz salınımını (Volk ve ark 1997), nitrik oksit üretimini (Soliman ve Mazzio 1998), mRNA indüklenmesini bloke eden metallothionein'i (Conklin ve ark 1998) ve makromolekül sentezini inhibe ettiği gözlenmiştir (Huang ve ark 1997).

Kuersetin güçlü bir mutajendir (Bjeldanes ve Chang 1977). DNA'ya bağlandığında tek zincir kırıklarına (Fazal ve ark 1990), DNA da yeniden düzenlenmelere (Suzuki ve ark 1991) ve kromozomal hasara neden olabilmektedir (Ishidatejr ve ark 1988).

KuersetininAntikarsinojenik Etkisi

Kuersetin, hücre döngüsünü uygulanan hücrenin tipine bağlı olarak kontrol noktalarında durdurarak (Hosokawa ve ark 1992, Wei ve ark 1994) ve apoptozisi indükleyerek (Iwao ve Tsukamoto 1999, Choi ve ark 2001) malignant tümör hücrelerinin büyümesini inhibe edebilmektedir. Lösemi hücreleri (Kang ve Liang 1997), meme kanseri (Choi ve ark 2001), kolon adenokarsinoması (Salucci ve ark 2002), prostat kanseri (Kobayashi ve ark 2002) ve endometriyal kanser (Kaneuchi ve ark. 2003) gibi insan kanserlerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Reseptör kinazlar, protein kinaz C, siklin-bağımlı kinazlar (Cdk) ve MEK-ERK sinyal iletim

yoluyla etkileşebilmektedir (Ferriola ve ark 1989, Casagrande ve Darbon 2001, Nguyen ve ark 2004).

Meme, kolon, over, endometriyum, mide ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve lösemi hücre dizileri ile yapılan çalışmalarda, kuersetin'in anti-kanserojen olduğu ve sıçanlarda kimyasal olarak uyarılmış meme tümörlerinin insidansını azalttığı gösterilmiştir. Kuersetin için Faz 1 klinik denemelerine de başlanmıştır ve anti-tümör aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Guthiriel ve ark1997, Rodregs ve Grant1998, Monograph 1998, Miodini ve ark 1999).

İn vitro çalışmaların büyük bir kısmı, flavonollerin tümör hücreleri üzerine antiproliferatif etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Örneğin, kuersetin, insan gastrik kanser hücreleri, kolorektal kanser hücreleri ve lösemik T hücrelerinde, hücre siklusunun G1/S geçişini önleyerek proliferasyonu baskılamaktadır (Gee ve Jhonson 2001, Ong ve ark 2004).

Kuersetin sayesinde lösemi, melonoma ve insan kolon kanser hücrelerinin çoğalmasının baskılanması, tip II östrojen bağlama bölgeleri ile kuersetinin etkileşimine bakılarak açıklanmaktadır. Hem kuersetin hem de tamoksifen'in, laryngeal kanser hücre dizileri Hep2 ve CO-K3'ün büyümelerini baskıladığı ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir. Bu bileşenlerin sitostatik aktiviteleri, tip II östrojen bağlama bölgelerini bağlama yetenekleri ile ilişkili olabilir (Gee ve Jhonson 2001, Kang ve Liang 1997, Guthiriel ve ark 1997, Miodini ve ark 1999).

MCF-7 hücrelerinde kuersetinin, p21'i aktifleştirerek apoptozu uyardığı da gösterilmiştir (Wang ve ark 2003). Ayrıca kuersetin, in vitro östron sülfataz'ın potansiyel bir baskılayıcısıdır (Ratna ve Simonelli 2002).

Kuersetinin anti-kanser aktivitesi, protein tirozin kinazları baskılayarak, tümör hücrelerinin apoptozunu uyararak, DNA sentezi ve farklı insan karsinoma hücrelerinde hücre büyümesini baskılayarak, sinyal iletim yollarını down-regüle ve modifikasyon ederek gerçekleşir (So ve ark 1997, Rodregs ve Grant 1998, Huang ve ark 1999, Middleton ve ark 2000, Erkoç ve ark 2003).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1.Gereçler

2.1.1.Kullanılan Kimyasallar

- TGF- β 2 human recombinant: Sigma-Aldrich
- SRP3170-5UG Lot: 0908S185
- Human PAI-1 Elisa: BioVendor Lot: X13-093
- Hesperetin: Sigma-Aldrich H4125-10g (min % 95 HPLC)
- Kuersetin dihidrat: Calbiochem 551600-100mg
- DMSO: Dimetil Sülfoksit Sigma-Aldrich D2650-100ml
- Tris: Merck K38173887-500 g
- $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$: Merck A570048438-1Kg
- KH_2PO_4 : Merck A0047373 923- 1kg
- KOH: Merck B0201933 811-1 kg
- KC1: Sigma-Aldrich 12636-1 kg
- Sodyum Sitrat: Sigma-Aldrich W302600-1Kg
- $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$: Merck A875387811-1 kg
- Na_2CO_3 : Sigma-Aldrich S7795-500 g
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: Merck A897690 739-1 kg
- Folinciocalteu's fenol: Merck HC140610-1 lt
- Cell Lysis Buffer Solution: Merck MSP010065
- NaOH: Sigma-Aldrich S8045- 500 g
- BSA (Bovin Serum Albumin): Sigma-Aldrich A9418-10 g
- Triton X-100: Sigma-Aldrich-X100- 100 ml
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) : Biological Industries Kibutz Haemek Israel cat no:01-l A (500 ml)
- Penisilin-Streptomisin: Penicillin-Streptomycin Solution 10,000 units/ml Penicil (BIO-IND,BI03-031-1C) (20 ml)
- Glutamin-L-glutamin Solution, 29.2mg/ml in Saline) (200mmol) (BIO.IND,BI03-020-1B) (100 ml)
- Fetal Bovin Serum (FBS): Foetal Bovine Serum (FBS) European Grade Heat Inactivated (BIO-IND,BI04-127-1B) (100ml)

- Phosphate Buffered Saline(PBS): Biological Industries Kibutz Haemek Israel Cat No:02-1A(500 ml)
- Trypsin-EDTA: Trypsin EDTA, Solution C (0.05%) EDTA (0.02%), with Phenol(BIO. IND,BI03-053-1B) (100 ml)
- Plasminogen:human plasma derived, R&D systems Cat No:1939-SE (200 µg)
- Rekombinant Human u-Plasminogen Activator (uPA)/Urokinase: R&D systems Cat No:1310-SE (10µg)
- Substrat: Instrumentation Laboratory Company-Bedford, Chromogenix Cat No: S2251(25 mg)

2.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar gereçleri

- Laminar akımlı kabin: Steril VBH Compact
- Santrifüj: Sigma 3K30
- Işık mikroskobu: LeicaDmiled (invertedmicroscop)
- Buzdolabı (+4 °C ve -20°C): ALTUS AL 302
- -40°C buzdolabı: SANYO MDF-U425
- -80°C buzdolabı: SANYO MDF-U5186S
- Azot tankı: LS 750 Las Systems Taylor-Wharton
- xCELLigence® Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Cihazı: Roche Diagnostics GmbH, Penzbeerg, Germany
- E-PLATE 16: ACEA biosciences, Inc. Cat no: 05469813001
- Sıcak su banyosu: Wise Bath fuzzy systems
- Thoma lamı: IsoLab, Tiefedepthprofendeur 0,200mm
- CO₂ inkübatörü: SANYO O₂/CO₂ INCUBATOR MCO-175M
- Steril filtre: 0,45µm Lot No: N0403113103
- Flask: TC Flask,75 cm²,Canted Neck, Anti-Tip, Plug Seal, Sterile (CORNING,CC430720)
- Falcon tüp: 352098 Blue max™ 50ml polypropyleneconicaltube 30x115mm style
- Kriyo tüp: REF:C12ARBIPS

- Serolojik pipet: Corning® Costar® Stripette® serological pipettes, bulkpacked(5 ve 10 ml)
- Mikropipet (1000, 200, 10µl): Gilson
- Spektrofotometre: Perkin Emler Lambda 25 UV/Vis Spectrometer
- ELISA: Kayto RT-2100-C Microplate Reader

2.2. Metod

2.2.1. Hücre Kültürü

TGF- β , kuersetin ve hesperetinın meme kanseri hücresi proliferasyonundaki etkilerinin gözlemlenmesi açısından insan meme kanseri hücresi MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7 hücreleri, 1970 yılında 69 yaşındaki beyaz bir kadın hasta memesinden izole edilmiş meme kanseri hücre serisidir. MCF-7 hücreleri epitelyal kökenli, östrojen reseptörü pozitif ve invazif yeteneği azdır. MCF-7 hücre serisi On Dokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyokimya A.B.D. Başkanı Prof. Dr. Abdülkerim Bedir tarafından hediye edilmiştir.

MCF-7 hücreleri nemlendirilmiş, %5 CO₂ içeren ve 37°C'lik atmosferde, %10 FBS ve %1 PSG içeren DMEM besiyerinde kültüre edilmiştir.

Hücrelerin pasajlanması 5-6 günde bir olacak şekilde, tripsin-EDTA ile kaldırılması ve 2500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek 75 cm²'lik flasklarda besi yerine alınması şeklinde yapılmıştır.

Hücre stoklanması ise tripsinlenen hücrelerin, santrifüjden sonra besiyerinin uzaklaştırılması, %10 DMSO ve %90 FBS içeren solüsyonla karıştırılması ve 1,5 ml'lik kriyo tüplere alınarak -196°C'de sıvı azot tankına konularak saklanması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Hücreler, -20°C'de 1 gece bekledikten sonra -80°C'ye alınmıştır. Bu şekilde depolanan hücreler gerektiğinde hızlıca 37 °C'de çözülüp, üzerine 3 ml besi yeri ilave edilerek santrifüj edilmiştir.

Süpernatant atılıp, hücre pelleti tekrar 1 ml besi yerinde çözülerek, petri kabında taze besi yeriyle pasajlanmıştır.

Hücre sayımı için, tripsinlenen hücreler 2500 rpm'de 3 dk santrifüj edildikten sonra kalan hücre pelleti, 1-2 ml besi yerine alındı. Karıştırılarak 10'ar µl Thoma lamının alt ve üst kısımlarına aktarılmış, Thoma lamının alt ve üst bölümlerinde

bulunan 16 küçük karede hücre sayımı yapılmış ve ortalamaları alınarak hesaplanmıştır.

2.2.2. Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemi

Hücre canlılığının ölçümü için birçok metot vardır. Bunlardan en yaygın olanları MTT, XTT ve WST metotlarıdır. Bizim kullandığımız metot ise, istediğimiz zaman aralıklarında online veri veren xCELLigence® sistemidir.

xCELLigence®sistem (Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemi), hücre m n t rizasyonunun belirlenmesi için hassas, kantitatif, dinamik ve e  zamanlı çalışan bir sistemdir. Böylece diğer metotlara göre pek çok manipülasyon azaltılmış ve anlık veri alınabilen bu sistemde bileşik ya da renk girişimine sebep verebilecek şeylerden kaçınılmıştır. Elektrik empedans okuma yoluyla e  zamanlı olarak hücre canlılığı ölçümüne izin verir. Sistem; elektronik sensör analizörü, cihaz 16 ya da 96"lık e-platelerden ve cim-plate ( ekil 2.1.) olmak üzere üç bileşeni kapsar.



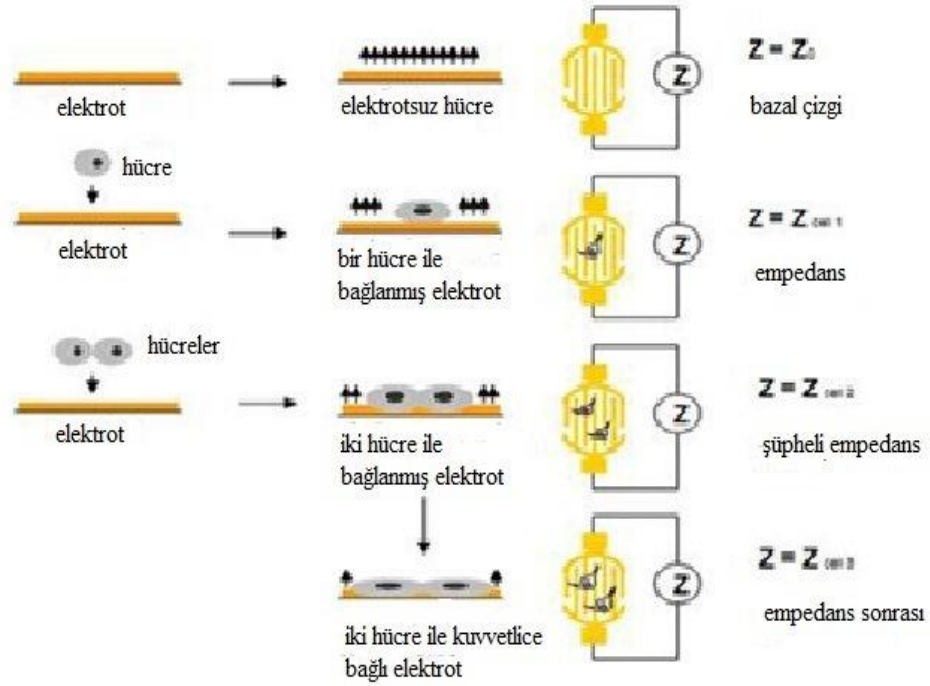
Şekil 2.1. Elektronik sensör analizörü, cihaz, E-plate 16 ve cim-plate 16 (<http://www.acebio.com./productlist 2>).

$$CI = \max (i= 1 \dots N) ((R(hücre(f_i)) / (R_b(f_i)-1))$$

N= Empedansı  l  len frekans noktalarının sayısıdır.

R(hücre)= Hücrenin bulunduğu kuyunun hücre elektrot empedansıdır.

R_b = Medyumun bulunduğu kuyunun arka plan empedansıdır.



Şekil 2.2. Hücrelerin elektrik empedansının ölçümü(<http://www.rocche.com>).

Plateler, kuyu tabanlarına gömülmüş uygun geometriye sahip mikro elektrotlardan oluşur. Bunun tersine diğer empedans sensörleri kuyunun yüzey alanının %80'ini kaplar. Bu sistem hücre sensör elektrot merkezli olarak geliştirilmiştir. İnkübatör içinde bulunan cihaza plateler yerleştirilir ve software kontrolü altında, sensör analizörü ölçüm için kuyuları otomatik olarak seçer. Bu sistem e-platelerdeki hücrelerin bulunduğu kuyuların altında, birleşik haldeki mikro elektrotlar üzerindeki elektrik empedansını ölçer (Şekil 2.2.). Önce e-plateteki kuyular boşken sistemden geçen elektrik akımı, boş kuyucuğun empedansına eşit olur. Hücreler elektrotlara yerleşmeye başladığından itibaren ise sistemden geçen akım hücrelerin elektrik empedansına eşit olur. Sürekli olarak empedans ölçümü yapar. Empedans verisi bilgisayara gönderilir ve software tarafından analiz edilir.

RTCA DP cihazının önemli özelliği 16-kuyucuklu hücre invazyon ve migrasyon (CIM) plate'ini çalıştırmaktadır ki cim-plate, modifiye edilmiş Boyden kamarasının gerçek zamanlı hücre invazyon ve migrasyonunun otomatik görüntülenmesini sağlamaktadır.

xCELLigence Sistemi, gerçek zamanlı invaziv olmayan bir şekilde hücresel durumu ölçmek için bir empedans okuma kullanır (Solly 2004 ve Xi ve ark 2008).

2.2.3. Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Hücre Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi

Hücre büyüme eğrisinin belirlenmesi deneyinde önce 100'er µl DMEM, 16 kuyulu e-platelerin (mikro elektrot içeren özel hücre kültürü kapları) her bir kuyusuna koyuldu ve DMEM'in yarım saat kuyulara yerleşmesi beklendi. Ardından hücre sayımı yapıldı ve farklı sayılarda (5 000, 10 000, 15 000, 20 000, 25 000, 30 000, 40 000, 50 000) hücre karışımı hazırlandı. Farklı sayılardaki MCF-7 hücreleri, önceden içine DMEM koyduğumuz kuyulara 100'er µl olacak şekilde eklendi. Hücrelerin besiyeri 72. saatte değiştirildi. Hücre sayısındaki değişiklikler, e-platelerde 196 saat boyunca her 15 dk'da bir inkübatör içindeki xCELLigence® cihazı ile gözlemlendi. Buradan MCF-7 hücrelerinin proliferasyon olduğu ideal hücre sayısını bulup sonraki deneyler bu sayıyla çalışıldı.

Cell Indeks (CI), elektrot içeren kuyucuklardaki hücre durumunun niceliksel ölçümüdür. Aynı fiziksel şartlar altında, elektrotlar üzerine hücre yapışmasındaki artan sayı, daha büyük CI değerlerine neden olur. Ayrıca hücre sayısı aynı kaldığı takdirde, hücre morfolojisinde bir değişim CI'da değişikliklere yol açar. Belirli bir zaman noktasında normalize edilmiş CI, referans bir zaman noktasındaki CI'nın, zaman noktasındaki CI'ya bölünmesi ile hesaplanır

2.2.4. TGF-β' nın MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi

TGF-β, 10⁴ ng/ml olacak şekilde distile suda çözülüp, 0,2 µm çaplı steril filtreden geçirilerek -80°C'de saklandı. Diğer dozlar hazırlanmış olduğumuz bu TGF-β'dan dilüsyon yapılarak hazırlandı.

Hücre büyüme eğrisinin belirlenmesinde yapıldığı gibi, 16 kuyulu e-platelere önce 100'er µl DMEM koyuldu, ardından hücre sayımı yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 10.000 hücre olacak şekilde hücre eklendi. MCF-7 hücreleri, belirlenmiş olan TGF-β'nın doz grupları (0,1, 1, 5, 10, 500 ng/ml nM) ile 24 saat sonra muamele edildi ve bu işlem her 24 saatte bir tekrarlandı. Hücre sayısındaki değişiklikler, 114 saat boyunca her 15 dk'da bir inkübatör içindeki xCELLigence® cihazı ile gözlemlendi.

2.2.5. Hesperetinin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi

Hesperetin, 10^{-3} M olacak şekilde %0,1'lik DMSO'da çözüldü, 0,2 µm çaplı steril filtreden geçirilerek -40°C 'de saklandı. Diğer dozlar hazırlamış olduğumuz bu hesperetinden dilüsyon yapılarak ayarlandı.

Hücre büyüme eğrisinin belirlenmesinde yapıldığı gibi, 16 kuyulu e-platelere önce 100'er µl DMEM koyuldu, ardından hücre sayımı yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 10 000 hücre olacak şekilde hücre eklendi. MCF-7 hücreleri, belirlenmiş olan hesperetinin doz grupları (10, 50, 100, 125, 150, 175 µM) ile 24 saat sonra muamele edildi ve bu işlem her 24 saatte bir tekrarlandı. Hücre sayısındaki değişiklikler, 168 saat boyunca her 15 dk'da bir inkübatör içindeki xCELLigence® cihazı ile gözlemlendi.

2.2.6. Kuersetinin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi

Kuersetin dihidrat, $2 \cdot 10^{-2}$ M olacak şekilde %0,1'lik DMSO'da çözüldü, 0,2 µm çaplı steril filtreden geçirilerek -40°C 'de saklandı. Diğer dozlar hazırlamış olduğumuz bu kuersetinden dilüsyon yapılarak ayarlandı.

Önce 16 kuyulu e-platelere 100'er µl DMEM koyuldu, ardından hücre sayımı yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 10 000 hücre olacak şekilde hücre eklendi. MCF-7 hücreleri, belirlenmiş olan kuersetinin doz grupları (125, 150, 175, 200, 225, 250 µM) ile 48 saat sonra muamele edildi ve bu işlem her 48 saatte bir 40 tekrarlandı. Hücre sayısındaki değişiklikler, 216 saat boyunca her 15 dk'da bir inkübatör içindeki xCELLigence® cihazı ile gözlemlendi.

2.2.7. Hücrelerin Protein Analizi

Hücrelerin protein miktarları analizi Lowry (Lowry 1951) metodu kullanılarak yapıldı. Buna göre;

- ✓ A reaktifi; 1 g sodyum-potasyum tartarat ve 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı.
- ✓ B reaktifi; 20 g Na_2CO_3 ve 4 g NaOH bir litre distile suda çözülerek hazırlandı

- ✓ C reaktifi; 50 ml B reaktifi içerisine 1 ml A reaktifi eklenerek hazırlandı.

Protein analizinde standart olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanıldı. BSA'nın stok çözeltisi 1 mg/ml olacak şekilde distile suyla hazırlandı. Diğer standartlar (0,025-0,05-0,1-0,125-0,15-0,2-0,3 mg/ml) da, hazırlanan bu çözeltiden distile suyla dilüsyonlar yapılarak hazırlandı. Çalışma aralığına uygun konsantrasyonda hazırlanan 0,2 ml'lik numune çözeltileri, kör ve protein çözeltilerinin her birine 1 ml C reaktifi katıldı (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Protein ölçümünde uygulanan 1. İşlem

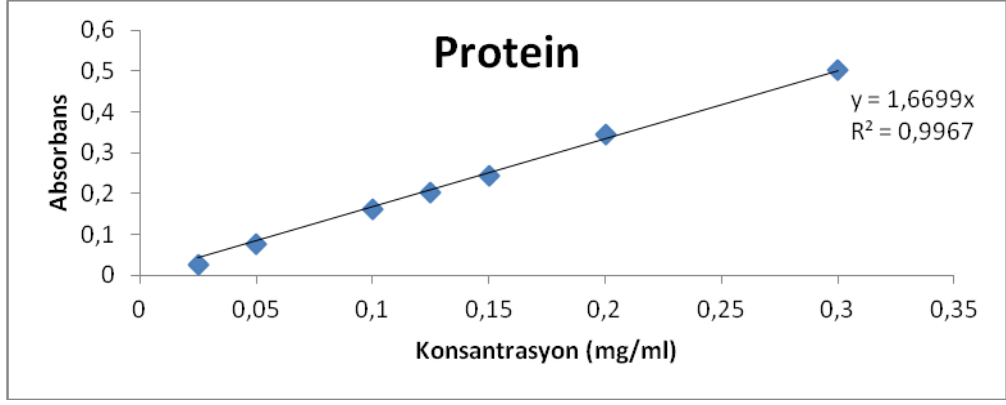
	Numune	Kör	Standart
Numune	200 µl	-	
Standart	-	-	200 µl
C reaktifi	1 ml	1 ml	1 ml

Çözeltiler vortekslenerek 10 dakika beklendi. Daha sonra çözeltilere 0,1 ml Folin reaktifi eklenerek (Çizelge 2.2.) tekrar vortekslenerek 30 dakika karanlıkta bekletildi. Ardından 700 nm'de köre karşı spektrofotometre cihazında tüm numunelerin absorbansları ölçüldü. Son olarak standart eğri grafiği hazırlanarak örneklerdeki protein derişimi hesaplandı.

Çizelge 2.2. Protein ölçümünde uygulanan 2. İşlem

	Numune	Kör	Standart
Folin reaktifi	100 µl	100 µl	100 µl

Hücre lizatlarındaki ve BSA standartlarındaki proteini belirlemek için spektrofotometrede 700 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Farklı konsantrasyonlardaki BSA standartlarına ait standart eğri ve doğrusallık denklemi şekil 2.3.'de gösterilmektedir. Elde edilen bu standart eğriye göre hücrelerin protein miktarları bulunmuştur.



Şekil 2.3. Protein standartlarına ait standart eğri ve doğrusallık denklemi.

2.2.8. MCF-7 Hücre Hattında uPA Aktivitesinin Ölçülmesi

Hücrelerin uPA aktivitesinin ölçülmesinde Prof. Dr. Ali ÜNLÜ hocamızın tezindeki metodu kısmen değiştirilerek geliştirildi. Bu metottaki reaktifler;

- ✓ A reaktifi; 0,5 M Tris ph=7,4 10 ml distile suda çözülerek hazırlandı daha sonra 1:10 oranında distile suyla dilue edildi.
- ✓ B reaktifi; %20'lik 1 ml BSA distile su içerisinde hazırlandıktan sonra içerisine 40 ml A reaktifi eklenerek hazırlandı.
- ✓ C reaktifi; 25 mg plazminojen aktivatör substratı (S-2251) 10 ml distile suda çözülerek hazırlandı.
- ✓ D reaktifi; 1,7 ml B reaktifi içerisine 0,5 ml C reaktifi eklenerek hazırlandı.
- ✓ E reaktifi; 10 µg uPA standardı 1 ml PBS ile çözülerek hazırlandı.
- ✓ F reaktifi; 200 µg plazminojen 1 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

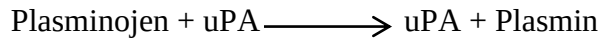
uPA stok standardından 10-50-100-500-1250-2500-5000 ng/ml konsantrasyonlarında olacak şekilde distile suyla hazırlandı. uPA analizinde, önceden hazırlanmış kontrol, TGF-β, Kuersetin ve hesperetinin uygulanan hücre lizatlarından ve standartlardan 10 µl alınarak 31 µl belirlenen plasminojen miktarından 8 µg/ml ekledikten sonra üzerine 150 µl A reaktifinden konuldu. 2 saat 37 °C inkübatörde beklettikten sonra 150 µl C reaktifi eklendi ve hafifçe çalkalandı. 6 saat 37 °C inkübatörde beklettikten sonra 405 nm'de tüm numunelerin absorbansı

ELISA cihazında ölçüldü. Bu numuneler triplicate çalışılmıştır. Son olarak standart eğri grafiği hazırlanarak numunelerdeki uPA derişimi hesaplandı. Sonuçlar mg protein başına oranlanarak verildi.

10µl std veya numune
+
31µl plasminogen
+
150µl Tris-HCl
↓ 2 saat inkübasyon
150µl substrat
↓
405 nm'de okuma

Çalışmanın prensibi;

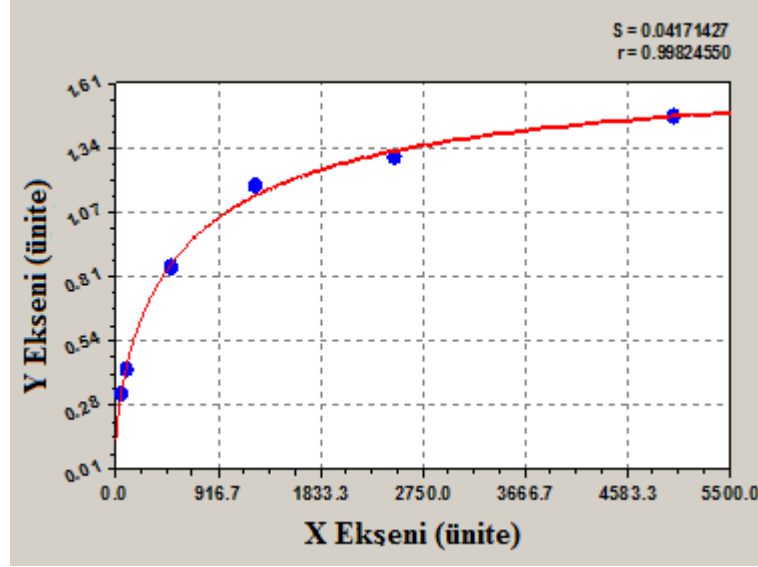
Reaksiyon 1;



Reaksiyon 2;



Plasmin kromojenik substratı hidrolize ederek, kromoforik grup pNA'yı serbest bırakır. Daha sonra oluşan sarı renk fotometrik olarak 405 nm'de okutulur. pNA oluşum hızı, yani 405 nm'deki absorbansdaki artış, enzimatik aktivite ile orantılıdır. uPA'ya ait kalibrasyon ve doğrusallık çalışmaları için 10-50-100-500-1000-2500-5000 ng/ml konsantrasyonlarında uPA standartlarına ait standart eğri ve doğrusallık denklemi şekil 2.10.'da gösterilmiştir. Hücrelerin uPA değerleri ELISA cihazında 405 nm'de ölçülmüş ve enzim aktivitesi için uPA'nın tek tek protein sonuçlarına oranlanmasıyla bulunmuştur. Bulunan bu uPA standartlarına ait grafik, Şekil 2.4.'de verilmiştir.



Şekil 2.4. uPA'nın kalibrasyon ve doğrusallık eğrisi

2.2.9. MCF-7 Hücre Hattında PAI-1 Düzeyinin Ölçülmesi

BioVendor human PAI-1 elisa test prosedürüne uygun bir şekilde hücrelerin PAI-1 düzeyi ölçüldü. PAI-1 analizinde kullanılan reaktifler;

- ✓ Wash Buffer concentrate; 1:20 oranında distile suyla dilue edildi.
- ✓ Assay Buffer concentrate; 1:20 oranında distile suyla dilue edildi.
- ✓ Biotin-Conjugate; 1:100 oranında Assay Buffer ile dilue edildi.
- ✓ Streptavidin-HRP; 1:200 oranında Assay Buffer ile dilue edildi.
- ✓ Human PAI-1 Standard; 10^4 pg/ml olacak şekilde 0.29 ml distile su ile çözüldü.

PAI-1 stok standardı assay buffer ile seri dilüsyon yapıldı. 78-156-313-625-1250-2500 pg/ml konsantrasyonlarında olacak şekilde standartlar hazırlandı.

PAI-1 analizinde; plate 2 kez Wash Buffer ile yıkama yapıldıktan sonra kör ve standartların çalışılacağı kuyucuklara 100'er µl, Assay Buffer eklendi. Standartlardan 100'er µl kuyucuklara pipetlenirken kontrol, TGF-β, hesperetin ve Kuersetin uygulanmış hücre lizatlarının çalışılacağı kuyucuklara Assay Buffer eklemeden 100'er µl numunelerden pipetlendi. Tüm kuyucuklara 50 µl Biotin-conjugate koyuldu. Daha sonra oda sıcaklığında (18-25°C) 2 saat shakerda inkübasyona bırakıldı. Wash Buffer ile 3 kez yıkama yapılan tüm kuyucuklara 100 µl streptavidin-HRP eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında (18-25°C)

çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Wash Buffer ile 3 kez yıkama yapılan tüm kuyucuklara 100 µl TMB substrat solusyon eklendi. 10 dk karanlık bir ortamda (18-25°C) inkübasyona bırakıldı. Tüm kuyucuklara 100 µl stop solusyonu eklenip işlemler sonlandırılarak 450 nm de tüm numunelerin absorbanşı ELISA cihazında ölçüldü. Bu numuneler üç kez çalışılıp olup sonuçlar mg protein başına oranlanarak verildi.

2 kez Yıkama Tamponu ile yıkama

↓

100 µl Tahlil Tamponu + (100 µl std veya 100 µl numune)

↓

50 µl Biotin eşleniği

↓ 18-25°C'de 2 saat çalkalayıcıda inkübasyon

Yıkama Tamponu ile 3 kez yıkama

100 µl streptavidin-HRP

↓ 18-25°C'de 1 saat çalkalayıcıda inkübasyon

Yıkama Tamponu ile 3 kez yıkama

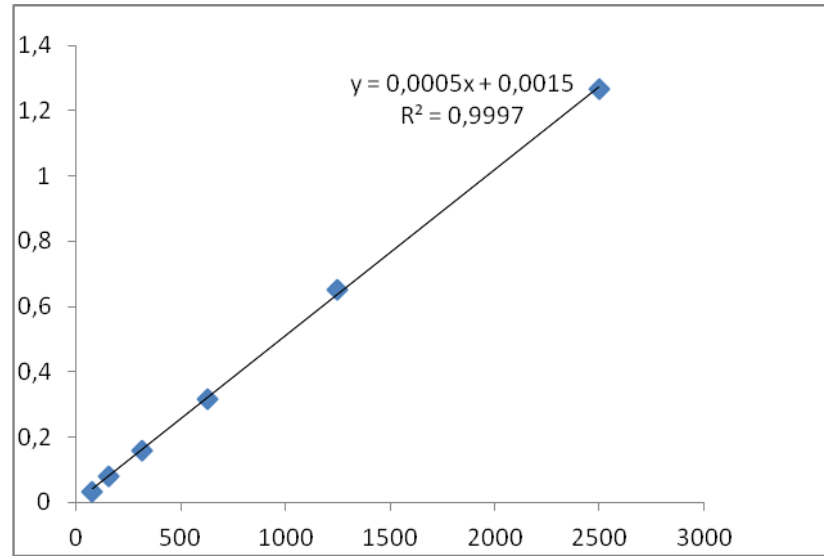
100 µl TMB Substrat Solusyon

↓ 10 dk karanlık bir ortamda (18-25°C) inkübasyon

100 µl durdurma solusyonu

↓ 450 nm'de okutma

PAI-1'a ait kalibrasyon ve doğrusallık çalışmaları için 78-156-313-625-1250-2500 pg/ml konsantrasyonlarında PAI-1 standartlarına ait standart eğri ve doğrusallık denklemi şekil 2.5'de gösterildi. Hücrelerin PAI-1 değerleri ELISA cihazında 450 nm'de ölçülmüş ve enzim aktivitesi için PAI-1'nın tek tek protein sonuçlarına oranlanmasıyla bulundu.



Şekil 2.5.PAI-1'nin kalibrasyon ve doğrusallık eğrisi

2.3. İstatistik Analizleri

Hesperetin ve Kuersetin ile muamele edilen MCF-7 hücre serisi proliferasyon verileri, önce normal dağılım açısından incelenmiş ve normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun üzerine, doz grupları arasında ve zamanlar arasındaki farkların etkileşimli olarak incelenmesi için tekrarlı ölçümlerde varyans analizi yapılmıştır. Bunun sonucunda doz grupları ile zaman arasında etkileşim önemli ($P = 0.001$) çıktığından sonraki analizler, her zamanda gruplar arası fark ayrı ayrı tek yönlü varyans analizi ve Duncan testi ile her gruptaki zamanlar arası fark da yine ayrı ayrı eşleştirilmiş t testi ile analiz edildi.

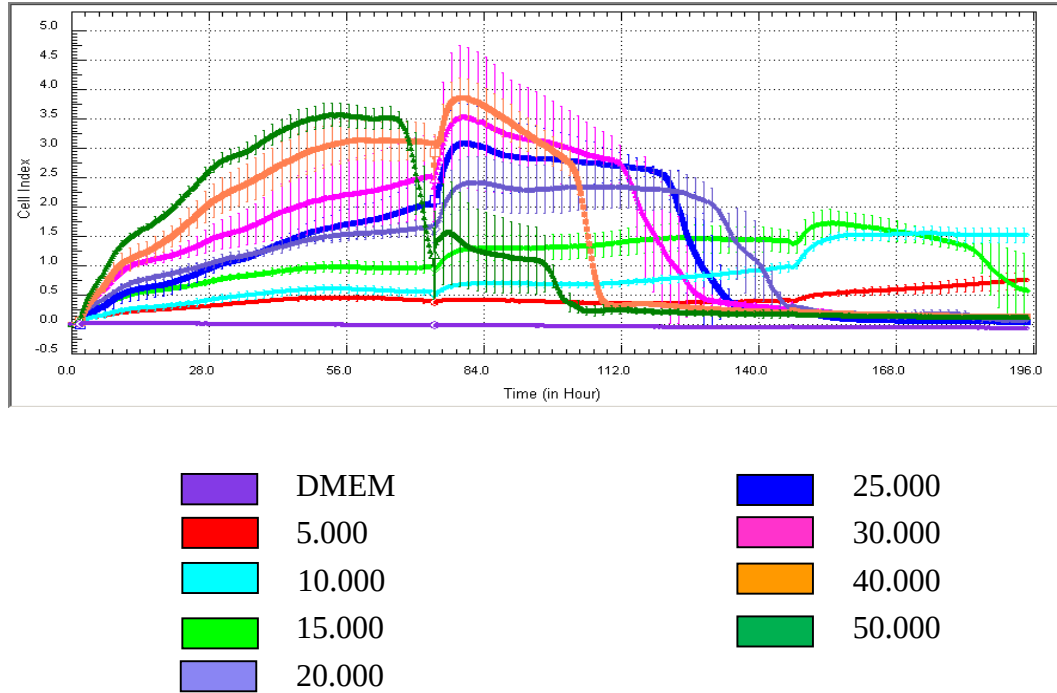
TGF- β , ile muamele edilen MCF-7 hücre serisi proliferasyonu, tüm uPA aktivitesi ve PAI-1 düzeyi verileri normal dağılıma uyup uymadığının incelenmesinde Kolmogorov-Smirnov testi yapıldı. Buna göre verilerin normal dağılım gösterdiği görüldü. Bunun üzerine doz grupları ve zamanlar arasındaki farklılıkların etkileşimli olarak incelenmesi için tekrarlı ölçümlerde One Way Anova varyans analizi yapıldı. Her doz grubundaki zamanlar açısından farklılık Tukey testi ile analiz edildi. Farklı zaman aralıklarındaki uPA aktivitesi, PAI-1 analizi verileri "t" testi ile değerlendirilmiştir. İstatistikî farklılık için $p < 0,05$ kabul edilmiştir. İstatistik analizler SPSS 20.0 paket programında yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Çalışılacak Hücre Sayısının Optimizasyonu

Şekil 3.1.'de, 5 000, 10 000, 15 000, 20 000, 25 000, 30 000, 40 000, 50 000 gibi farklı sayılardaki MCF-7 hücrelerinin büyüme eğrileri görülmektedir. Hücrelerin besiyeri 72. saatte değiştirilmiştir. Grafikteki ani çıkış ve inişler hücrelerin besiyerinin değiştirilmesinden kaynaklanmaktadır.

Şekil 3.1.'de görüldüğü gibi 30 000 ve üstü sayıdaki hücrelerin, diğer sayıdaki hücelere göre daha erken bir zaman diliminde ölmeye başladığı gözlemlendi. MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunun devam ettiği hücre sayıları 10 000 ve 15 000 olarak tespit edildi. Yine uygulanacak maddelerin etkili olduğu doz aralığı tespit edilirken uygulanan maddelerin etkilerinin geç ortaya çıkması nedeniyle çalışmalar 10 000 hücre sayısı ile gerçekleştirildi.

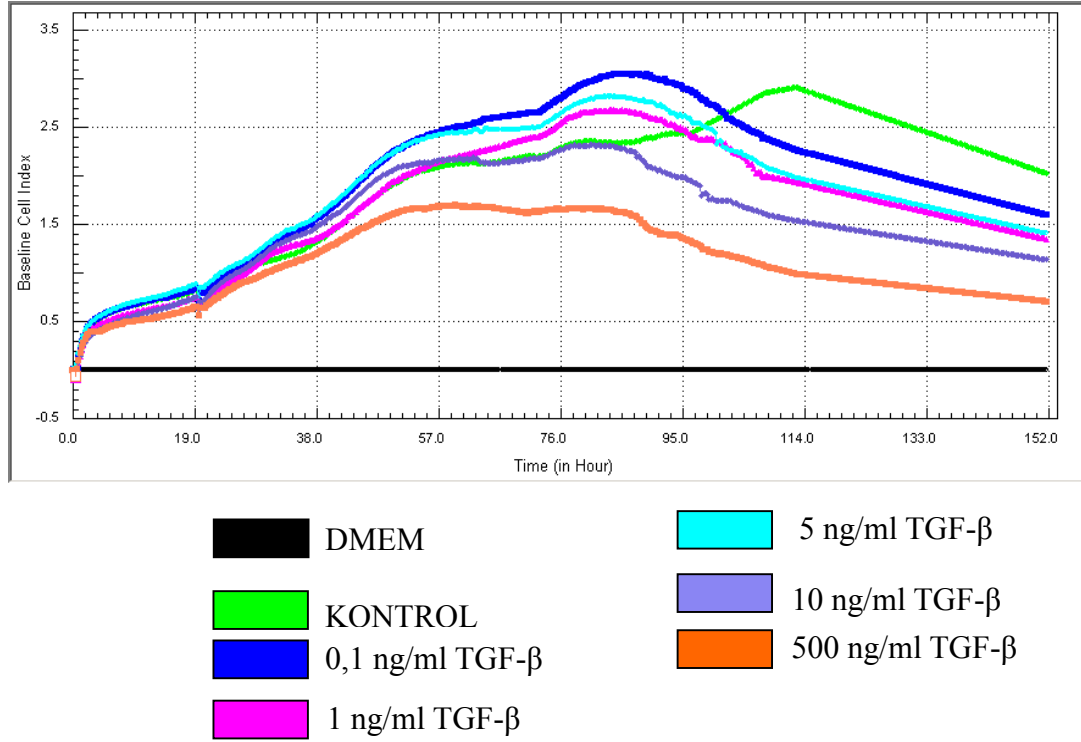


Şekil 3.1. Farklı sayılardaki MCF-7 hücrelerinin 196 saatlik büyüme eğrileri.

3.2. TGF- β 'nın MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi

TGF- β 'nın MCF-7 hücre büyümesine doz ve zaman bağımlı etkisi, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle analiz edildi. TGF- β 'nın 0,1, 1, 5, 10, 500 ng/ml nM konsantrasyonlarında hücre büyüme oranları, 114 saat boyunca

izlendi. Şekil 3.2.'de anlaşıldığı gibi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TGF- β 'nın, hücreleri doz ve zamana bağımlı olarak inhibe ettiği görüldü.



Şekil 3.2.TGF- β 'nın MCF-7 hücrelerine 114 saat boyunca etkisi

TGF- β 'nın MCF-7 hücrelerine etkisine ait sonuçlar, farklı zamanlarda doz grupları arası karşılaştırma Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Doz grupları arasındaki fark sırasıyla 64., 90. ve 114. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Doz grupları arasında anlamlı bir fark olup olmadığı, kontrol grubuna göre ayrı ayrı değerlendirildiğinde; 64. ve 90. saatte, kontrol ile 500 ng/ml nM doz grubu arasında ve 114. Saatte kontrol ile sırasıyla 0,1, 1, 5, 10, 500 ng/ml nM doz grupları arasında ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar doz faktörü ile zaman faktörü etkileşiminden dolayı, doz grupları arasındaki farklılığın zamandan zamana değiştiğini göstermiştir.

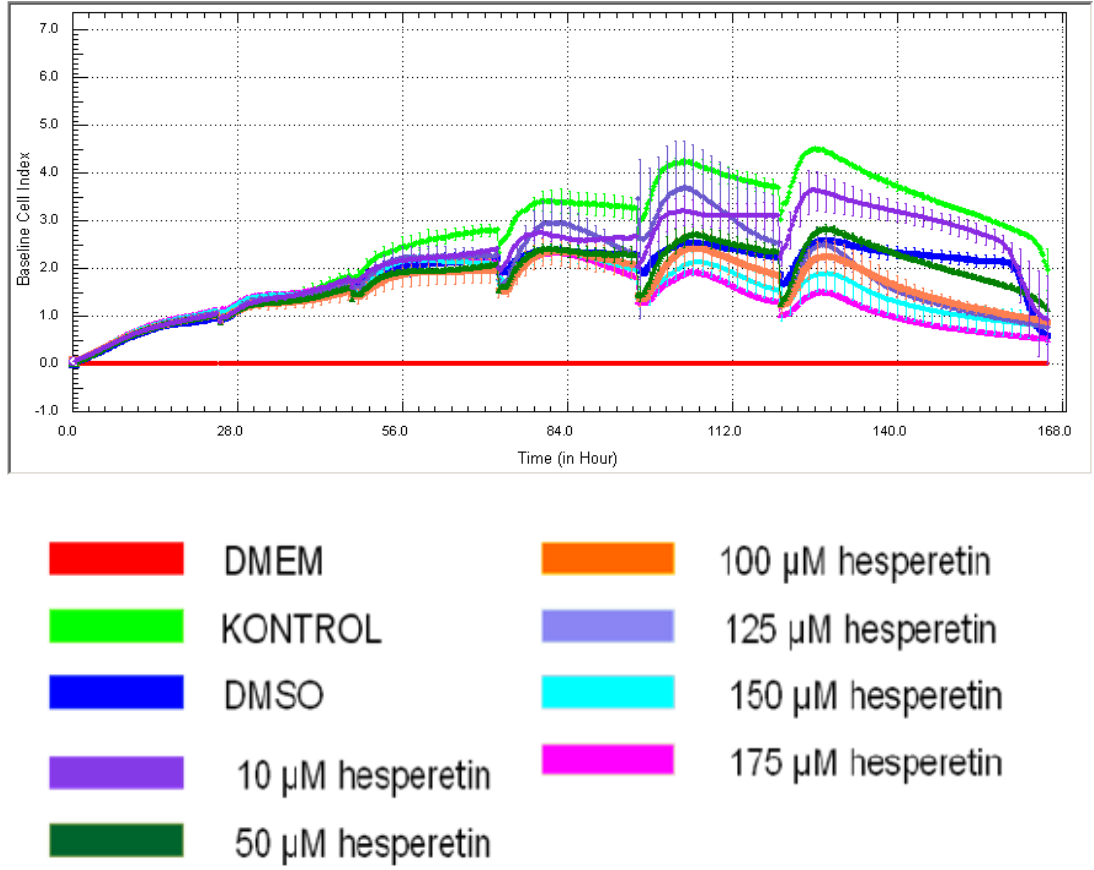
3.3. Hesperetinin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Hesperetinin MCF-7 hücre büyümesine doz ve zaman bağımlı etkisi, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle analiz edildi. Hesperetinin 10, 50, 100, 125, 150, 175 μ M konsantrasyonlarında hücre büyüme oranları, 168 saat

boyuncaizlendi. Şekil 3.3’de de anlaşıldığı gibi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hesperetinin, hücreleri doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiği görüldü.

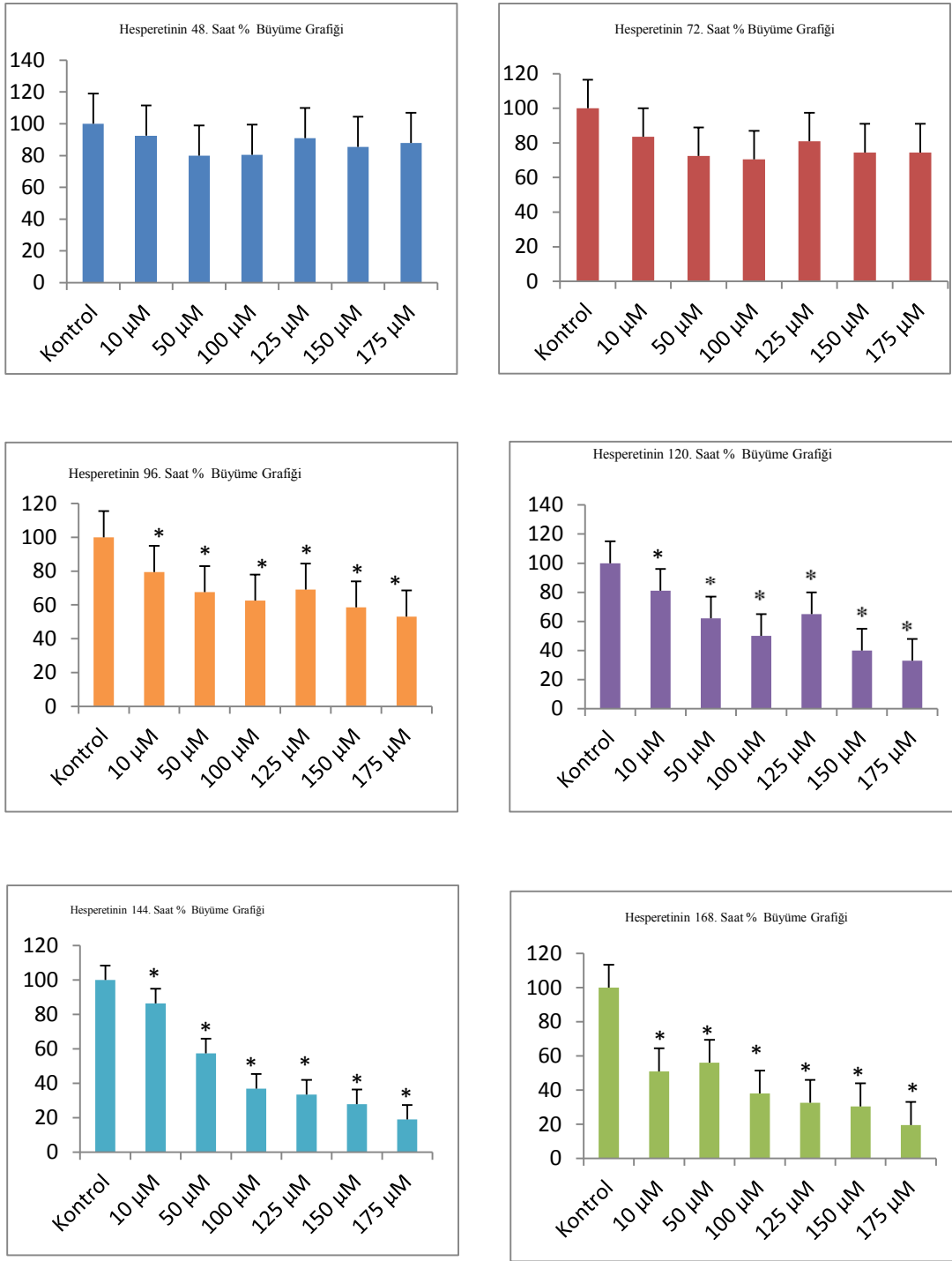
Çizelge 3.1.TGF- β ’nın doz gruplarının farklı zamanlarda karşılaştırılması.

Doz grupları	Hücre İndeksi 40.Saat (Ort $\pm$ sd)	Hücre İndeksi 64.Saat (Ort $\pm$ sd)	Hücre İndeksi 90.Saat (Ort $\pm$ sd)	Hücre İndeksi 114.Saat (Ort $\pm$ sd)
Kontrol	1,38 $\pm$ 0,18	2,19 $\pm$ 0,16	2,45 $\pm$ 0,12	2,91 $\pm$ 0,43
0,1ng/ml	1,63 $\pm$ 0,05	2,44 $\pm$ 0,10	2,93 $\pm$ 0,03	2,27 $\pm$ 0,24*
1 ng/ml	1,50 $\pm$ 0,10	2,24 $\pm$ 0,07	2,82 $\pm$ 0,30	1,91 $\pm$ 0,20*
5 ng/ml	1,49 $\pm$ 0,20	2,19 $\pm$ 0,22	2,68 $\pm$ 0,19	2,04 $\pm$ 0,18*
10 ng/ml	1,54 $\pm$ 0,03	2,15 $\pm$ 0,05	2,37 $\pm$ 0,39	1,44 $\pm$ 0,13*
500 ng/ml	1,34 $\pm$ 0,10	1,79 $\pm$ 0,17*	1,51 $\pm$ 0,20*	1,05 $\pm$ 0,18*



Şekil 3.3. Hesperetinin MCF-7 hücrelerine 168 saat boyunca etkisi

Hesperetinin MCF-7 hücrelerine etkisine ait istatistiksel sonuçlar; farklı zamanlarda dozlar arası karşılaştırması şekil 3.4’de verilmiştir. Şekil 3.4 incelendiğinde, ilk 48 ve 72. saatlerde, doz grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Doz grupları arasındaki fark, 96. saatte başlamak üzere giderek artan düzeylerde ($P<0,05$; $P<0,001$), sonraki zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 96. saatte doz grupları arasındaki farka bakıldığında, en yüksek değeri 2,90 ile kontrol grubu, en düşük değeri 1,54 ile 175 µM doz grubu göstermişlerdir. DMSO ve 10 µM grupları kontrol grubuna benzerken, diğer doz grupları kontrolden farklı bulunmuştur. Ayrıca, 175, 150, 125, 100 ve 50 µM doz grupları birbirine benzer bulunmuştur. Sonraki zaman dilimlerinde, istatistiksel anlamlılık yönünden benzer durum görülse de, zaman faktörü ile doz faktörü etkileşiminden dolayı, doz grupları arasındaki farklılıkların derecesi zamandan zamana değişmiştir.

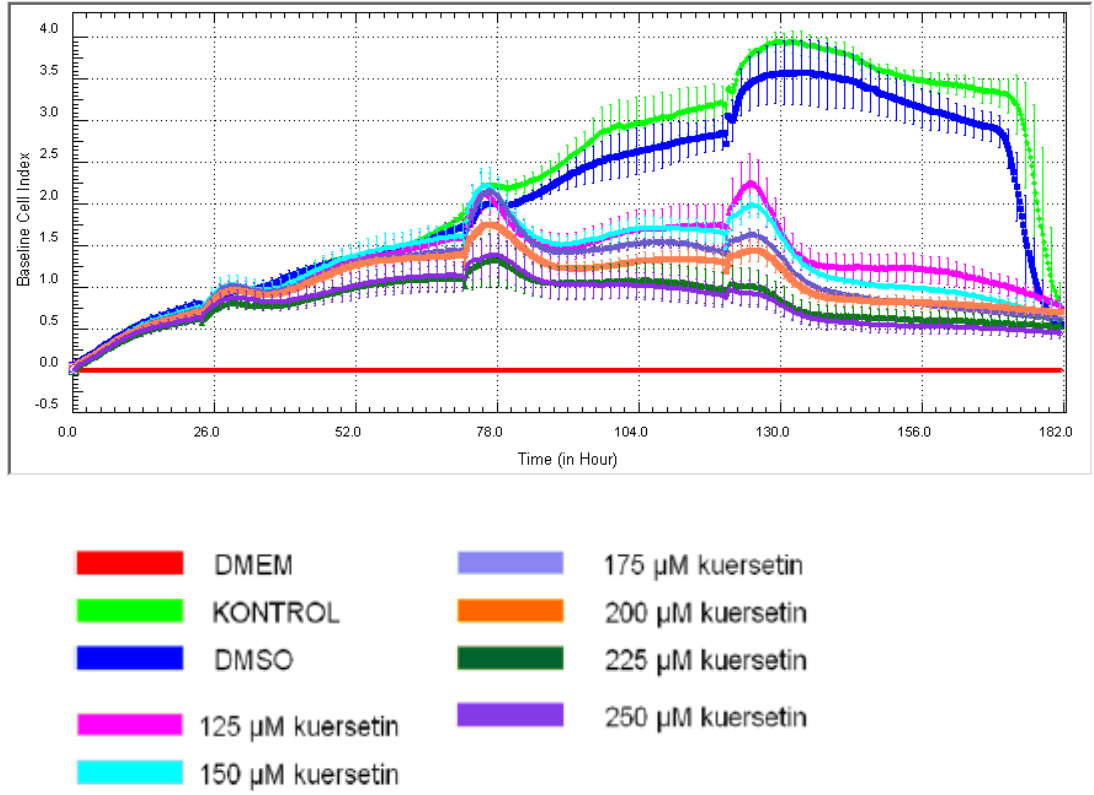


Şekil 3.4. Hesperetin doz gruplarının farklı zamanlarda karşılaştırması.

3.4. Kuersetinin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi

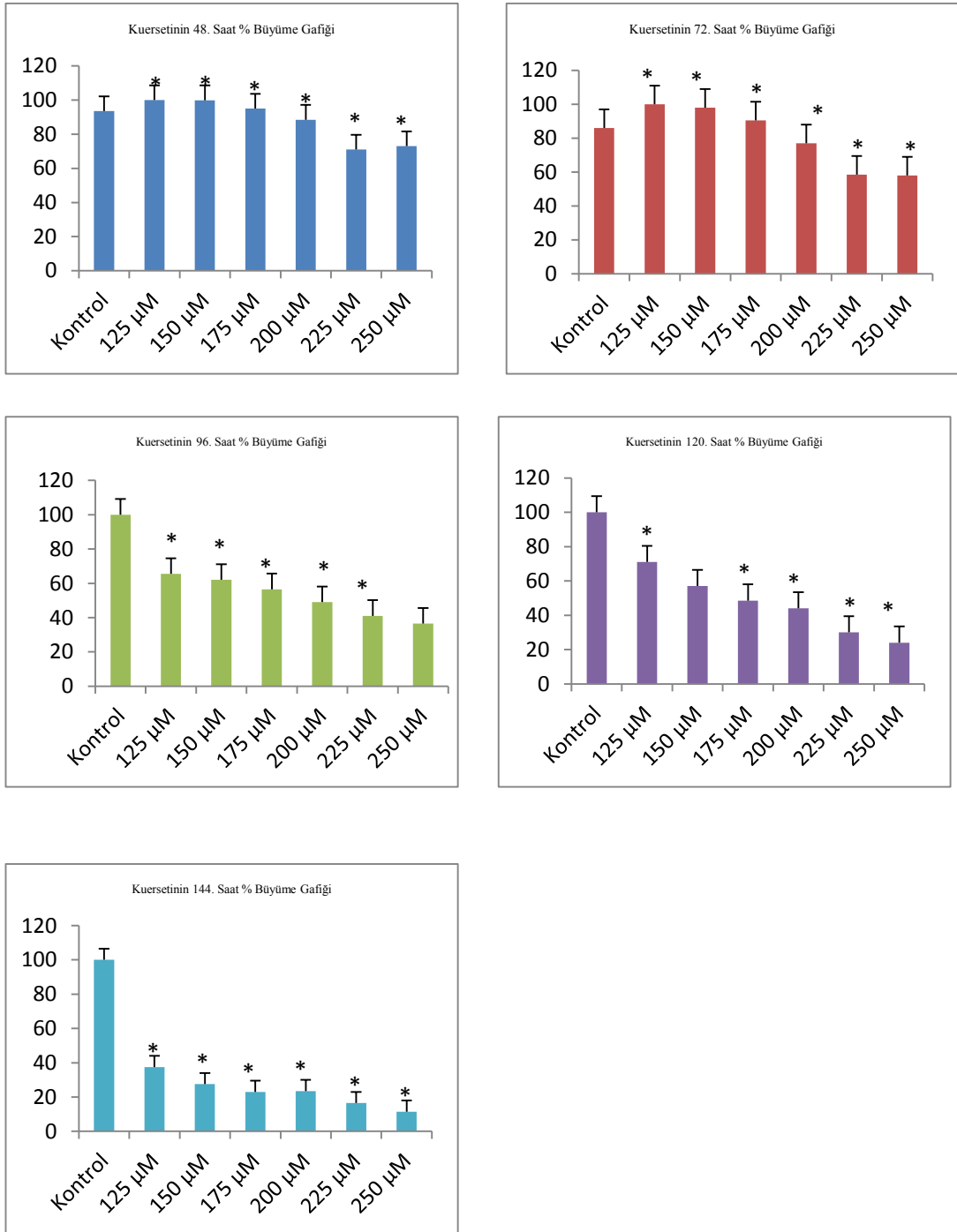
Kuersetinin MCF-7 hücre büyümesine doz ve zaman bağımlı etkisi, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle analiz edildi. Kuersetinin 125, 150, 175, 200, 225, 250 µM konsantrasyonlarında hücre proliferasyon oranları 182 saat

boyunca izlendi. Şekil 3.5'te anlaşıldığı gibi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kuersetinin, doz ve zaman bağımlı olarak hücreleri inhibe ettiği görülmüştür.



Şekil 3.5. Kuersetinin MCF-7 hücrelerine ilk 182 saat boyunca etkisi

Kuersetinin MCF-7 hücrelerine etkisine ait istatistiksel sonuçlar; farklı zamanlarda dozlar arası karşılaştırması şekil 3.6' da verilmiştir. şekil 3.6 incelendiğinde, doz grupları arasındaki fark 48. saatte başlamış ve sonraki zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0,0001$). 48. saatte doz grupları arasındaki farka bakıldığında, en yüksek değeri 1,171 ile kontrol grubu, en düşük değeri 0,914 ile 250 µM doz grubu göstermişlerdir. DMSO, 200, 175, 150 ve 125 µM grupları kontrol grubuna benzerken, 225 ve 250 µM doz grupları kontrolden farklı bulunmuştur. Ayrıca, 200, 175, 150 ve 125 µM doz grupları birbirine benzer bulunmuştur. Sonraki zaman dilimlerinde, istatistiksel anlamlılık yönünden benzer durum görülse de, zaman faktörü ile doz faktörü etkileşiminden dolayı, doz grupları arasındaki farklılıkların derecesi zamandan zamana değişmiştir.

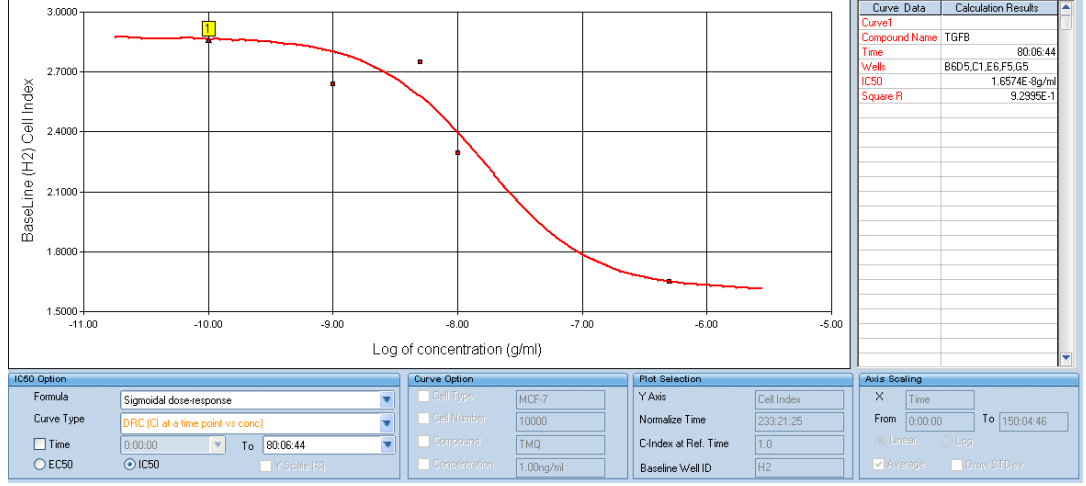


Şekil 3.6. Kuersetinin doz gruplarının farklı zamanlarda karşılaştırması.

3.5. Hücrelerin IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

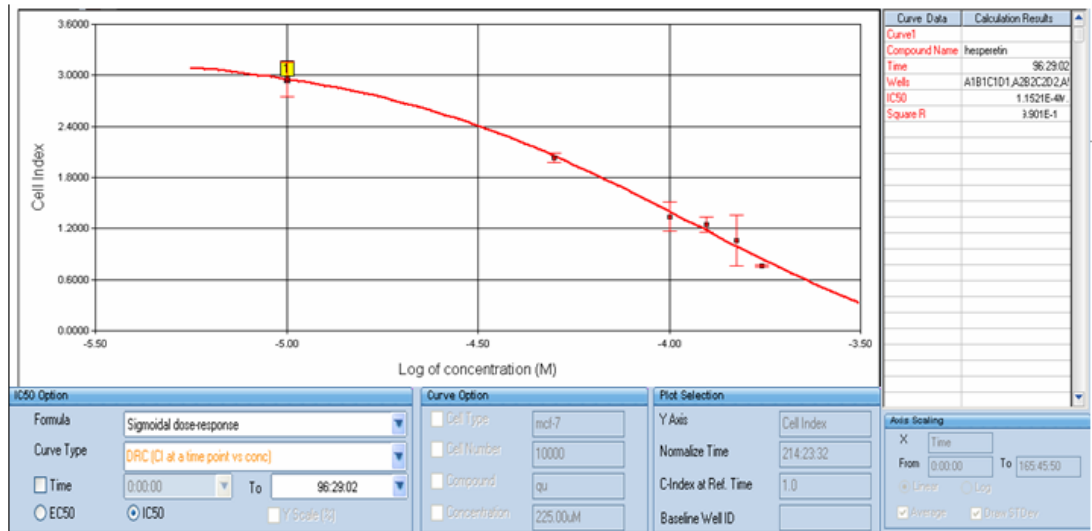
TGF- β , hesperetin ve kuersetinin doz ve zaman bağımlı olarak antiproliferatif etki göstermektedir. TGF- β verilen hücrelerin proliferasyon eğrisi grafiğinden IC₅₀ değeri şekil 3.7’de görüldüğü üzere 16 µM (r²=0,93) olarak hesaplanmıştır. Bu değer cihaz tarafından, kontrol grubu hariç, uygulanan tüm doz gruplarının,80.saatte

logaritmalarının alınması ve bu değerlerle birlikte hücre indeks değerlerine karşı bir grafik çizilmesi şeklinde hesaplanmıştır. Bu grafik çizimlerine göre r^2 değerlerine de bakılarak, sitokin ailesinden olan TGF- β için hücrelerin yarısını öldürmeye yetecek toksik değerler hesaplanmıştır.



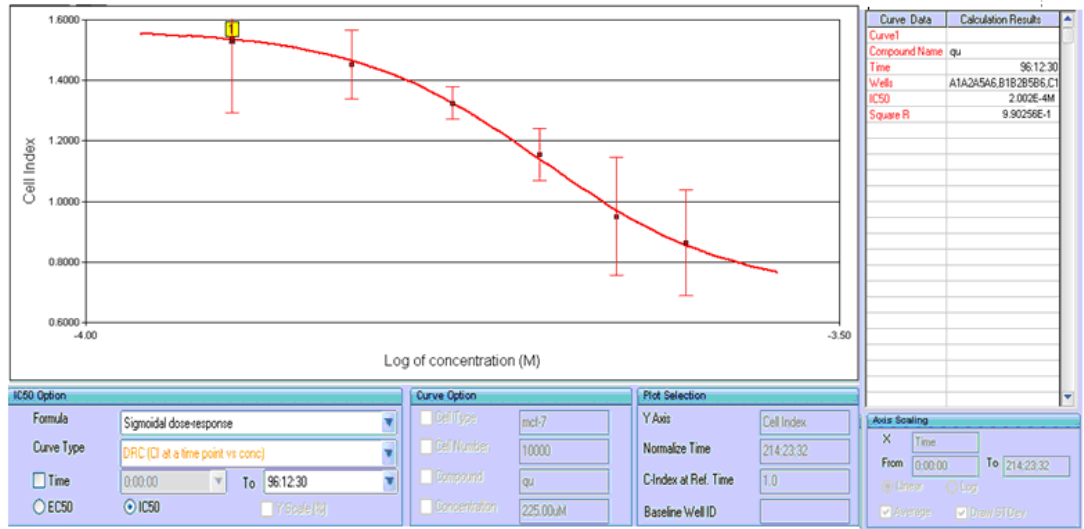
Şekil 3.7. TGF- β için IC₅₀ değerinin belirlenmesi

Hesperetin verilen hücrelerin proliferasyon eğrisi grafiğinden IC₅₀ değeri şekil 3.8’de görüldüğü üzere 115 μ M ($r^2=0,99$), olarak hesaplanmıştır. Bu değer cihaz tarafından, kontrol grubu hariç, uygulanan tüm doz gruplarının, 96. saatte logaritmalarının alınması ve bu değerlerle birlikte hücre indeks değerlerine karşı bir grafik çizilmesi şeklinde hesaplanmıştır. Bu grafik çizimlerine göre r^2 değerlerine de bakılarak, flavonoid bileşiği olan hesperetin için hücrelerin yarısını öldürmeye yetecek toksik değerler hesaplanmıştır.



Şekil 3.8. Hesperetin için IC₅₀ değerinin belirlenmesi

Kuersetin verilen hücrelerin proliferasyon eğrisi grafiğinden IC₅₀ değeri şekil 3.9'da görüldüğü üzere 200 μ M ($r^2 = 0,99$), olarak hesaplanmıştır. Bu değer cihaz tarafından, kontrol grubu hariç, uygulanan tüm doz gruplarının, 96.saatte logaritmalarının alınması ve bu değerlerle birlikte hücre indeks değerlerine karşı bir grafik çizilmesi şeklinde hesaplanmıştır. Bu grafik çizimlerine göre r^2 değerlerine de bakılarak, flavonoid bileşiği olan hesperetin için hücrelerin yarısını öldürmeye yetecek toksik değerler hesaplanmıştır.

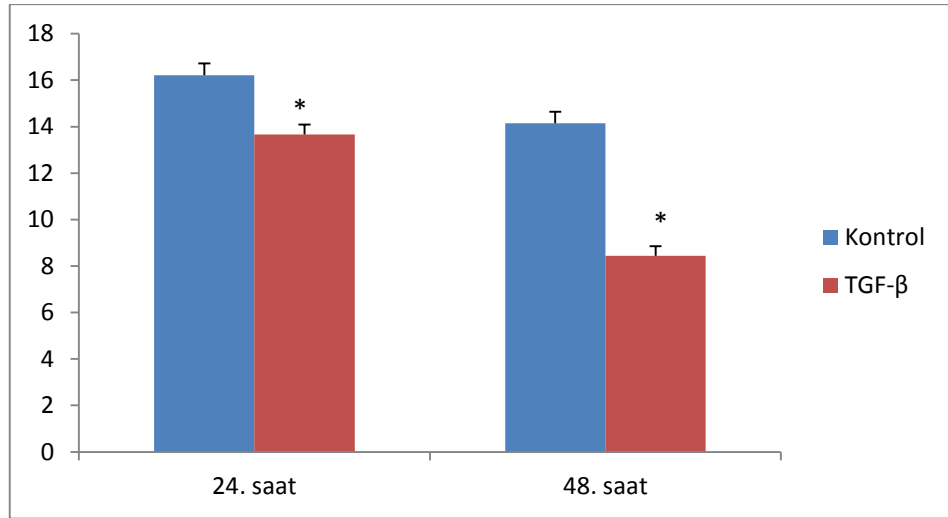


Şekil 3.9. Kuersetin için IC₅₀ değerinin belirlenmesi.

3.6. TGF- β , Hesperetin, Kuersetin Uygulanan ve Kontrol Grubundaki Hücrelerin uPA Aktivitesi Ölçümü Sonuçları

TGF- β , Hesperetin ve Kuersetinin MCF-7 hücrelerine uPA aktivitesi üzerinde etkisi farklı zamanlar göz önüne alınarak istatistiki açıdan anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlarda; 24. ve 48. saatlerde, kontrol grubu ile TGF- β uygulanan hücreler arasında sırasıyla ($p < 0,01$) ve ($p < 0,001$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 3.10).



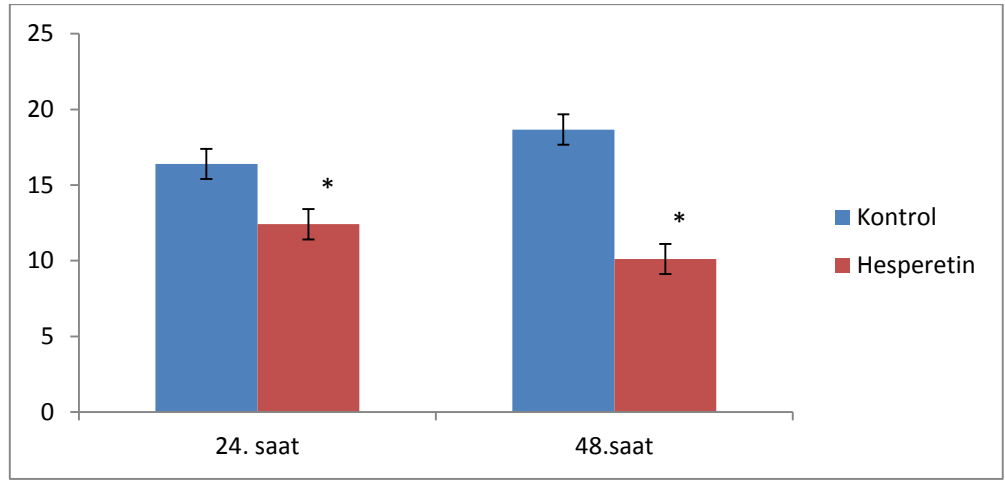
Şekil 3.10. Kontrol ve TGF-β gruplarının uPA aktivitesi

TGF-β'nın farklı zamanlarda uPA aktivitesi etkisinin karşılaştırılması çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. TGF-β'nın farklı zamanlarda uPA aktivitesi etkisinin karşılaştırılması.

uPA AKTİVİTESİ (IU/mg protein)	KONTROL (ORT±SD)	TGF-β (ORT±SD)	P
24.SAAT	16,22 ± 0,41	13,67 ± 0,75	p=0,007 *
48.SAAT	14,14 ± 0,62	8,44 ± 0,08	p<0,001 *

Kontrol grubu ile Hesperetin uygulanan gruplar arasında 24. saatte Hesperetin için ($p < 0,05$), 48. saatte Hesperetin için ($p < 0,001$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (şekil 3.11.).



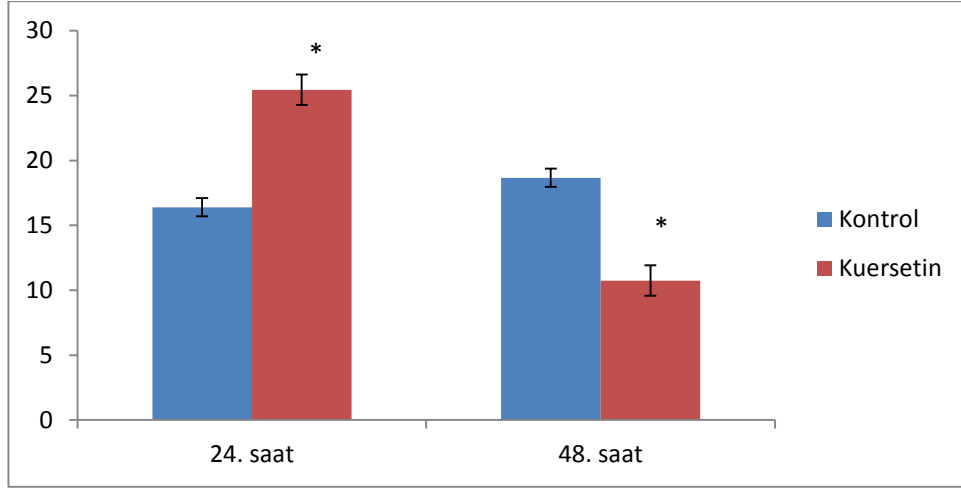
Şekil 3.11. Kontrol ve Hesperetin gruplarının uPA aktivitesi

Hesperetin farklı zamanlarda uPA aktivitesi etkisinin karşılaştırılması çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3.Hesperetinin farklı zamanlarda uPA aktivitesi etkisinin karşılaştırılması.

uPA AKTİVİTESİ (IU/mg protein)	KONTROL (ORT±SD)	HESPERETİN (ORT±SD)	p
24.SAAT	16,4 ± 1,5	12,41 ± 1,15	p=0,02*
48.SAAT	18,67 ± 0,42	10,11 ± 0,88	p< 0,001*

Kontrol grubu ile kuersetin uygulanan gruplar arasında 24. saatte ($p < 0,01$); 48. saatte ($p < 0,001$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Kontrol ve Kuersetin gruplarının uPA aktivitesi

Kuersetinin farklı zamanlarda uPA aktivitesi etkisinin karşılaştırılması çizelge 3.4’de; verilmiştir.

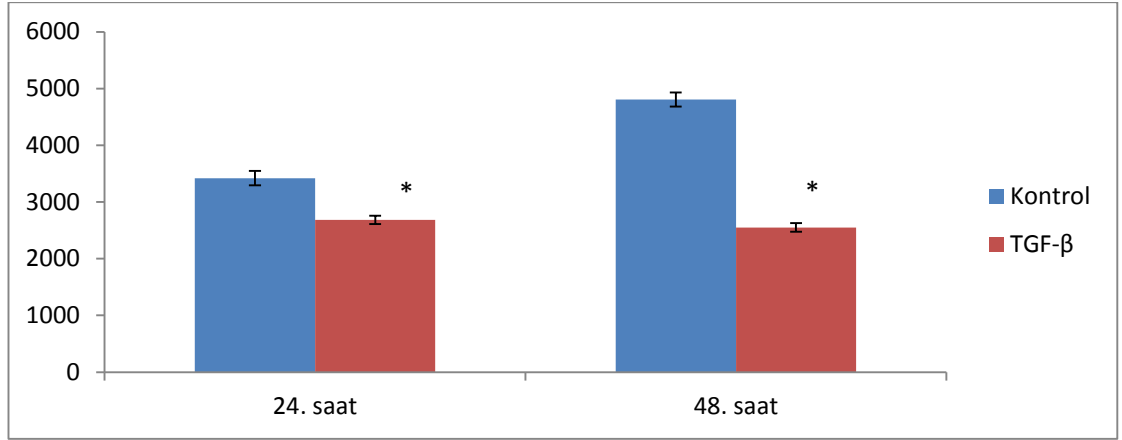
Çizelge 3.4.Kuersetinin farklı zamanlarda uPA aktivitesi etkisinin karşılaştırılması.

uPA AKTİVİTESİ (IU/mg protein)	KONTROL (ORT±SD)	KUERSETİN (ORT±SD)	P
24.SAAT	16,4 ± 1,5	25,45 ± 1,15	p=0,001*
48.SAAT	18,67 ± 0,42	10,74 ± 1,2	p<0,001*

3.7.TGF-β, Hesperetin, Kuersetin Uygulanan ve Kontrol Grubundaki Hücrelerin PAI-1 Düzeyi Ölçümü Sonuçları

TGF-β, Hesperetin ve Kuersetinin MCF-7 hücrelerine PAI-1 düzeyi üzerinde etkisi farklı zamanlar göz önüne alınarak istatistiki açıdan anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlarda; kontrol grubu ile TGF-β uygulanan gruplar arasında 24. saatte TGF-β için (p=0,001); 48. saatte ise (p<0,001) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Kontrol ve TGF-β uygulanan grupların PAI-1

düzeyine ait grafik şekil 3.13’de; TGF-β’nın farklı zamanlarda PAI-1 düzeyine etkisinin karşılaştırılması Çizelge 3.5’de verilmiştir.

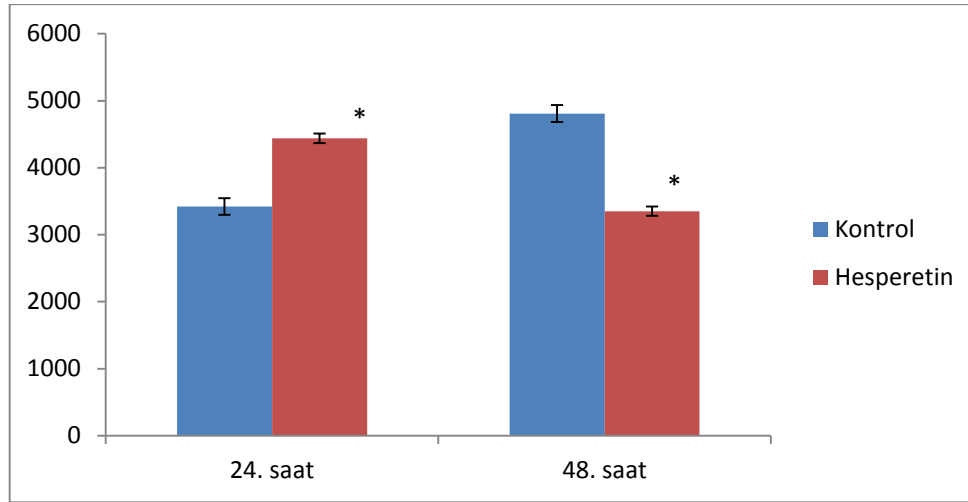


Şekil 3.13. Kontrol ve TGF-β gruplarının PAI-1 düzeyi

Çizelge 3.5. TGF-β’nın farklı zamanlarda PAI-1 Düzeyine etkisinin karşılaştırılması.

PAI-1 DÜZEYİ (ng/mg protein)	KONTROL (ORT±SD)	TGF-BETA (ORT±SD)	P
24.SAAT	3420,67 ± 121,33	2684,33 ± 98,22	p=0,001*
48.SAAT	4808,67 ± 131,33	2551,33 ± 54,78	p<0,001*

Bulgularımızda; kontrol grubu ile Hesperetin uygulanan gruplar arasında 24. saatte Hesperetin için ($p<0,001$), 48. saatte ise ($p<0,001$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. PAI-1 düzeyi için Hesperetin, uygulanan ve kontrol gruplarına ait grafik Şekil 3.14’de hesperetinin farklı zamanlarda PAI-1 düzeyine etkisinin karşılaştırılması, Çizelge 3.6’da verilmiştir.

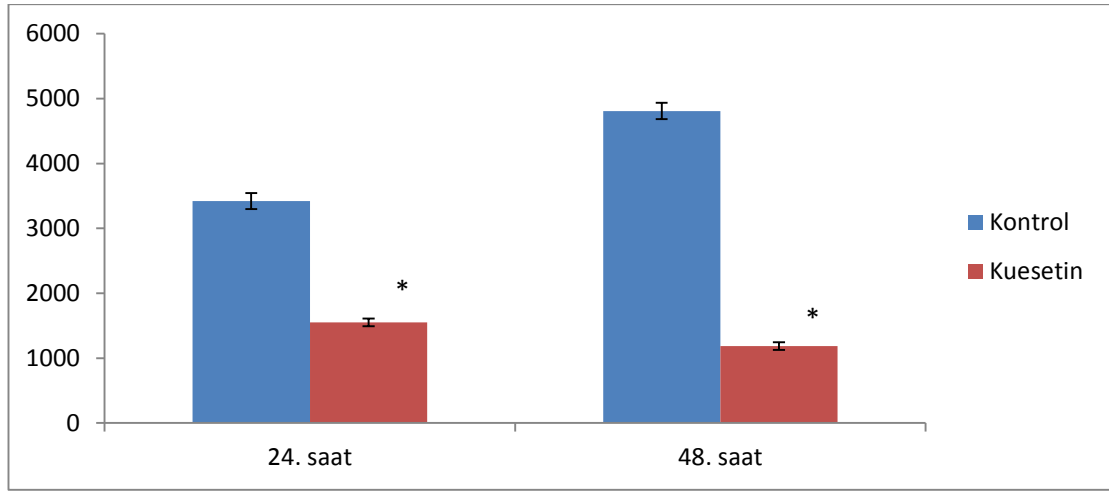


Şekil 3.14. Kontrol ve Hesperetin gruplarının PAI-1 düzeyleri

Çizelge 3.6. Hesperetin'in farklı zamanlarda PAI-1 Düzeyine etkisinin karşılaştırılması.

PAI-1 DÜZEYİ (ng/mg protein)	KONTROL (ORT±SD)	HESPERETİN (ORT±SD)	P
24.SAAT	3420,67 ± 121,33	4438,89 ± 110,03	p<0,001*
48.SAAT	4808,67 ± 131,33	3351,28 ± 39,48	p<0,001*

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarda; kontrol grubu ile Kuersetin uygulanan gruplar arasında 24. saatte Kuersetin için ($p<0,001$), 48. saatte ise ($p<0,001$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. PAI-1 düzeyi için Kuersetin uygulanan ve kontrol gruplarına ait grafik şekil 3.15'de verilmiştir.



Şekil 3.15. Kontrol ve Kuersetin gruplarının PAI-1 düzeyi

Kuersetinin farklı zamanlarda PAI-1 düzeyine etkisinin karşılaştırılması Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Kuersetinin farklı zamanlarda PAI-1 Düzeyine etkisinin karşılaştırılması.

PAI-1 DÜZEYİ (ng/mg protein)	KONTROL (ORT±SD)	KUERSETİN (ORT±SD)	p
24.SAAT	3420,67 ±121,33	1550 ± 50,69	p<0,001*
48.SAAT	4808,67 ±131,33	1184,62 ± 74,18	p<0,001*

4. TARTIŞMA

Literatürde TGF- β erken evrelerde, tümör hücre proliferasyonu inhibe ederek bir tümör baskılayıcı rolündeyken geç aşamalarında ise, bu tümör hücre invazyonu ve metastazını uyarak tümörü şiddetlendirdiği belirtilmektedir.

TGF- β ailesi hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi birçok hücresel süreçte yer alan ve gelişimi çok yönlü kontrol eden ekstraselüler büyüme faktörlerinin büyük bir grubudur. Hücre tümör biyolojisinde önemli bir fonksiyonu olan TGF- β birçok tümör tipinde seviyesinin artış gösterdiği bilinmektedir (http://www.biotech.iitm.ac.in/faculty/dk_new/research.php.69).

TGF- β sinyal yolundaki eksiklik ya da hasarlar, örneğin SMAD mutasyonları, insanlardaki birçok kanser türü ile ilişkili bulunmuştur (Rasheed ve ark 1998).

Kolorektal kanserde yapılan çalışmalarda, primer tümörde yüksek seviyede TGF- β ekspresyonu ileri safhalarla ilişkilidir. TGF- β iyi farklılaşmış primer kolon karsinomalarında büyümeyi inhibe edici bir etki gösterirken zayıf diferansiye olmuş hücrelerin invazyonunu ve proliferasyonunu teşvik ettiği gösterilmiştir. TGF- β bazı epitelyum ve kanser hücrelerinin büyümesinin inhibisyonuna neden olurken, bazı kanser türlerinde ise TGF- β reseptörleri ya da SMAD proteinleri tamamen inaktive olmuştur. Tam tersine, TGF- β bazı durumlarda ise kanser hücrelerinin metastaz ve invazyon özelliklerinin artmasına da neden olmaktadır. 2004 yılında Selvemurugan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, fare hücre hatlarında TGF- β uygulamasının bir çeşit matriks metaloproteinaz olan koolojenaz 3' ün ekspresyonunu stimüle ettiği bulunmuştur

(http://www.biotech.iitm.ac.in/faculty/dk_new/research.php.69).

Benzer şekilde, meme kanserlerinin kemiğe metastaz yapmasının araştırıldığı bir çalışmada, kemik hücrelerinin yetiştirildiği medyum meme kanseri hücrelerine uygulanmıştır. Sonuç olarak, kemik hücrelerinden kaynaklanan ve medyuma bulunan TGF- β nedeniyle, memeli hücrelerinde bulunan majör adezyon moleküllerinden β 1 ve β 3 integrinlerinin ekspresyon seviyelerinin attığı buna bağlı olarak meme hücrelerinin göç etme özelliklerinin de attığı gösterilmiştir (Roman ve ark 2001, Selvamurugan ve ark 2004).

Meme kanserinde kemik metastazları en sık görülen komplikasyonlardan olduğu için bu konu çalışma alanı olarak seçilmektedir. Özellikle hipoksik koşulların metastaz ile ilişkisi üzerinde yapılan bir çalışmada, hipoksiya ile indüklenen genlerden olan VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ve CXCR4 (Chemokine Receptor Type 4)' ün transkripsiyonlarının TGF- β yolağı aracılığıyla indüklendiği SMAD7 ve SnoN (Ski-related Novel Protein N) reseptör proteinlerinin ise indüksiyonunun bloke edildiği gösterilmiştir. Böylece TGF- β ve hipoksiyanın birlikte etkisi ile, meme kanseri hücrelerinin metastazlarının etkili şekilde önlenebileceği ileri sürülmüştür (Wei ve ark 2008).

Literatürler PAI-1 düzeyinin invazyon açısından önemli bir markır olduğu ve primer doku PAI-1 düzeyinin kötü prognostik faktör olduğu belirtilmektedir.

Kanser patogenezinde PA sisteminin rolü hakkında yapılan çalışmalarda, tümör hücrelerinin önemli oranda plazminojen aktivatörü, özellikle uPA'yı ürettikleri gösterilmiştir. Plazmin ECM proteinlerinin salınmasına aracılık ederek kanser hücrelerinin dokulara invazyonuna neden olmaktadır. Kanser patogenezinde özellikle malign melanoma ve nöroblastomda asıl plazminojen aktivatörünün uPA olduğu öne sürülmüştür. Endotelyal hücrelerden üretilen tPA'nın ise kanser vaskülarizasyonunda rol aldığı öne sürülmüştür. PA sistemin hem inhibitör hem de aktivatörleri pek çok tümör hücresi tarafından sentezlenmektedir. Tümör hücrelerine ek olarak stromal hücreler ve tümör ilişkili makrofajlar PA sistemin değişik komponentlerini üretebilmektedir. Pyke ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada meme kanserinde infiltrasyon alanlarındaki tümör ilişkili makrofajların uPAR sentezledikleri gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda deneysel tümör modellerinde uPA inhibisyonunun tümör invazyonunu azalttığı gösterilmiştir (Pyke ve ark 1993).

Andreasen ve arkadaşları kanser invazyonunda PA sisteminin rolünü araştırmak için kanserli hastaların tümör dokusu ve plazma örneklerini incelemişlerdir. Pek çok kanserde; özellikle de meme ve kolon karsinomlarında yüksek uPA düzeyleri kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Mustjoki 2001, Andreasen ve ark 2000).

Ayrıca, uPA düzeyleri karsinomlarda histolojik derecelendirme ve metastaza eğilim ile doğru orantılı bulunmuştur. uPA'ya ilave olarak yüksek PAI-1 ve uPAR

düzeyleri ile azalmış PAI-2 düzeyleri de kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda uPAR düzeylerinin kolon ve over kanserli hastalarda kötü prognostik faktör olduğu gösterilmiştir. Tümör dokusunda PA sistem komponentlerinin ölçümü ve standartize edilmesi çoğu zaman güçtür. Bu nedenle dolaşımdaki uPA, uPAR ve PAI-1 düzeylerinin tümör invazyonu ile korele olup olmadığını araştıran çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Stephens ve ark 1999).

Tümör invazyonu yanında PA sistemi kanser hastalarındaki hemostatik dengesizlikler ve anjiogenezde de rol almaktadır. Kanserli hastalarda trombosit sayısı ve fibrinolitik sistem normal olmasına rağmen kanama görülebilmektedir. Bu hastalarda tümör hücrelerinden aktif uPA ve plazmin salgılandığı gösterilmiştir (Mustjoki2001).

PA sistemi tümör invazyonunda diğer proteinazlarla birlikte çalışmaktadır. Pek çok matriks metalloproteinazı tümör invazyonunda rol almaktadır. MMP-2 mutasyonlu farelerde tümör invazyonunun önemli derecede azaldığı gösterilmiştir. Farelerde yapılan yara iyileşmesi modellerinde plazminojen ve MMP'lerinin inhibisyonu ile yara iyileşmesinin durduğu gösterilmiştir. Bu nedenle bu iki sistemin kanserde doku yeniden şekillenmesinde (remodeling) önemli olduğu kanısına varılmıştır (Blobel2000, Mustjoki2001).

Reijerkerk ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada uPA ve uPAR'a karşı antikorlarla kanser hücre invazyonunun önemli derecede inhibe edildiği saptanmış ve kanser hastalarında yeni antiinvazif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinin önemi vurgulanmıştır. Klasik proteinaz inhibitörleri, hem uPA hem de tPA'yı inhibe ederek fibrinolitik dengesizliğe neden olurlar. Bu nedenle selektif uPA inhibitörleri veya uPA'nın reseptörüne bağlanmasını inhibe eden inhibitörlerin kullanılmasının kanser tedavisinde yeri olabileceği vurgulanmaktadır. Alonso ve arkadaşları farelerde yapılan çalışmada uPA inhibitör B-428'in meme kanserinde invazyon ve metastazı engellediğini göstermişlerdir. Guo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yine fare modelinde uPA'nın uPAR'a bağlanması engellediğinde anjiogenez ve tümör metastazının inhibe olduğu gösterilmiştir (Guo ve ark 2000, Reijerkerk ve ark 2000, Mustjoki 2001).

Meme kanseri uPA sisteminin prognostik ve prediktif etkilerinin araştırıldığı bir diğer kanser türüdür. Meme kanserlerinde uPA güçlü ve bağımsız prognostik

faktör olarak tanımlanmaktadır. Janicke ve arkadaşları, invazif meme kanserinde PAI-1 ve uPA'nın prognostik önemini göstermişlerdir. Tümör dokusu örneklerinde uPA/PAI-1 düzeylerinin saptanması, nod-negatif meme kanseri hastalarında hastalığın tekrarlama riskini belirlemeyi mümkün kılmaktadır. Lenf nodu negatif bile olsa doku örneklerinde yüksek uPA ve PAI-1 düzeyleri kanserin yaygın olduğunu göstermekte, bu durumda kemoterapi şiddetle önerilmektedir. Düşük düzeylerde ise hastalığın tekrarının muhtemelen olmayacağı gösterilmektedir. Bu durumda ise nod-negatif hastaların kemoterapi yükünden korunması mümkün olmaktadır (Janicke ve ark 2001). Harbeck ve arkadaşları yine benzer çalışma ile uPA ve PAI-1 meme kanserli hastalarda risk değerlendirmesinde kullanılabileceğini vurgulamışlardır (Harbeck ve ark 2002, Salvatore ve ark 2009).

Tecimer ve arkadaşları (2000) over kanserli hastalarda uPA, uPAR ve PAI-1 düzeylerinin prognoza etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada uPA, uPAR ve PAI-1 düzeylerini ELISA yöntemi ile kanser dokusunda ölçülmüştür. uPA ve PAI-1 70 hastada, uPAR 43 hastada ölçülebilmektedir. Bunların düzeyleri yaş, tümör histolojisi, evre, lenf nodu, metastaz derecesi, rezidüel hastalık, rekürrens riski gibi prognoza etkili faktörlerle kıyaslanmıştır. uPA ve uPAR düzeyleri bu faktörlerle korele bulunmazken, yüksek gradeli ve rekürrens riski yüksek olan hastalarda PAI-1 düzeyleri yüksek saptanmıştır. Düşük PAI-1 düzeyine sahip grupta sağ kalım oranı yüksek bulunmuş ve yüksek PAI-1 düzeyleri kötü prognozla ilişkilendirilmiştir.

Flavonoidlerle in vivo ve iv vitro olarak yapılan çalışmalar kansere karşı koruyucu birçok mekanizmada rol oynadığını göstermiştir.

Bunlar; östrojenik/antiöstrojenik aktivite, antiproliferasyon, hücre siklusunun durdurulmasının ve apoptozisin indüksiyonu, oksidasyonun engellenmesi, deoksifikasyon enzimlerinin indüksiyonu, immün sistemin düzenlenmesi ve hücre içi sinyal iletimindeki değişikliklerdir (Diane ve ark 2001).

Yapılan çalışmalar hesperetinin, kolon (Nalini ve ark2012), meme (Choi 2007, Ye ve ark2011), gastrointestinal (Zarebczan ve ark2011) gibi çeşitli kanser türlerine karşı koruduğu gözlemlenmiştir.

Choi ve ark (2007) yaptığı bir başka bir çalışmada da antikanser etkisi olan hesperetinin, insan meme kanseri hücresi MCF-7 hücresi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Hesperetinin, hücre siklusunda yer alan G1 fazını durdurması yoluyla hücre proliferasyonu inhibisyona uğramıştır. Ayrıca siklin bağımlı kinazlar da bu bağlamda incelenmiştir. MCF-7 hücrelerine 10, 50 ve 100 µM dozlarında verilen hesperetinin etkisi 24, 48 ve 72. saatlerde analiz edilmiştir. Hesperetinin hücre proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiğini, inhibisyonun en fazla 72. saatte ve 100 µM hesperetinin gerçekleştirdiğini gözlemlemişlerdir (Choi ve ark 2007). Choi ve ark yaptıkları bu çalışmaya göre hesperetin 48. ve 72. saatte inhibitör etkisini göstermesine rağmen, bizim çalışmamızda bu etki uygulamadan sonra 72. saat ve sonrasında görülmüştür. Bu çalışmaya benzer olarak kendi çalışmamızda 100 µM hesperetinin etkisi, 10 ve 50 µM hesperetine göre daha önce gözlemlenmiştir. Ayrıca uygulamış olduğumuz en yüksek konsantrasyondaki hesperetin (175 µM) de inhibitör etkisini yine 72. saatte göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçlarıyla kendi sonuçlarımız uyumlu olarak, hesperetinin MCF-7 hücrelerini doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiği görülmüştür.

Gulati ve ark (2006) ise kuersetinin, insan meme kanseri hücresi HCC1937 (PTEN homozigot delesyonu) proliferasyonuna etkisi araştırmasında Akt/PKB yolağını incelemişlerdir. Kuersetinin, HCC1937 kanser hücrelerinde yapısal olarak aktif Akt/PKB yolunu inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Chou ve ark yaptığı bir çalışmada, insan meme kanseri hücresi MCF-7 hücrelerinde kuersetinin etkisini araştırmışlardır. Kuersetinin hücreleri doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca hücre siklusu da analiz edilmiş ve G0/G1 fazında hücre sayısının anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Böylece S fazı da durdurulmuş olduğundan kuersetinin inhibitör etkisi gözlemlenmiştir(Chou ve ark 2010).Chou ve ark yaptığı çalışmada kuersetin inhibitör etkisini, 24. ve 48. saatlerde göstermesine rağmen, çalışmamızda daha yüksek konsantrasyonlarda uyguladığımız kuersetinin bu etkisi, ilk uygulamadan sonraki 72. saatte görülmüştür.

Bu çalışmada kullanılan TGF-β'nın MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Kullandığımız doz miktarları literatürlerde kullanılan doz miktarlarıyla uyumludur. Çalışmamızda TGF-

β , MCF-7 hücrelerinin inhibisyonuna etkisini uygulanmadan sonra ilk olarak 64. saatte göstermiştir. TGF- β , inhibitör etkisini en fazla 114. saatte 10 ile 500 ng/ml dozda da göstermiştir. Ayrıca hücre proliferasyon inhibisyonunda istatistiksel anlamlılık 64. saatten başlayarak artmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan flavonoidlerin MCF-7 hücrelerinin proliferasyonu, doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Literatürlerde benzer çalışmalardan farklı olarak hesperetin ve kuersetinin kanser hücrelerinin proliferasyonuna etkisi, belirtilen dozlara göre hem yüksek dozlarda hem de belirtilen zamanlardan daha geniş bir zaman diliminde gözlemlenmiştir. Çalışmada hesperetin ve kuersetin, MCF-7 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonuna etkisini, uygulamadan sonra 72. saatte göstermiştir. Hesperetinin inhibitör etkisi en fazla 175 μ M dozda görülürken, bu etkiyi kuersetin 250 μ M dozda göstermiştir. Ayrıca çalışmamızın literatürlerden en önemli farkı da kullanılan flavonoidlerin inhibitör etkilerinin gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle belirlenmiş olmasıdır.

Duffy ve Duggan (2004)'te, negatif hastalarda uPA ve PAI-1'nin en güçlü prognostik faktörlerden biri olduğunu bu faktörlerin tek başına olmasından ziyade kombine değerlendirilmesi daha güçlü prognostik olmasını sağlayacağını belirtmişlerdir.

Urokinaz sistemi faktörlerinin kıyaslandığı bir çalışmada, primer hücre tümörlerinin sitozolünden belirlenen uPA düzeyleri, ER+ hastalarda tamoksifen tedavisiyle 296 düşük uPA düzeyli hastanın %68'ine, 395 yüksek uPA düzeyli hastanın %51'ine fayda sağladığı gösterilmiştir (Marion ve ark 2004). Bizim yaptığımız çalışmada ise uPA aktivite düzeyleri kontrole göre TGF- β verilen gruplar kıyaslandığı zaman 24.ve 48.saatlerde kontrol ile hesperetin verilen gruplar kıyaslandığı zaman 24.ve 48.saatlerde ve kontrole göre kuersetin verilen gruplar kıyaslandığı zaman 48.saatte azalmıştır. TGF- β , hesperetin ve kuersetin uPA aktivitesini azaltarak hücre invazyonunu engelleyebilir.

Retrospektif bir çalışmada, meme kanserli hastalarda yüksek uPA, uPAR ve PAI-1 seviyeleri, kısalım sağkalım ile ilişkili iken, yüksek PAI-2 seviyesinin ise daha iyi prognozla ilişkili olduğu belirlenmiştir. 8377 hasta içeren bir analizde, uPA ve PAI-1 seviyelerinin, lenf nodu durumundan sonra, tüm hastalar için hastalıksız ve

toplam sağkalımın gl bir prediktörü olarak gösterilmiştir. Özellikle lenf nodu negatif hastalarda, her ikisinin birlikte ekspresyonu durumunda bu ilişki daha belirgindir(Look ve ark. 2002).Bizim yaptığımız çalışmada ise PAI-1 düzeyleri kontrole göre TGF- β verilen gruplar kıyaslandığı zaman 24. ve 48.saatlerde, kontrolle hesperetin verilen gruplar kıyaslandığı zaman 48.saatte ve kontrole göre kuersetin verilen gruplar kıyaslandığı zaman 24. ve 48.saatlerde azalmıştır.

Çalışmamızda bulunan proliferasyon sonuçları literatür ile uyumlu bir şekilde bulunmuştur. Yine uPA aktiviteleri TGF- β ile baskılanmıştır.TGF- β hem uPA aktivitesini azaltmış hem de PAI-1 düzeyini azaltmıştır. TGF- β uPA protein seviyesini de azaltmış olabilir. Azalmış uPA protein sentezi PAI-1 azalmasına rağmen düşük aktivitenin nedeni olabilir.

Sonuçlarımızda uPA aktiviteleri 24. ve 48. saatlerde hesperetinle de baskılanmıştır. uPA aktivitesinin 24.saatte baskılanmasının sebebi 24.saatte PAI-1 düzeyindeki artış olabilir. PAI-1 düzeyinin 48. saatteki düşüşü ise hesperetinin etkisiyle uPA protein sentezinin 24.saatten itibaren azalmasıyla uyumlu olabilir.

Bulgularımızda kuersetin PAI-1 düzeyini baskılamıştır. uPA aktivitesinin 24.saatte artması 24. saatte PAI-1 düzeyinin azalmasına bağlı olabilir. 48.saatte ise kuersetin hem uPA aktivitesini hemde PAI-1 düzeyini baskılamıştır. 48.saatte kuersetinin uPA protein sentezini azaltmış olabileceğinden PAI-1 düzeyide artış göstermemiş olabilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma TGF- β ve flavonoidlerin, insan meme kanseri hücresi MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiğini gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle ortaya koymuştur. Aynı şekilde kanser hücrelerinde TGF- β ve flavonoidlerin uPA ve PAI-1 sisteminde etkili olduğunu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu çalışma TGF- β 'nın antiproliferatif ve tümör supresif etkisi; flavonoidlerin de antiproliferatif ve antioksidan özellikleri nedeniyle kanser hastalarında diğer tedavilerin yanında destek tedavi olarak kullanılabileceği görüşünü desteklemektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abbas AK, Lichtman AH, 2003. Cellular and Molecular Immunology; 5th edition Philadelphia: Saunders Co. 243-74.
- Ahmed M, Rahman N, 2006. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene*. 25;25(43):5906-11.
- Allred DC, Clark GM, Tandon AK, Molina R, Tormey DC, 1992. Her-2/neu in node-negative breast cancer: Prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol* 10:599-605
- Almasan A, Yin Y, Kelly R, Lee E, Bradley A, Li W, Bertino J, Wahl G, 1995. Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5436-40.
- Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH, 2000. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci*; 57: 25-4.
- Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, 1997. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis. *Int J Cancer*; 72:1-22.
- Anonim, 1997. World Cancer Research Fund: Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC: American Institute for Cancer Research apoptosis inducer in human colon carcinoma cells'. *Cancer Res*. 60: 3823-3831.
- Aslan A, Temiz M, Yiğit Y, Can R, Canbolant E, Yiğit F, 2007. Hemşirelik Yüksek Okulu öğrencilerinin meme kanseri hakkında bilgi, tutum ve davranışları. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*; 6(3): 193-198.
- Aslan FE, Gürkan A, 2007. Kadınlarda meme kanseri risk düzeyi. *Meme Sağlığı Dergisi*; 3: 63-68.
- Bailly C, 2000. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr Med Chem* 7: 39-58
- Baker MS, Bleakly P, Woodrow GC, Doe WE, 1990. Inhibition of cancer cell urokinase PA by its specific inhibitor PAI-2 and subsequent effects on extracellular matrix degradation. *Cancer Res*; 50 4676-84
- Baum M, 2002. Hormone replacement therapy and the breast. Women still want to have hormone replacement therapy. *BMJ*. 324(7342): p. 915; author reply 915.
- Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG, 1997. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med* 75(6):429-39
- Berkarda B, Koyuncu H, Soybir G, Baykut F, 1998. Inhibitory effect of hesperidin on tumor initiation and promotion in mouse skin. *Res Exp Med*; 93-99.
- Bilaloğlu GV, Harmandar M, 1997. "Flavonoidler", AktifYayınevi, İstanbul
- Bjeldanes LF, Chang GW, 1977. 'Mutagenic activity of quercetin and related compounds'. *Science*. 197: 577-578.
- Blobel CP, 2000. Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr Opin Cell Biol*; 12: 606-612.
- Buo L, Karlsrud TS, Dyrhaug G, Bell H, Ergstom L, Johansen H T, Aasen AO, 1995. The fibrinolytic system in human ascites. *Scand J Gastroenterol*; 30 (11): 1101-7 by quercetin'. *Mol Reprod Dev*. 25: 369-373.

- Byrne PF, McMullen ME, Snook ME, Musket TA, Theuri JM, Widsthorpe NW, Wiseman BR, Coe EH, 1996. "Quantitative Trait Loci and Metabolic Pathways: Genetic Control of The Concentration of Maysin, A Corn Earworm Resistance Factor, in Maize Silks", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8820-8825.
- Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, 1995. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary breast carcinoma. *Nature Genet* 11:210-212
- Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Aiello FB, Piantelli M, 2000. 'Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential'. *Int J Cancer*. 87: 595-600.
- Cancer IARC. Globocan, 2012. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Lyon, France
- Casagrande F, Darbon JM, 2001. 'Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1'. *Biochem Pharmacol*. 61: 1205-1215.
- Cattoretti G, Rilke F, Andreda S, Mato LDA, Delia D, 1998. p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 41:178-183
- Cerutti JM, Ebina KN, Matsuo SE, Martins L, Maciel RM, Kimura ET, 2003. Expression of Smad4 and Smad7 in human thyroid follicular carcinoma cell lines. *J Endocrinol Invest*; 26: 516-21.
- Chan WS, Wen PC, Chiang HC, 1995. 'Structure-activity relationship of caffeic acid analogues on xanthine oxidase inhibition'. *Anticancer Res*. 15: 703-707.
- Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, 1993. 'Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase'. *Anticancer Res*. 13: 2165-2170.
- Chen JR, Kang Y, Siegel PM, Massague J, 2002. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGF-beta receptor to c-myc repression. *Cell*; 110: 19-32.
- Choi EJ, 2007. Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21. *Nutrition and Cancer*; 59: (1) 115-119.
- Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, 2001. 'Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin'. *Int J Oncol*. 19: 837-844.
- Chou CC, Yang JS, Lu, Siu HF, Ip SW, Lo C, Wu CC, Lin JP, Tang NY, Chung JG, Chou MJ, Teng YH, Chen DR, 2010. Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Arch Pharm Res*; 33(8): 1181-1191.
- Cirico TL, Omaye ST, 2006. "Additive or Synergetic Effects of Phenolic Compounds on Human Low Density Lipoprotein Oxidation", *Food and Chemical Toxicology*, 44;510-516
- Cody V, 1986. 'Plant Flavonoids in Biology and Medicine'. *Prog Biol Res*. 213.
- Cody V, 1988. 'Plant Flavonoids Biology, Medicine, part II'. *Prog Biol Res*. 280.
- Collen D, 1986. Lijnen HR. The fibrinolytic system in man. *Crit Rev Oncol Hematol*; 4: 249-301.
- Conguer JA, Maiani G, Azzini E, Raguzzini A, Holub BJ, 1998. Supplementation with Quercetin Markedly Increase Plasma Quercetin Concentration without Effect on Selected Risk Factors for Heart Disease in Healthy Subjects. *Human Nutrition and Metabolism* 128, 593-597

- Conklin DR, Tan KH, Aschner M, 1998. 'Dimethyl sulfoxide, but not acidosis induced metalllothionein mRNA expression in neonatal rat primary astrocyte cultures is inhibited by the bioflavonoid, quercetin'. *Brain Res.* 794: 304–308.
- Corn PG, El-Deiry WS, 2002. Derangement of growth and differentiation control in onkogenesis. *Bioessays* 1: 83-90.
- Cornish KM, Williams G, Sanderson J, 2002. Quercetin Metabolism in The Lens: Role in Inhibition of Hydrogen Peroxide Induced Cataract. *Free Radical Biology Med* 1, 63-70
- Cotran R, Kumar V, Collins T, 1998. Robins Pathologic Basis of Disease. In: Cellular Pathology I: Cell Injury and Cell Death. Cellular Pathology, II: Adaptations, Intracellular Accumulations, and Cell Aging. Philadelphia: WB Saunders Co. 238-85.
- Curado M, Edwards B, Shin H, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P, 2007. Cancer Incidence in Five Continents. Lyon, IARC Scientific Publications No:160:IX
- Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA, Loskutoff DJ, 2003. Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol*; 160: 781-791.
- Çoğulu Ö, Alpman A, Durmaz B, Özkinay F: Türkiye Klinikleri. *J Med Sci* 2007, 27:725-737
- Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM, 1993. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem*;268:10739-10745.
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A, 2001. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*; 29: 117-29.
- Deschner EE, Ruperto J, Wong G, Newmark HL, 1991. 'Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia'. *Carcinogenesis*.12: 1193- 1196.
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F, 1999. 'Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs'. *Life Sci* 65: 337-353.
- Diane F,2001. Suzanne Hendrich and Weiqun Wang: Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 90(2-3), 157-177
- Dickson RB, Lippman ME, 1997. Cancer of the breast. In *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Fifth Edition, Ed: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p:1541-1557
- Dowdy SC, Mariani reinboiz MM, keeney GL, Spielberg TC, Podratz KC, Janknetcht R, 2005. Overexpression of the TGF-beta antagonist Smad7 in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*; 96: 368-73.
- Duffy MJ, 2004. Duggan C.The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer.*Clin Biochem*;37(7):541-8.
- Duthie SJ, Johnson W, Dobson VL, 1997. 'The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells'. *Mutat Res.* 390: 141–151.
- Eitzman DT, Fay WP, Ginsburg D, 1997. Plasminogen activator inhibitor-1. In: Richard C.Becker edit. *Textbook of Coronary Thrombosis and Thrombolysis*. Massachusetts, Kluwe Academic Pub; 65-77.
- Ercan E, Tengiz I, Duman C,2004. Decreased plasminogen activator inhibitor-1 levels in coronary artery aneurysmatic patients. *J Thromb Thrombolysis*; 17: 207-211.

- Erensoy N, Ssleyici B, Öztürk M, Ylmazer, Kaner G, Unal H, 1998. Amplification and overexpression of c-erbB-2 gene in breast carcinomas. *Breast*. 4(Suppl 1): S 55
- Erkoç Ş, Erkoç F, Keskin N, 2003. Theoretical Investigation of Quercetin and its Radical Isomers. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* 631, 141-146
- Erlund I, Meririnne E, Alfthan G, Aro A, 2001. "Plasma Kinetics and Urinary Excretion of the Flavanones Naringenin and Hesperetin in Humans After Ingestion of Orange Juice and Grapefruit Juice", *The Journal of Nutrition*, 131 235-241
- Etcheverry SB, Ferrer EG, Naso L, Rivadeneira J, Salinas V, Williams PA, 2008. Antioxidant effects of the VO(IV) hesperidin complex and its role in cancer chemoprevention. *J Biol Inorg Chem*; 13(3):435-47.
- Fazal F, Rahman A, Greensill J, Ainley K, Hadi SM, Parish JH, 1990. 'Strand scission in DNA by quercetin and Cu(II): identification of free radical intermediates and biological consequences of scission'. *Carcinogenesis*. 11: 2005–2008.
- Feng XH, Derynck R, 2005. Specificity and versatility in TGF-beta signaling through smads. *Annu Cell Dev Biol*; 21: 659-93.
- Ferriola PC, Cody V, Middleton EJR, 1989. 'Protein-kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationship'. *Biochem Pharmacol*. 38: 1617–1624.
- Foekens JA, Look MP, Peters HA, Von Putten WL, Portergen H, Klijn JGJ, 1995. Urokinase- type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1: predictors of poor response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer. *Natl Cancer Inst*; 87(10) 751-6
- Formica JV, Regelson W, 1995. 'Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids'. *Food Chem. Toxicol*. 33: 1061-1080.
- Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E, Mullikin JC, Wooster R, Stratton M, 2001. Cancer and genomics. *Nature* 409: 849-52
- Gao Z, Xu H, Chen X, Chen H, 2003. "Antioxidant Status and Mineral Contents in Tissues of Rutin and Baicalin Fed Rats", *Life Sciences*, 73 1599-1607
- Gee JM, Johnson IT, 2001. Polyphenolic Compounds: Interactions with the Gut and Implications for Human Health. *Current Medicinal Chemistry*. 8, 1245-1255
- Gelmann EP, 1998. Oncogenes in human breast Cancer. In *The Breast: Comprehensive management of benign and malignant Diseases*. Vol I. Ed: Bland KI, Copeland EM. WB Saunders Company, USA, p:499-517
- Graefe EU, Derendorf H, Veit M, 1999. 'Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans'. *Int. J Clin Pharmacol Ther*. 37: 219
- Grylewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J, 1987. 'On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids'. *Biochem. Pharmacol*. 36: 317-322.
- Guardia T, Rotelli AE, Juardez AO, Pelzer LE, 2001. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmacol*; 56(9):683-687.
- Gulati N, Laudet B, Zohrabian VM, Murali R, Jhanwar M, 2006. The antiproliferative effect of quercetin in cancer cells is mediated via inhibition of the PI3K-Akt/PKB pathway -*Uniyal Anticancer Research*; 26: 1177-1182

- Guo Y, Higazi AA-R, Arakelian A, Sachais BS, Cines D, Goldfarb RH, Jones TR, Kwaan H, Mazar AP, and Rabbani SA, 2000. A peptide derived from non-receptor binding region of urokinase plasminogen activator (uPA) inhibits tumor progression and angiogenesis and induces tumor cell death in vivo. *FASEB J*; 14: 1400-1410.
- Guthrie N, Gapor A, Carroll KK, 1997. Scientific Study-Tocotrienol and Breast Cancer. *Asia Pacific Journal Clinical Nutrition* 6, 41-45
- Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Heinonen IM, 1999. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem*;47:2274-2279.
- Han D-H, Tachibana H, Yamada K, 2001. Inhibition of Environmental Estrogen- Induced Proliferation of Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells by Flavonoids. *In Vitro Cell Developmental Biology-Animal* 37, 275-282, 71
- Harbeck N, Kates RE, Maxima PL, 2002. Enhanced Benefit from Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients Classified High-Risk according to Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. *Cancer Research*.; 62: 4617-4622.
- Harborne JB, Williams CA, 2000. "Advances in Flavonoid Research Since 1992 –a Review", *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- HC Kwaan, J Wang, K Svoboda, PJ Declerck, 2000. Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumour growth through inhibition of apoptosis. *Br J Cancer*;82:1702-1708.
- Herbert BS, Wright WE, Shay JW, 2001. Telomerase and breast cancer. *Breast Cancer Res* 3(3):146-9
- Hertog MGL, Fesken EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D, 1993. 'Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart diseases: the Zutphen Elderly Study'. *Lancet*. 342: 1007-1011.
- Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *J Agric Food Chem*; 40: 2379-2383.
- Heuvel van den, Harlow E, 1993. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* 262: 2050-4.
- Hirano T, Gotoh M, Oka K, 1994. 'Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells'. *Life Sci*. 55: 1061-1069.
- Ho A, Dowdy SF, 2002. Regulation of G1 cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetics & Development* 1: 47-52
- Hollman PC, Katan MB, 1999. 'Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability'. *Food Chem Toxicol*. 37: 937-942.
- Hosokawa N, Hirayoshi K, Kudo H, Takechi H, Aoike A, Kawai K, Nagata K, 1992. 'Inhibition of the activation of heat shock factor *in vivo* and *in vitro* by flavonoids'. *Mol Cell*. 12: 3490-3498.
- http://www.biotech.iitm.ac.in/faculty/dk_new/research.php.69
- Huang Z, Fasco MJ, Kaminsky LS, 1997. 'Inhibition of estrone sulfatase in human liver microsomes by quercetin, other flavonoids'. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 63: 9-15.
- Huang YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Huang JH, Kandaswami C, Middleton E, Lee MT, 1999. Effects of Luteolin and Quercetin, Inhibitors of Tyrosine Kinase, on Cell Growth and Metastasis-associated Properties in A431 Cells Overexpressing Epidermal Growth Factor Receptor. *British Journal of Pharmacology* 128, 999-1010

- Iavarone A, Garg P, Lasorella A, Hsu J, Israel MA, 1994. The helix-loop-helix protein Id2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. *Genes Dev*; 8: 1270-84.
- Ingrid BJL, Joseph John T, 1998. Isaacs. Macrophage role in the Anti prostatic Cancer Response to one class of antiangiogenic agents. *J National Cancer Inst*; 90 (21)
- Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y, 1999. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci*; 56:104-132.
- Ishidate JrM, HarnoisMC, Sofuni T, 1988. 'A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures'. *Mutat. Res.* 195: 151–213.
- Iwao K, Tsukamoto I, 1999. 'Quercetin inhibited DNA synthesis and induced apoptosis associated with increase in c-fos mRNA level and the upregulation of p21WAF1/CIP1 mRNA and protein expression during liver regeneration after partial hepatectomy'. *Biochim Biophys Acta.* 1427: 112-120.
- Iwashita K, Kobori M, Yamaki K, Tsushida T, 2000. 'Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells'. *Biosci Biotechnol Biochem.* 64: 1813-1820. *J Haematol.* 1999;105: 920-927.
- Jang CW, Chen CH, Chen CC, Chen JY, Su YH, Chen RH, 2002. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat Cell Biol*; 4: 51-8.
- Janicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harback N, 2001. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by uPA and PAI-1. *J. Natl Cancer Inst*; 93:913-920.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D, 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61(2):69–90.
- Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Wilson JK, Kinzler KW, Vogelstein B, 1994. Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res*; 54: 63-53-8.
- Johannes C Kirchheimer, Kurt Huber, Oswald Wagner, Bernd R Binder, 1987. Patterns of fibrinolytic parameters in patients with gastrointestinal carcinomas. *British J Haematol*; 66 85-89
- Kaklamani V, Badi L, romsan D, Liu J, Ellis N, Oddoux C, Oster H, Chen Y, Ahsan H, Offit K, Pasche B, 2004. No major association between TGFBR1*6A and prostate cancer. *BMC Genet*; 5: 28.
- Kaminska B, Wesolowska A, Danilkiewicz M, 2005. TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis. *ABP* 52(2): 329-337
- Kaneuchi M, Sasaki M, Tanaka Y, Sakuragi N, Fujimoto S, Dahiya R, 2003. 'Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1'. *Int J Oncol.* 22: 159-164.
- Kang TB and Liang NC, 1997. 'Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukaemia cells'. *Biochem Pharmacol.* 54: 1013-1018.
- Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M, 1999. 'Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines'. *Biosci Biotechnol Biochem.* 63:896-899.
- Kemomarsi K, Conte D.J, Toyofuku W, Fox MP, Scambia G, 1995. Deregulation of cyclin-E in breast cancer. *Oncogene*; 11:941-950
- Kim SG, Jong HS, Kim TY, Lee JW, Kim NK, Hong SH, Bang YJ, 2004. Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis through Fas ligand-independent activation of the Fas death pathway in human gastric SNU-620 carcinoma cells. *Mol Biol Cell*; 15: 420-34.

- Kim HK, Jeong TS, Lee MK, Park YB, Choi MS, 2003. "Lipid-lowering Efficacy of Hesperetin Metabolites in High-Cholesterol Fed Rats", *ClinicaChemica Acta*, 327 129-137
- Klijn JGM, Berns PMJJ, Schmits PLM, Foekens JA, 1992. The Clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev* 13:3- 17
- Kobayashi T, Nakata T and Kuzumaki T, 2002. 'Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells'. *Cancer Lett.* 176: 17-23.
- Kohler HP, Grant PJ, 2000. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med*; 342: 1792-1801.
- Koleske AJ, Young RA, 1994. "An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators", *Nature*, 368, 466
- Kopnin BP, 2000. Targets of onkogenes and tümör suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 1: 2-27.
- Krimperfort P, Ijpenberg A, Song JY, van der Valk M, Navijn M, Zevenhoven J, Berns A, 2007. A critical tumor suppressor in the absence of p16Ink4a. *Nature*; 448: 943-6.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, 2007. Neoplazi. Robbins Temel Patoloji. Ugur Çevikbas (ç. Ed.). 8. baskı, İstanbul: Nobel: 173-225.
- Kuntz S, Wenzel U, Daniel H, 1999. 'Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines'. *Eur J Nutr.* 38: 133-142.
- Kurebayashi JJ, 2001. Biological and clinical significance of her2 overexpression in breast cancer. *Breast Cancer* 8(1):45-51
- Küçükislamoğlu M, 1996. "Consolida armeniaca (Stapf ex Huth) Schröd. Bitkisi Çiçeklerinin Flavonoidleri Yönünden Analizi", Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon
- Lamson DW, Brignal MS, 2000. Antioxidants and Cancer III. *Alternative Medicine Review* 5, 196-208
- Lane DP, 1992. P53; guardian of the genome. *Nature* 358:15-16
- Larisch S, Yi Y, Lotan R, Kemer H, Ejmer IS, Tony Parks W, Gotfried Y, Birkey Reffey S, de Caestecker MP, Danjelpour D, Book-Melamed N, Timberg R, Ducked CS, Lechleider RJ, Steller H, Orly J, Kim SJ, Roberts AB, 2000. A novel mitochondrial septin-like protein ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat Cell Biol*; 2: 915-21.
- Lawn RM, Wade DP, Hammer RE, 1992. Atherogenesis in transgenic mice expressing human apolipoprotein (a). *Nature*; 360:670.
- Le Marchand L, 2002. "Cancer Preventive Effects of Flavonoids- A Review", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 296-301.
- Lee CJ, Wilson L, Jordan MA, Nguyen V, Tang J, Smiyun G, 2010. Hesperidin suppressed proliferations of both human breast cancer and androgen-dependent prostate cancer cells. *Phytother Res*; 24 Suppl 1:15-19.
- Lee CJ, Wilson L, Jordan MA, Nguyen V, Tang J, Smiyun G, 2010. Hesperidin suppressed proliferations of both human breast cancer and androgen-dependent prostate cancer cells. *Phytother Res*; 24 Suppl 1:15-19.

- Lee WR, Shen SC, Lin HY, Hou WC, Yang LL, Chen YC, 2002. 'Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca(2+)- dependent endonuclease'. *Biochem Pharmacol* 63: 225-236.
- Levy L, Hill CS, 2006. Alteration in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*: 17: 41-58.
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA, 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*; 24: 99-146.
- Li FX, Jin ZP, Zhao DX, Cheng LQ, Fu CX, Ma F, 2006. "Overexpression of The Saussurea Medusa Chalcone Isomerase Gene in S. Involucrata Hairy Root Cultures Enhances Their Biosynthesis of apigenin", *Phytochemistry*, 67, 553-560.
- Liao DJ, Dickson RB, 2000. C-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 7(3):143-164
- Lijnen HR, 2005. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost*; 3:35-45.
- Liu D, JA Ghiso, Y Estrada, L Ossowski, 2002. EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. *Cancer Cell*; 1:445-457.
- Liu D, Wang LH, 1994. Onkogenes, Protein Tyrosine Kinases, and Signal Transduction. *J Biomed Sci*. 2: 65-82.
- Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, 2002. Pooled Analysis of Prognostic Impact of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor PAI-1 in 8377 Breast Cancer Patients. *J Natl Cancer Inst*; 94:116.
- Lu, X., Jung, J.I., Cho, H.J, Lim, D.Y., Hyun, H.S., Chun, H.S., Kwon, D.Y., Park, J.H.Y., 2005. Fisetin Inhibits the Activities of Cyclin-Dependent Kinases Leading to Cell Cycle Arrest in HT-29 Human Colon Cancer Cells, *The Journal of Nutrition*, 135 (12), 2884-2890.
- Marion E, Look MP, Peters HA, Schmitt M, Br  nner N, Harbeck N, Klin JG, Foekens JA, 2004. Urokinase-Type Plasminogen Activator System in Breast Cancer Association with Tamoxifen in Recurrent Disease. *Cancer Res*, 1; 64(13) 4563-8
- Markovits J, Linassier C, Fosse P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, Saucier JM, Le Pecq JB, Larsen AK, 1989. 'Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II'. *Cancer Res*. 49: 5111-5117.
- Martens S, Mithofer A, 2005. "Flavones and Flavone Synthases", *Phytochemistry*, 66, 2399-2407.
- Massague J, 2008. TGFb in cancer. *Cell*: 134: 215-30.
- Massague J, 1998 TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*; 67: 753-91.
- Shi Y, Massague J, 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*; 113: 685-700.
- Middleton EJr, Kandaswami C, 1994. 'The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer'. In: Harborne JB, editor. *The flavonoids advances in research since 1986*. 1st edition. London: Chapman and Hall. 619-652.
- Middleton E, JR Kandaswami C, Theoharides TC, 2000. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev* 52, 673-751
- Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R, 1994. TGF-   induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptor. *J Cell Biol*; 127: 2021-36.

- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harsman K, 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266:66-71
- Miodini P, Fioravanti L, Fronzo GD, Cappelletti V, 1999. The Two Phyto-oestrogens Genistein and Quercetin Exert Different Effects on Oestrogen Receptor Function. *British Journal of Cancer* 80, 1150-1155
- Miyagi Y, Om AS, Chee KM, Bennink MR, 2000. 'Inhibition of azoxymethane-induced colon cancer by orange juice'. *Nutr Cancer*. 36: 224-249.
- Monograph, 1998. Quercetin. *Alternative Medicine Review*, 3, 140-143
- Moricke A, Reiter A, Zimmermann M, 2008. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival. *Blood*; 11: 4477- 89.
- Mustjoki S, 2001. Urokinase, urokinase receptor and ICAM s in human leukemia. Department of virology University of Helsinki, Academic Dissertation; 29-69.
- Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Komatsu H, Enya T, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, Wakabayashi K, 2000. 'Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: Structure-activity relationship'. *Jpn J Cancer Res*. 91: 686-691.
- Nalini N, Aranganathan S, Kabalimurthy J, 2012. Chemopreventive efficacy of hesperetin (citrus flavonone) against 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Toxicology Mechanisms and Methods*; 22(5): 397-408.
- Nass-Arden L, Breitbart H, 1990. 'Modulation of mammalian sperm motility
- Natalia V. Gorlatova I, Jacqueline M, 2007. Mechanism of Inactivation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 by a Small Molecule Inhibitor. *J Biol Chem*; 282:9288- 9296.
- Nguyen TT, Tran E, Nguyen TH, Do PT, Huynh TH, Huynh H, 2004. 'The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells'. *Carcinogenesis*. 25: 647-659.
- Norberg T, Jansson T, Sjogren S, Martensson C, Adreasson I, 1996. Overview on human breast cancer with focus on prognostic and predictive factors with special attention on the tumour suppressor gene p53. *Acta Oncologica* 35 (suppl 5):96-102
- Off M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E, 1996. TGF-beta and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev*; 10: 2462-77.
- Onat T. Emerk K. Sözmén EY, 2002. İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme yayıncılık 569-75.
- Ong, C.S., Tran, E., Nguyen, T.T.T., Ang, C.K., Lee, S.K. Lee, J.J. NG, C.P., Leong, C., Huynh, H, 2004. Quercetin-induced Growth Inhibition and Cell Death in Nasopharyngeal Carcinoma Cells Associated with Increase in Bad and Hypophosphorylated Retinoblastoma Expression. *Oncology Reports* 11, 727-733
- Osborne C, Wilson P, Tripathy D, 2004. Oncogene and tumor suppressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist*. 9:361-77
- Özmen V, Fidaner C, Aksaz E, Bayol Ü, Dede İ, Göker E, Güllüoğlu BM, Işıkdöğün A, Topal U, Uhri M, 2009. Türkiye'de meme kanseri erken tanı ve tarama programlarının hazırlanması-Sağlık Bakanlığı meme kanseri erken tanı ve tarama alt kurulu raporu. *Meme Sağlığı Dergisi*; 5(3)

- Öztürk M, Bolkent S, Yilmazer S, Kaner G, Unal H, 1998. Detection of c-erbB-2 mRNAs using diglabelled oligonucleotide probe with in situ hybridisation in human breast carcinoma: comparison with immunohistochemical results. *Anal Cell Pathol* 16(4):201-209
- Padua D, Massague J. Roles of TGF β in metastasis. *Cell Res* 2009; 19: 89-102.
- Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, Massague J, 2008. TGF- β primes breast tumors angiopoietin-like 4. *Cell*; 133: 66-77.
- Pardali K, Kurisaki A, Moren A, ten Dijke P, Kardassis D, Moustakis A, 2000. Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21 (Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*; 275: 29244-56.
- Pediconi N, Ianari A, Costanzo A, Belloni L, Gallo R, 2003. Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat Cell Biol.* 6:552-8.
- Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA, 2001. TGF-beta-induced apoptosis is mediated by adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol*; 3: 708-14.
- Perren TJ, 1991. CerbB2 oncogene as a prognostic marker in breast cancer. *Br J Cancer* 63:328-332
- Pethe V, Shekhar PV, 1999. Estrogen inducibility of c-Ha-ras transcription in breast cancer cells. Identification of functional estrogen-responsive transcriptional regulatory elements in exon 1./intron 1 of the cHa ras gene. *J. Biol Chem* 274 (43): 30969-30978
- Polyak K, 2002. Breast cancer gene discovery. <http://www.expertreviews.org>
- Pouget C, Lauthier F, Simon A, Fagnere C, Basly JP, Delage C, Chulia AJ, 2001, 'Flavonoids: Structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells'. *Bioorg Med Chem Lett.* 11: 3095-3097.
- Pucci B, Giordano A, 1999. Cell cycle and cancer. *Clin Ter.* 2:135-41.
- Pyke C, Graem N, Ralfkaer E, Ronne E, Hoyer-Hansen G, Brünner N, Dano K, 1993. Receptor for urokinase is present in tumor-associated macrophages in ductal breast carcinoma. *Cancer Res*; 53: 1911-1915 quercetin acidifies rat glial cells in vitro'. *Neurosci Lett.* 223: 121-124.
- Rasheed S, Harris S, Tekkis P, Turley H., Silver A, McDonald PJ, Talbot I, Glynn-Jones R, Northover J, Guenther T, 1998. "Microvessel Density and Carbonic Anhydrase-IX Expression in the Epithelial Cells with the Highest Proliferative Capacity", *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 46(4), 497-504
- Ratna WN, Simonelli JA, 2002. The Action of Dietary Phytochemicals Quercetin, Catechin, Resveratrol and Naringenin on Estrogen-mediated Gene Expression. *Life Science* 70, 1577-1589
- Reijerkerk A, Voest EE, Gebbink MFBG, 2000. No grip, no growth: the conceptual basis of excessive proteolysis in the treatment of cancer. *Eur J Cancer* 36: 1695-1705
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L, 2003. 'Flavonoids: Promising Anticancer Agents'. *Medicinal Research Reviews.* 4 (23): 519-534.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L, 2003. 'Flavonoids: Promising Anticancer Agents'. *Medicinal Research Reviews.* 4 (23): 519-534.
- Rodriguez EH, Grant MH, 1998. The Effects of the Flavonoids, Quercetin, Myricetin, and Epicatechin on the Growth and Enzyme Activities of MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Chemico-Biological Interactions* 116, 213-228

- Roman C, Saha D, Beauchamp D, 2001. "TGF- β and colorectal carcinogenesis", *Microscopy Research and Technique*, 52, 450
- Rong Y, Yang EB, Zhang K, Mack P, 2000. 'Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U937 in vitro and the regulation of heat shock proteins expression'. *Anticancer Res.* 20: 4339-4345.
- Ross JA, Kasum CM, 2002. Dietary flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects and Safety. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 19-34
- Sainsbury JR, Nicholson S, Angus B, Farndon JR, malcolm AJ, Harris AL, 1988. Epidermal growth factor receptor status of histological sub-types of breast cancer. *Br J Cancer* 8:458 460
- Saldamlı İ, 2007. Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara, 463-492.
- Salucci M, Stivala LA, Maiani G, Bugianesi R and Vannini V, 2002. 'Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2)'. *Br J Cancer.* 86: 1645-1651.
- Salvatore U, Enke B, Savatore S, 2009. The Urokinase Plasminogen Activator System: A Target for Anti-Cancer Therapy. *Current Cancer Drug Targets*; 9: 32-71.
- Samad F, Yamamoto K, Loskutoff DJ, 1996. Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. *J Clin Invest*;97:34-36.
- Samuelsen AB, 2000. 'The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review'. *J Ethnopharmacol.* 71: 1-21.
- Scherrer A, Wohlwend A, Kruithof E, 1999. Plasminogen activation in human acute leukemias. *J Haematol*;105: 920-927.
- Schmitt M, Wilhelm O, Janicke F, 1995. Urokinase type plasminogen activator (u-PA) and its receptor (CD87); a new target in tumor invasion and metastasis. *Obstet Gynecol*;21:51-65.
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, 2001. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill; 613-74.
- Selvamurugan N, Kwok S, Alliston T, Reiss M, Partridge NC, 2004. 'Transforming growth factor-beta 1 regulation of collagenase-3 expression in osteoblastic cells by cross between the Smad and MAPK signaling pathways and their components, Smad2 and Runx2'. *J Biol Chem.*, 279, 19327
- Senderowicz AM, 1999. 'Flavopiridol: The first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials'. *Invest New Drugs.* 17: 313-320.
- Senderowicz AM, 2001. 'Development of cyclin-dependent kinase modulators as novel therapeutic approaches for hematological malignancies'. *Leukemia.* 15: 1-9.
- Seoane J, Poupponnot C, Staller P, Schader M, Eilers M, Massague J, 2001. TGF- β influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitors p15INK4b. *Nat Cell Biol*; 3: 400-8.
- Shirley BW, 1996. "Flavonoid Biosynthesis: 'New' functions for an 'Old' Payhway", *Trends Plant Sci*, 1, 377-382.
- Siegel PM, Massague J, 2003. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*; 3: 807-21.
- Sierra A, Castellsague X, Escobedo A, Lloveras B, Garcia-Ramirez M, 2000. Bcl-2 with loss of apoptosis allows accumulation of genetic alteration: a pathway to metastatic progression in human breast cancer. *Int J Cancer* 89 (2):142-147

- Sirvent JJ, Fortuno Mar A, Olona M, Orti A, 2001. Prognostic value of p53 protein expression and clinicopathological factors in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A study of 192 patients Histol Histopathol 16 (1):99-106
- Sjoblom T, Jones S, wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, 2006. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science; 314: 268-74.
- Smith D, Toft D ,1993. Steroid receptors and their associated proteins. Mol Endocrinol 7:4 11
- So FV, Gurhrie N, Chambers A, Carroll KK, 1997. Inhibition of Proliferation of Estrogen Receptor-positive MCF-7 Human Breast Cancer Cells by Flavonoids in the Presence and Absence of Excess Estrogen. Cancer Letters 112, 127-133
- Society AC, 2007. Breast Cancer Facts & Figures 2007-2008. Atlanta
- Soliman KF, Mazzio EA, 1998. 'In vitro attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds'. Proc Soc Exp Biol Med. 218: 390–397.
- Somunoğlu S, 2009. Meme kanseri: belirtileri ve erken tanıda kullanılan tarama yöntemleri. Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi; 4(10): 103-122.
- Soyoz M, Ozcelik N, 2007. TGF- β (transforming growth factor beta) ve sinyal iletimi. Türkiye Klinikleri J Med Sci 27(4): 426-433
- Steinmetz K, Potter JD, 1991b. A review of vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. Cancer Causes Control; 2: 427–442.
- Steinmetz K, Potter JD,1996. Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. J Am Diet Assoc; 96: 1027–1039.
- Steinmetz K, Potter JD, 1991a. Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. Cancer Causes Control; 2: 325–357.
- Stephens RW, Nielsen HJ, Christensen IJ, Thorlacius-Ussing O, Sørensen S, Dano K, Brünner N, 1999. Plasma urokinase receptor levels in patients with colorectal cancer: relationship to prognosis. J Natl Cancer Inst; 91: 869-87.
- Strandberg L, Lawrence D, Ny T, 1988. The organization of the human plasminogen activator-inhibitor-1 gene. Implications on the evolution of the serine-protease inhibitor family. Eur J Biochem; 176: 609-616.
- Stuart H, Orkin David E, Fisher A,2009. Thomas Look Samuel E. Lux David Ginsburg David G. Nathan editors. The Molecular Basis of Fibrinolysis. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood, 7th Edition. Philadelphia. Saunders; 1425-1447.
- Sukardiman, Darwanto A, Tanjung M, Darmadi MO, 2000, 'Cytotoxic mechanism of flavonoid from Temu Kunci (Kaempferia pandurata) in cell culture of human mammary carcinoma'. Clin Hemorheol Microcirc. 23: 185-190.
- Suzuki S, Takada T, Sugawara Y, Muto T, Kominami R, 1991. 'Quercetin induces recombinational mutations in cultured cells as detected by DNA fingerprinting'. Jpn. J. Cancer Res. 82: 1061–1064.
- Tachibana I, Imoto M, Adjei PN, Gores GJ, Subramaniam M, Spelberg TC, Urrutia R, 1997. Overexpression of the TGF β -regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. J Clin Invest; 99: 2365-74.

- Tanaka T, Makita H, Kawabata K, Mori H, Kakumoto M, Satoh K, Hara A, Sumida T, Tanaka T, Ogawa H, 1997. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis*; 18(5):957-965.
- Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Hirose Y, Wang A, Mori H, Satoh K, Hara A, Ogawa H, 1994. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: comparison with the protective effect of beta-carotene. *Cancer Res*; 54(17):4653-4659.
- Tapiovaara H, Alitalo R, Vaheri A, 1996. Plasminogen activation on tumor cell surface and its involvement in human leukemia. *Cancer research*; 69:101-133.
- Tecimer C, Doering D, Goldsmith L, Meyer J, 2000. Clinical relevance of urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitor type 1 in ovarian cancer. *J Gynecol Cancer*; 10, 372-381.
- Ten Dijke P, Hill CS, 2004. New insights into TGF- β Smad signaling. *Trends Biochem Sci*; 29: 265-73
- Theillet C, Liderecu R, Escot C, Hutzell P, Brunet M, Gest J, Schlom J, Callahan R, 1986. Loss of a cHaras-1 allele and aggressive human primary breast carcinomas. *Cancer Res* 46:4776 4781
- Topuz E, Aydinler A, Dinçer M, 2003. Meme Kanseri. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi: 349-350.
- USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/Flav/flav.pdf> [Accessed on April 7, 2011]
- van Der Burg B, De Groot RB, Isbruk L, Kruijer W, DeLaat SWJ, 1992. Oestrogen directly stimulates growth factor signal transduction pathways in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:111-115
- Vaughan DE, 2005. PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost*; 3: 1879–1883.
- Volk C, Kempinski B, Kempinski OS, 1997. 'Inhibition of lactate export by quercetin acidifies rat glial cells in vitro'. *Neurosci Lett*. 223: 121–124.
- von Lintig FC, Dreilinger AD, Varki NM, Wallace AM, Casteel DE, Boss GR, 2000. Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 62(1):51-62
- Wakefield LM, Romerts AB, 2002. TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev*; 12: 22-9.
- Wakefield LM, Romerts AB, 2002. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev*; 12: 22-9.
- Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK, 1999. 'Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells'. *Eur J Cancer*. 35: 1517-1525.
- Wang S, Degroff VL, Clinton SK, 2003. Tomato and Soy Polyphenols Reduce Insulin-like Growth Factor-I-Stimulated Rat Prostate Cancer Cell Proliferation and Apoptotic Resistance in Vitro via Inhibition of Intracellular Signalling Pathways Involving Tyrosine Kinase, *Journal of Nutrition* 133, 2367-2376
- Wei YQ, Zhao X, Kariya Y, Fukata H, Teshigawara K, Uchida A, 1994. 'Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein'. *Cancer Res*. 54: 4952-4957.
- Wei YY, Chen YJ, Hsiao YC, Huang YC, Lai TH., Tang CH, 2008. "Osteoblasts-derived TGF-beta1 enhance motility and integrin upregulation through Akt, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in human breast cancer cells", *Mol Carcinog*, 47, 526

- Weinberg RA, 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323–30.
- Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H, 2000. ‘Dietary flavone is a potentapoptosis inducer in human colon carcinoma cells’. *Cancer Res.* 60: 3823-3831.
- Whittaker JL, Walker RA, Varley JM,1986. Differential expression of cellular oncogenes in benign and malignant human breast tissue. *Int J Cancer* 38:651-655
- Williams GM, 1992. DNA reactive and epigenetic carcinogens. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 44: 457–64.
- Williams GM 2001. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology*; 14:166 (1- 2):3-10.
- Williamson G, Manach C, 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* ;81:243S-255S.
- Winman B, 1995. Plasminogen aktivator inhibitor 1 in plasma. Its role in thrombotic disease. *Thromb Haemost*;74:71-76
- Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D,1994. Localization of a breast cancer susceptibility gene BRCA2 to chromosome 13q-12-13. *Science* 30(265)5181: 2088-90
- Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K,1986. Similarity of protein encoded by the human cerbB2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 319,230-234
- Yang M, Tanaka T, Hirose Y, Deguchi T, Mori H, Kawada Y,1997.Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary-bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Int J Cancer*; 73(5):719-724.
- Yarbro C, Wujcik D, Gobel BH, 2010. *Cancer Nursing: Principles and Practice.* Sudbury, Jones & Bartlett Learning; 74(2)
- Ye L, Chan FL, Chen S, Leung LK, 2012. The citrus flavonone hesperetin inhibits growth of aromatase-expressing MCF-7 tumor in ovariectomized athymic mice. *J Nutr Biochem*; 23(10): 1230-1237.
- Yeh MH, Kao ST, Hung CM, Liu CJ, Lee KH, Yeh CC, 2009.Hesperidin inhibited acetaldehyde-induced matrix metalloproteinase-9 gene expression in human hepatocellular carcinoma cells. *xicol Lett*; 184(3):204-210.
- Youlden DR, Cramb SM, Dunn NA, Muller JM, Pyke CM, Baade PD,2012. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol*, 36(3):237–248.
- Zarebczan B, Pinchot SN, Kunnimalaiyaan M, Chen H, 2011. Hesperetin, a potential therapy for carcinoid cancer. *The American Journal of Surgery*; 201: 329–333.
- Zeback R, Dressler K, Hess D,1989. “Flavonoid Compounds from Polen and Stigma of *Petunia hybrida*: Inducers of the vir region of *Agrobacterium tumefaciens* Ti Plasmid”, *Plant Sci.*, 62, 83-91.
- Ziegler RG, Mayne ST, Swanson CA,1996. Nutrition and lung cancer. *Cancer Causes Control*; 7: 157–177.
- Zukerberg LR, Yang WL, Gadd M, Wooster R ,1995. Cyclin d1 (prad1) protein expression in breast cancer: approximately one third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. *Mol Pathol* 8:560-567

7.EKLER

EK A: Etik Kurulu Kararı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2012/11

Toplantı Tarihi : 31.10.2012

Karar Sayısı 2012/194 Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Ali ÜNLÜ'nün, "TGF- β , Hesperidin ve Quercetin'in MCF-7 Hücresinin uPA Aktivitesi Üzerine ve PAI-1 Ekspresyonuna Etkisi" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 18.10.2012 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Prof.Dr. Ali ÜNLÜ'nün, "TGF- β , Hesperidin ve Quercetin'in MCF-7 Hücresinin uPA Aktivitesi Üzerine ve PAI-1 Ekspresyonuna Etkisi" adlı araştırmanın kabulüne, BAP desteği alındıktan sonra protokolün dosyaya ilave edilmek üzere Etik Kurul sekreteryasına teslim edilmesine oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR
31.10.2012

Mahmut KESKİ
Sekreterya


8. ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Konya’da doğdu. 2008 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2011 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.