



**İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA
(MCF-7) AKT İNHİBİTÖRÜNÜN APOPTOZİS
ÜZERİNE ETKİSİ**

Ahmet KARAKUŞ

Danışman: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Doktora Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

2022

(Her hakkı saklıdır)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA (MCF-7) AKT İNHİBİTÖRÜNÜN
APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ**

(Effect of AKT Inhibitor on Apoptosis In Human Breast Cancer (MCF-7) Cell Line)

DOKTORA TEZİ

Ahmet KARAKUŞ

Danışman: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Erzurum
Şubat, 2022

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA (MCF-7) AKT İNHİBİTÖRÜNÜN
APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ

Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN danışmanlığında, Ahmet KARAKUŞ tarafından hazırlanan bu çalışma, 16/02/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Genetik Bilim Dalı'nda doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Mesut TAŞKIN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ <i>Erzurum Teknik Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Ahmet ALTAY <i>Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim
Kurulunun .../.../... tarih
ve ... sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2018-6650

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN danışmanlığında sunulan “İnsan Meme Kanseri (MCF-7) Hücre Hattında AKT İnhibitörünün Apoptozis Üzerine Etkisi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	15	30
Kuramsal Temeller	14	30
Materyal ve Yöntem	18	35
Bulgular	8	20
Tartışma	4	20
Tezin Geneli	13	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Ahmet KARAKUŞ	Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN
28.2.2022	28.2.2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmamın hazırlanması süres icinde, engin bilgisi ve tecrübesiyle bana yol gösteren ve çalışmalarım süresince bana her türlü imkânı ve desteği sağlayan değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a,

Tez çalışmalarım esnasında değerli fikirlerini paylaşan, Tez İzleme Komitesi üyeleri Atatürk Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a,

Vermiş oldukları destekten dolayı Atatürk Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Çalışmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen ve her daim yanımda olan sevgili eşim Sevgi ÜNAL KARAKUŞ'a, evimizin neşesi oğlum Alptuğ KARAKUŞ'a ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu doktora tezi Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FDK-2018-6650 numaralı ve "İnsan Kanseri Hücre Hatlarında AKT-1-2 İnhibitörünün Apoptotik Yollar Üzerindeki Etkisinin Araştırılması" başlıklı proje ile alınan destek kapsamında Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN danışmanlığında hazırlanmıştır. Çalışmaya desteklerinden dolayı Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Ahmet KARAKUŞ

ÖZET

DOKTORA TEZİ

İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA (MCF-7) AKT İNHİBİTÖRÜNÜN APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ

Ahmet KARAKUŞ

Danışman: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Amaç: Bu çalışmada, AKT fosforilasyonunu inhibe eden bir benzimidazol bileşiği olan AKT inhibitörü-IV (5-(2-Benzotiazolil)-3-etil-2-[2-(metilfenilamino)etenil]-1-fenil-1H-benzimidazolyum iyodür)'ün MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı üzerine sitotoksik ve apoptotik etkilerinin meme kanseri tedavisinde kemoterapötik ilaç olarak kullanılan tamoksifenle kıyaslanarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Amacımız kapsamında, MCF-7 hücreleri hücre kültür ortamında çoğaltıldı ve etkilerini araştırmak istediğimiz AKT inhibitörü-IV'ün 0,1, 1, 1,5, 2,5 ve 5 μM 'lık konsantrasyonları ve tamoksifenin 5, 10, 25 ve 50 μM 'lık konsantrasyonları ile muamele edildi. Ardından yapılan MTT testi ile MCF-7 hücrelerinin % canlılık oranları ve uygulanan her iki test örneği de gruplarının IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Sonrasında test bileşiklerinin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisi kolorimetrik olarak CDDE yöntemi ile analiz edilmiştir. Test bileşiklerinin apoptotik yollarda görev alan AKT, BCL-2, BAX ve Kaspaz-3 gen ekspresyonları üzerine etkisi ise Real-Time PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: AKT inhibitörü-IV ve tamoksifen uygulanan MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığının doza bağımlı olarak azaldığı belirlenmiştir. IC_{50} değerleri AKT inhibitörü-IV için 1,1 μM , tamoksifen için ise 5,2 μM olarak hesaplanmıştır. MCF-7 hücrelerine uygulanan tedaviler apoptoz oranını önemli oranda artırmıştır. Apoptozun kolorimetrik değerlendirmesi sonucunda AKT inhibitörü-IV ve tamoksifen uygulanan hücrelerde kontrol grubu hücrelerine kıyasla apoptozun sırasıyla 5,9 ve 3,65 kat arttığı gözlenmiştir. Ayrıca her iki tedavi grubunda da, BCL-2 ve AKT gen ifadesini azaldığı, BAX ve Kaspaz-3 gen ifadelerinin arttığı belirlenmiştir.

Sonuç: Kanser tedavisinde son yıllarda yeni teröpatiklerin keşfi ve etkinliğinin araştırılması önem arz etmektedir. Bu çalışma ile AKT inhibitörü-IV'ün *in vitro* ortamda MCF-7 hücreleri üzerinde güçlü sitotoksik etkinliğe sahip olduğu, hücreleri apoptotik hücre ölümüne yönlendirdiği ve bazı apoptotik gen ekspresyonları üzerinde önemli etkilere sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: meme kanseri, AKT inhibitörü-IV, tamoksifen, sitototoksisite, apoptozis.

Şubat 2022, 96 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

EFFECT OF AKT INHIBITOR ON APOPTOSIS IN HUMAN BREAST CANCER (MCF-7) CELL LINE

Ahmet KARAKUŞ

Supervisor: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Purpose: In this study, it was aimed to determine the cytotoxic and apoptotic effects of AKT inhibitor-IV, a benzimidazole compound that inhibits AKT phosphorylation, on MCF-7 human breast cancer cell line by comparing with tamoxifen, which is used as a chemotherapeutic drug in the treatment of breast cancer.

Method: Within the scope of our purpose, MCF-7 cells were grown in cell culture medium and treated with various concentrations AKT inhibitor IV (0,1, 1, 1,5, 2,5 and 5 μM) and tamoxifene (5, 10, 25 and 50 μM). Changes in cell viability percentages of AKT inhibitor-IV and tamoxifen treated MCF-7 cells were determined by MTT assay, and half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) calculated. Afterwards, the effect of test compounds on apoptotic cell death was analyzed colorimetrically by CDDE method. The effect of test compounds on the expression of AKT, BCL-2, BAX and Caspase-3 genes involved in apoptotic pathways was evaluated by Real-Time PCR method.

Findings: It was determined that the cell viability decreased in a dose-dependent manner in MCF-7 cells treated with AKT inhibitor-IV and tamoxifen, and the IC₅₀ values were calculated as 1,1 μM for AKT inhibitor-IV and 5.2 μM for tamoxifen. Both test samples applied to MCF-7 cells significantly increased the rate of apoptosis. As a result of the colorimetric evaluation of apoptosis, it was observed that apoptosis increased 5.9 and 3.65 times, respectively, in AKT inhibitor-IV and tamoxifen-treated MCF-7 cells compared to control group cells. In addition, it was determined that BCL-2 and AKT gene expression decreased and BAX and Caspase-3 gene expressions increased in both treatment groups.

Results: In the treatment of cancer, it is important to discover new therapeutic agents and to investigate their efficacy in recent years. With this study, it was concluded that AKT inhibitor-IV has strong cytotoxic activity on MCF-7 cells *in vitro*, directs cells to apoptotic cell death and has significant effects on some apoptotic gene expressions.

Keywords: breast cancer, AKT inhibitor IV, tamoxifen, cytotoxicity, apoptosis.

February 2022, 96 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
GİRİŞ.....	1
Kanser	1
Kanserin Tarihiçesi	1
Kanser Morbidite ve Mortalitesi	2
Kansere Sebep Olan Faktörler	4
Genetik özellikler	4
Enfeksiyonlar ve virüsler	4
Radyasyona maruziyet	4
Hormonlar	4
Toksik kimyasal maddelere maruziyet.....	5
Diyet.....	5
Sigara ve alkol kullanımı	5
Kanser Hücrelerinin Sağlıklı Hücrelerden Temel Farkları	5
Morfolojik farklılıklar	5
Moleküler farklılıklar	6
Metabolik farklılıklar	7
Kanserin Moleküler Biyolojisi ve Mekanizmaları.....	8
Kanser genleri	8
Büyüme faktörlerinden bağımsızlık.....	9
Büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık.....	10
Apoptozisten kaçış	10
Anjiyogenez	10
Ölümsüzlük	11

Metastaz	11
Enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi	11
Meme Dokusu	12
Meme Histolojisi	12
Parankima dokusu	12
Bazal membran.....	13
Meme Kanseri	13
Meme Kanseri Evreleri	14
Meme Kanseri İçin Risk Faktörleri.....	15
Genetik olmayan ve değiştirilemez risk faktörleri	15
Genetik olmayan ve değiştirilebilir risk faktörleri	17
Genetik risk faktörleri	18
Meme Kanserinin Tedavisi	19
Cerrahi.....	19
Radyoterapi	20
Kemoterapi	20
Hormonal tedavi.....	20
Hedefe yönelik tedavi	20
MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı.....	21
Apoptozis (Programlanmış Hücre Ölümü)	22
Apoptoz Morfolojisi.....	22
Apoptoz Mekanizması	23
Ekstrinsik apoptoz yolak.....	24
İntrinsik mitokondriyal yolak.....	24
Apoptozis ve Karsinogenez	25
Pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein dengesinin bozulması	25
BCL-2 protein ailesi.....	26
p53.....	26
Apoptoz proteinleri inhibitörü (IAP'ler)	26
Kaspazlar.....	27
Karsinogenezde PI3K/AKT/mTOR Sinyali.....	27
Karsinogenezde AKT'nin Rolü	29
Normal Hücre Fizyolojisinde AKT'nin Rolü	31
AKT İnhibitörleri	32
AKT inhibitörü-IV	32

Tamoksifen.....	33
Çalışmanın Amacı.....	34
KURAMSAL TEMELLER.....	35
MATERYAL VE YÖNTEM	41
Materyal	41
Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Cihazları.....	41
Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	42
Çalışmada Kullanılan Kitler.....	42
Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	43
Hücre Hattı	43
Metod	43
Hücre Kültürü.....	43
Hücre pasajlama ve saklama	43
Hücre sayımı	44
Mikroplakalara hücrelerin ekilmesi	45
Hücrelerin test bileşikleri ile muamelesi.....	45
Hücre Canlılığının ve <i>In Vitro</i> Sitotoksitenin Belirlenmesi	46
Etkin dozun (IC ₅₀) belirlenmesi	47
Apoptozun Kolorimetrik Olarak Belirlenmesi (CDDE)	47
Yöntemin prensibi.....	47
Kit içeriği	48
Örneklerin hazırlanması	49
CDDE protokolü	49
Apoptotik Gen Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi	50
Hücre kültüründen total RNA izolasyonu.....	50
Primer dizaynı	52
Real-Time PCR.....	53
ARAŞTIRMA BULGULARI	55
MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	55
IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi.....	56
RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	56
Apoptozisin Kolorimetrik Değerlendirmesine Ait Bulgular.....	57
Gen Ekspresyonlarına Ait Bulgular	58
TARTIŞMA ve SONUÇ	61
KAYNAKLAR.....	65



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Kanserde PI3K/AKT/mTOR Yolağındaki Değişimler	28
Tablo 2. Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Cihazları	41
Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	42
Tablo 4. Çalışma Kapsamında Kullanılan Kitler	42
Tablo 5. Çalışma Kapsamında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	43
Tablo 6. Çalışma Kapsamında Kullanılan MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattının Özellikleri	43
Tablo 7. cDNA Sentezi İçin Termal Cycler Cihazı Programı	52
Tablo 8. Çalışmalarda Ekspresyon Düzeyi Araştırılan Genlere Ait Primer Bilgileri.....	53
Tablo 9. Ekspresyon Düzeyi Araştırılacak Genlere Ait Amplifikasyonu İçin PCR Reaksiyon Karışımı	53
Tablo 10. Real-Time PCR İşlemi Parametreleri	54
Tablo 11. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerine Uygulanan Maddelerin IC ₅₀ Değerleri (Ortalama değerler ± standart sapma)	56
Tablo 12. Kontrol Grubu, AKT İnhibitörü-IV ve Tamoksifen Uygulanan MCF-7 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların Saflık Dereceleri ve Konsantrasyonları	57
Tablo 13. AKT, BCL-2, BAX ve Kaspaz-3 Genlerine Ait mRNA Ekspresyonu Oranları	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Erkeklerde kanser türlerine göre yaklaşık insidans ve mortalite sayısı	3
Şekil 2. Kadınlarda kanser türlerine göre yaklaşık insidans ve mortalite sayısı	3
Şekil 3. Normal hücre ve kanser hücresi morfolojileri	6
Şekil 4. Normal ve kanser hücrelerinde/dokularında metabolik farklılıklar	7
Şekil 5. Kanser hücrelerinin büyüme faktörlerinden bağımsızlığı	9
Şekil 6. Meme anatomisi ve yapısı	12
Şekil 7. Meme kanseri evreleri	15
Şekil 8. Meme kanseri için risk faktörleri	19
Şekil 9. MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin mikroskopik görüntüsü	22
Şekil 10. Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik yolları	23
Şekil 11. Apoptozun bozulmasına ve karsinogeneze katkıda bulunan mekanizmalar	25
Şekil 12. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağına dâhil olan anahtar moleküller	29
Şekil 13. AKT'nin aktivasyonu ve negatif regülasyonu	31
Şekil 14. AKT inhibitörü-IV'ün kimyasal yapısı	33
Şekil 15. Tamoksifenin kimyasal yapısı	34
Şekil 16. Neubauer lamının üzerinde yer alan kareler	45
Şekil 17. 96'lık mikroplaka düzeni	46
Şekil 18. MTT ve formazan ürününün kimyasal yapısı	46
Şekil 19. AKT inhibitörü-IV ve tamoksifen uygulanmış MCF-7 hücrelerine ait MTT uygulanmış 96'lık mikroplaka düzeni	47
Şekil 20. Apoptozisin kolorimetrik olarak belirlenmesi (CDDE) prensibinin şematik gösterimi	48
Şekil 21. AKT inhibitörü IV'ün MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine uygulanan farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi	55
Şekil 22. Tamoksifenin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine uygulanan farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi	56
Şekil 23. Tamoksifen ve AKT inhibitörü-IV'ün MCF-7 meme kanser hücrelerindeki apoptotik etkisi	57
Şekil 24. AKT geninin β -actin'e bağlı ait ekspresyon seviyeleri	58
Şekil 25. BAX geninin β -actin'e bağlı ait ekspresyon seviyeleri	59
Şekil 26. BCL-2 geninin β -actin'e bağlı ait ekspresyon seviyeleri	59
Şekil 27. Kaspaz-3 geninin β -actin'e bağlı ait ekspresyon seviyeleri	60

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

4E-BP1	: Ökaryot translasyon başlatma faktörü 4E bağlayıcı proteini
β -aktin	: Beta aktin
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
μl	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram
M	: Molar
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ABTS	: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
AKT	: Protein kinaz B
ATP	: Adenozin 3'-trifosfat
BAXBAX	: BCL-2-ilişkili X
BCL-2	: B hücreli lenfoma-2
bç	: Baz çifti
CARD	: Kaspazları organize eden bölge
Cdk	: Siklin bağımlı kinaz
Cdk4/6	: Siklin bağımlı kinaz 4/6
Cdk1	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
cDNA	: Komplamenter DNA
cm^2	: Santimetrekare
CO_2	: Karbondioksit
DCIS	: Duktal karsinoma in situ
dH ₂ O	: Distile su
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye edilmiş eagle
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DISC	: Ölüm indükleyici sinyalleme kompleksi
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	: Eritelden mezenkime geçiş

ER	: Östrojen reseptörü
ER+	: Östrojen reseptörü pozitif
ER-	: Östrojen reseptörü negatif
ESM	: Ekstraselüler matriks
FADD	: Fas ile ilişkili ölüm bölgesi
FBS	: Fetal sığır serumu
g	: Gram
GLUT	: Glukoz taşıyıcı protein
GSK-3 β	: Glikojen sentaz kinaz-3 β
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2
HIF-1	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1
IAP	: Apoptoz proteinlerinin inhibitörü
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IC ₅₀	: İnhibe edici konsantrasyon 50
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
LCIS	: Lobüler karsinoma in situ
mg	: Miligram
miRNA	: MikroRNA
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Messenger (haberci) ribonükleik asit
mTOR	: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NOS	: Nitrik oksit sentaz
PBS	: Fosfat buffered salin
PDK1	: Fosfoinositid bağımlı kinaz-1
PI3K	: Fosfatidil inozitol-3 kinaz
PIP2	: Fosfatidil inozitol 4,5-bisfosfat
PIP3	: Fosfatidil inozitol 3,4,5-trifosfat
PMSF	: Fenil metil sülfonil florür
PP2A	: Protein fosfataz 2A
PR	: Progesteron reseptoörü
PTEN	: Fosfat ve tensin homologu

Rb	: Retinoblast proteini
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
S473	: Serin473
S6K1	: Ribozomal protein S6 kinaz beta-1
SEEM	: Seçici östrojen enzim modölatörleri
SERM	: Seçici östrojen reseptör modölatörleri
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
T308	: Tirozin308
Tam	: Tamoksifen
TGF	: Transforming büyüme faktörü
Tm	: Ayrılma sıcaklığı
TNF	: Tümör nekroz faktör
TNFR-1	: Tümör nekroz faktör reseptörü-1
TORC1	: Rapamisin kinaz kompleksi-1'in hedefi
TRADD	: TNFR-1 ile ilişkili ölüm bölgesi
TSP-1	: Trombospondin-1 proteini
UV	: Ultraviyole
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

GİRİŞ

Kanser

Kanser, bir doku veya organdaki hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalmasıyla ve sonrasında genellikle vücudun diğer dokularına metastazı ile karakterize olan bir hastalıktır (Jackson and Loeb 2001).

Yapılan bilimsel çalışmalar kanserin genetik kökenli bir hastalık olduğunu ve deoksiribonükleik asit (DNA)'te meydana gelen mutasyonlardan kaynaklandığını ortaya koymaktadır. DNA'da meydana gelen bu mutasyonlar kanser hücrelerinin, normal hücrelerde bulunan düzenli ve kontrollü bir şekilde büyümeyi ve çoğalmayı sağlayan mekanizmalardan kaçarak kendi hayatta kalma mekanizmalarının oluşumuna neden olmaktadır. DNA'da mutasyonların oluşmasının akabinde, tümör başlangıcı, tümör oluşumu, malignansi dönemi ve tümör metastazı olmak üzere temel olarak dört farklı süreç meydana gelir (Hahn and Weinberg 2002). Tümör başlangıcı, fiziksel ve kimyasal faktörler ile DNA arasındaki etkileşimlerin sonucunda DNA'da meydana gelen genetik değişimler ile tetiklenir. Bu genetik değişimler geri dönüşümsüz olup bu değişikliğe sahip hücrelerin malign (kötü huylu) olma olasılığı normal hücrelere kıyasla daha fazladır. DNA'sında mutasyon taşıyan hücrelerin, hücre bölünmesi sırasında tümör baskılayıcı genleri veya DNA tamir mekanizmasında rol alan proteinleri kodlayan genleri inaktif hale getirebilecek yeni mutasyonlar oluşturma ihtimali oldukça yüksektir. Oluşan bu mutasyonlar ise genomik stabilizasyonun bozulmasına ve akabinde kanser oluşumuna yol açabilmektedir (Hanahan and Weinberg 2000; Ueno *et al.* 2003; Bayrak 2010).

Oldukça karmaşık bir sürece sahip olan kanserin günümüzde kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Kanser tedavisinde başta radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi yöntemler kullanılmakla beraber bunlara ek olarak hedefe yönelik ilave uygulamalar (beslenme alışkanlıklarının düzenlenmesi, spor ve stressiz bir yaşam tarzı, hedefe yönelik ilaçlar gibi) tedavinin başarısı için önemlidir (Huang *et al.* 2010; Nettore *et al.* 2018; Serda *et al.* 2018).

Kanserin Tarihçesi

Kanseri ilk olarak tıbbın babası olarak bilinen Yunan hekim Hipokrat (M.Ö. 460-370) Yunanca'da yengeç anlamına gelen "karkinos" olarak tanımlamıştır. Daha sonra Romalı hekim Celsus (M.Ö. 28-50) bu kelimeyi Latince yengeç anlamına gelen "kanser" terimine çevirmiştir (Karpozilos and Pavlidis 2004; Anonymus 2012). 17. yüzyıla gelindiğinde yapılan çalışmaların ışığında insanoğlu kanserle bilimsel olarak ilk defa tanışmıştır. Patolojinin babası olarak anılan

Giovanni Morgagni (1682-1771) yapmış olduğu otopsilerde ölümün patolojik nedenlerini araştırarak onkoloji çalışmalarının temelini atmıştır İskoç bilim adamı John Hunter (1728-1793) bazı kanser türlerinin cerrahi operasyonlar ile düzeltilebileceğini öne sürmüştür (Bayrak 2010).

19. yüzyılın başlarında mikroskopun icadı ile kanser çalışmaları hız kazanmış ve onkoloji bilimi doğmuştur. Hücresel ve modern patolojinin kurucularından Rudolw Virchow (1821-1932) çalışmaları ile modern patoloji ve onkolojiyi bir araya getirmiştir. Böylece, hem kanser patolojisinde hem de kanser cerrahisinde önemli gelişmeler yaşanmıştır. Cerrahi operasyonlar ile vücuttan alınan parçalar ile hastalıkların kesin tanısı konulmaya başlanmıştır (Bayrak 2010).

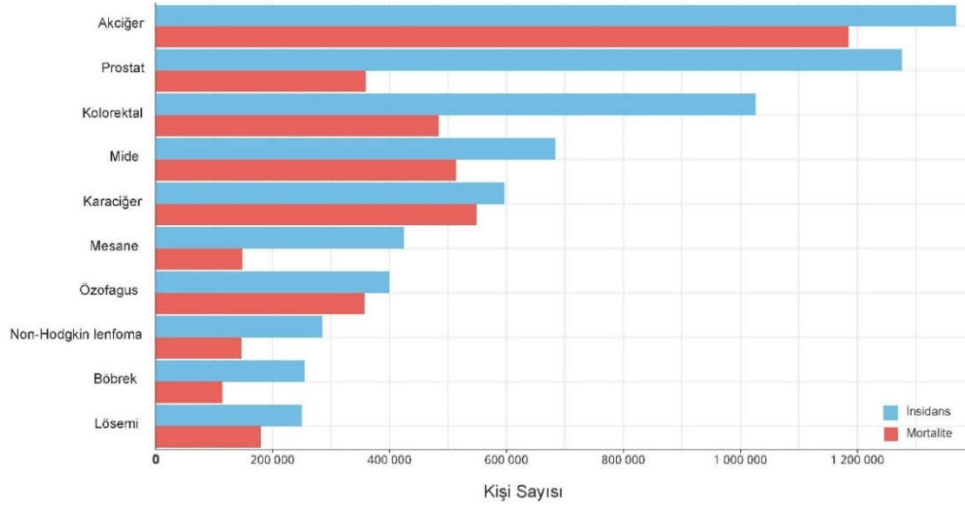
İlk olarak vücutta oluşan bir hastalık olarak görülen kanser, sonrasında bir doku hastalığı ve zamanla hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile oluşan bir hücre hatta çekirdek hastalığı olarak ele alınmaya başlanmıştır. 20. yüzyılın başlarında, kanser ile ilgili çalışmalar hız kazanmış, tedavideki bilgiler hızla artmaya ve gelişmeye başlamıştır. Daha sonraları ortaya çıkan ve günümüzde de uygulanan kemoterapi ile tedavi yöntemleri değişmiştir. Daha güncel bir tedavi olan immunoterapi ile organizmanın kendi tümör hücrelerini öldürmesi amaçlanmıştır. Bu tedavi yöntemlerine ek olarak günümüzde kişiye özgü tedaviler ön plana çıkmakta ve kanser tedavisine katkı sunmaktadır (Smith *et al.* 2015).

Kanser Morbidite ve Mortalitesi

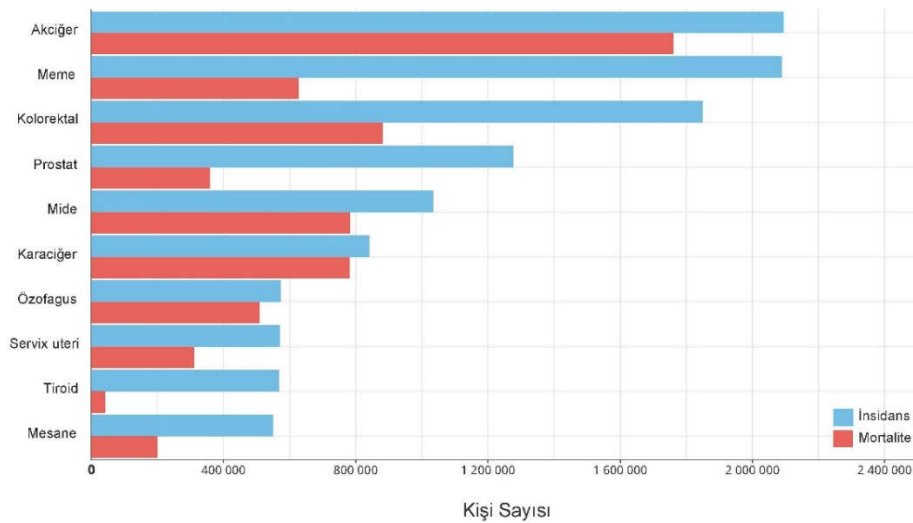
Kalp damar hastalıklarından sonra ikinci ölüm sebebi olan kanser günümüzün en önemli sağlık problemlerinden bir tanesidir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'nın (IARC) referans aldığı Globocan veritabanı, 2018 yılında dünya genelinde yaklaşık 18,1 milyon yeni kanser vakası ve buna bağlı 9,6 milyon kanser ölümünün meydana geldiğini bildirmiştir (WHO 2018; Ferlay *et al.* 2019). Kanser toplumsal yükünün düşük ve orta gelir seviyesine sahip ülkelerde nüfus yoğunluğuna bağlı olarak 2010 ve 2030 yılları arasında 13,3 milyondan 21,4 milyon vaka düzeyine artışı öngörülmektedir (McCormack and Boffetta 2011). Kanser vakalarındaki bu artış, hızlı sosyoekonomik gelişmelere bağlı olarak değişen yaşam tarzı ile kanser risk faktörlerine maruziyetin ve özellikle ileri yaş popülasyonunun artması gibi çeşitli sebeplerden kaynaklanmaktadır (Bray *et al.* 2018; WHO 2018). Dünya genelinde her beş erkekten birinin ve altı kadından birinin yaşam süresince kansere maruz kalacağı ve bu hastalığa sahip her sekiz erkekten birinin ve on bir kadından birinin hayatlarını kaybedeceği öngörülmektedir (WHO 2018).

Akciğer kanseri, erkeklerde en sık teşhis edilen kanserdir (erkeklerde toplam vakaların %14,5'i ve kadınlarda % 8,4'ü) ve erkeklerde kanser ölümünün önde gelen nedenidir (%22,0). Akciğer kanserini erkeklerde görülme sıklığına göre prostat kanseri (%13,5) ve kolorektal kanser (%10,9); mortalite durumuna göre karaciğer kanseri (%10,2) ve mide kanseri (%9,5) takip etmektedir (Şekil 1) (Globocon 2018).

Kadınlarda meme kanseri en sık teşhis edilen kanser türüdür (%24,2). Ayrıca meme kanseri kadınlarda kansere bağlı ölüm sebebi olarak ilk sırada (%15,0) yer alır. Bunu ikinci ve üçüncü en sık görülen kanser türlerinden akciğer kanseri (%13,8) ve kolorektal kanser (%9,5) takip etmektedir. Serviks kanseri ise görülme sıklığı (%6,6) ve mortalite (%7,5) bakımından dördüncü sırada yer almaktadır (Şekil 2) (Globocon 2018).



Şekil 1. Erkeklerde kanser türlerine göre yaklaşık insidans ve mortalite sayısı (Globocon 2018)



Şekil 2. Kadınlarda kanser türlerine göre yaklaşık insidans ve mortalite sayısı (Globocon 2018)

Kansere Sebep Olan Faktörler

Genetik özellikler

Normal hücrelerin çekirdek, hücre zarı ve sitoplazmasında bulunan, kontrollü büyüme ve çoğalmayı sağlayan birçok gen ve protein, kanser hücrelerinde kontrol mekanizmalarının bozulması sonucu hücrelerin anormal olarak bölünmesine neden olmaktadır (Futreal *et al.* 2001).

Enfeksiyonlar ve virüsler

Enfeksiyonlar, kanserin en önemli nedenlerinden birisidir. 2002 yılında tüm malignitelerin %18'inin bulaşıcı ajanlardan kaynaklandığı tahmin edilmiştir. Enfeksiyonla ilişkili neoplazmalar arasında, mide, karaciğer ve serviks kanserleri en yüksek insidans rakamlarına sahiptir ve büyük ölçüde sırasıyla *Helicobacter pylori*, Hepatit B ve C virüsleri ve insan papilloma virüsü kaynaklı olduğu bildirilmektedir (De Martel and Franceschi 2009). İnsan vücuduna giren onkogenik virüsler, uygun koşullarda hücrenin genetik yapısını değiştirmek suretiyle hücrenin kontrolsüz olarak çoğalmasına ve kanserli dokuya dönüşmesine neden olabilmektedir (Allen *et al.* 2009).

Radyasyona maruziyet

Radyasyon, ısı, güneş ışığı kansere sebep olan unsurlar arasında yer almaktadır. İyonize radyasyon ışınları gibi ışınlar (UV, X, gama ışınları vb.) biyolojik yapılara doğrudan etki edebilecek yeterli kuantum enerjisine sahip olduklarından biyolojik yapılardan elektron kopartabilirler (Yokuş ve Çakır 2002). Bu durum ise DNA'nın yapısında tek ve çift zincir kırıkları ile baz modifikasyonlarına neden olur.

Hormonlar

Hormonlar, kadınlarda endometriyum, meme ve yumurtalık kanserleri ve erkeklerde prostat kanseri dâhil olmak üzere dünya çapında en yaygın görülen kanserlerin çoğunun etiolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Hormonlar, hücre bölünmesini, farklılaşmasını ve hassas hücrelerin sayısını kontrol ederek kanser riskini etkileyen ana mekanizmalardandır. Hormonların rahimdeki hücre bölünmesi üzerinde çok belirgin etkileri bulunmaktadır. Örnek olarak, östrojen hormonu mitozu uyarırken, progesteron hormonu mitozu durdurabilmektedir (Key 1995).

Toksik kimyasal maddelere maruziyet

Çevresel kirleticiler, endüstriyel ürünlerin neden olduğu atıklar, bakır, civa kurşun gibi ağır metaller, besinlerde bulunan katkı maddeleri, zararlı organizmaları engellemek için kullanılan pestisidler gibi kimyasal veya biyolojik toksik maddeler canlılar üzerinde doğrudan ya da dolaylı etki gösterebilmektedir. Maruz kalınan bu toksik maddeler maruziyet şekli, süresi ve miktarına göre DNA'da kalıcı etki bırakarak mutasyonlara yol açabilmektedirler (Young 2002; Alam and Jones 2012).

Diyet

Kansere sebep olan çevresel faktörlerden olan beslenmenin kanser ile ilişkisi ortalama %35'tir (Harris *et al.* 1993). Diyet ile alınan besinlerin kanserden koruyucu özelliklerinin bulunmasının yanı sıra kansere sebebiyet verme özellikleri de bulunmaktadır (Vural 2005). Aşırı yağlı, işlenmiş, yanık ve kızarmış gıdalarla benimsenen beslenme tarzı kolorektal, prostat ve serviks kanserlerine yakalanma riskini artırırken, sporsuz bir hayat tarzı ve fazla kilo alımı, kolon, meme, böbrek, özofagus ve serviks kanseri riskini artmaktadır (Bokurt 2005). Bu nedenle kanserden korunmak için kilo kontrolünün sağlanması ve devamlılığı önem arz etmektedir (Arslan vd 2013).

Sigara ve alkol kullanımı

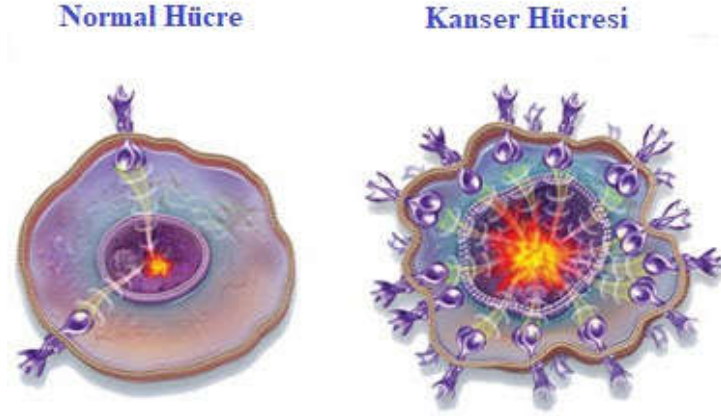
Sigara içerisinde yer alan kimyasal ajanların başta akciğer kanserine yol açtığı bilinmektedir ve kanser riskini arttırmaktadır (Colditz *et al.* 2003). Birçok sağlık sorununa sebebiyet veren alkol kullanımı ağız boşluğu, yutak, yemek borusu, gırtlak, kolorektal, karaciğer ve meme kanserine yol açmaktadır (Allen *et al.* 2009).

Kanser Hücrelerinin Sağlıklı Hücrelerden Temel Farkları

Morfolojik farklılıklar

Kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelere kıyasla buldukları dokularda yapısal bir düzensizlik söz konusudur. Sağlıklı hücrelerde, hücrelerin çoğalmasını durduran ve yapısal formları düzenleyen mekanizmalar arasında bulunan hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi kanser hücrelerinde yoktur. Sağlıklı epitel hücrelerin dış yüzeyinde yer alan E-kadherin adhezyon molekülünün, kanser hücrelerinde yeteri kadar ifade edilememesinden dolayı kanser hücrelerinin adhezyon yeteneği sağlıklı hücrelerden daha düşüktür (Christofori and Semb 1999). Sağlıklı hücrelerin, E-kadherin molekülü sayesinde artan adhezyon yeteneği bulunduğu dokuya ve hücrelerin birbirine tutunma potansiyelini artırır. Bu sebeple sağlıklı hücrelerin

morfolojileri çeşitlilik gösterebilir. Kanser hücreleri ise tutunma kapasitelerinin düşük olması sebebiyle genellikle yuvarlak bir morfolojiye sahiptir (Yokota 2000).



Şekil 3. Normal hücre ve kanser hücresi morfolojileri (Anonymus 2010)

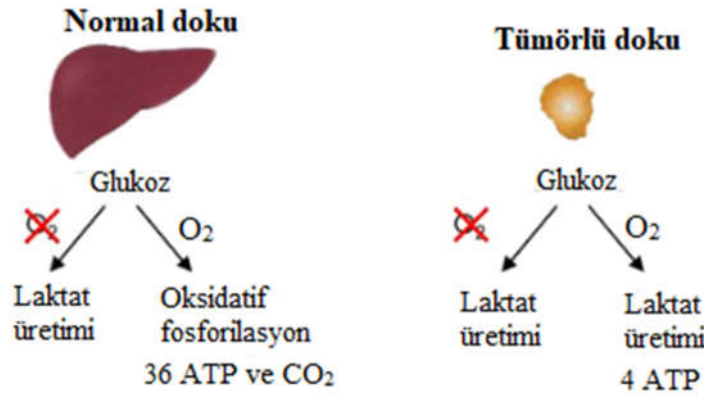
Moleküler farklılıklar

Karsinogeneizde etkili moleküler faktörler aşağıda belirtilmektedir (Berretta and Moscato 2010; Hanahan and Weinberg 2011; Gedik ve Doğan 2018).

- Apoptozdan kaçış,
- Hücre döngüsünün fonksiyonunun bozulması,
- İmmün sistemden kaçış,
- Hücreler arası bağlantıların bozulması,
- Hücre içi sinyal iletiminin bozulması,
- miRNA düzenlenmesindeki anormallikler,
- Kromozomal bozukluklar,
- DNA metilasyonunun bozulması,
- Tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu,
- Onkogenlerin hipometilasyonu,
- İnflamasyonun artması,
- İlaç direnci,
- Telomeraz aktivitesinin bozulması,
- DNA'nın yapısında meydana gelen hasarlar,
- Histon modifikasyonlarındaki düzensizlikler,
- Otofajinin gerçekleştirilememesi,
- Epigenetik değişiklikler.

Metabolik farklılıklar

Normal hücreler, oksijen varlığında glukozu laktata metabolize etmez yalnızca oksijen yokluğunda veya sınırlı miktarda olduğunda anaerobik glikoliz veya laktik asit fermentasyonu ile glukozu metabolize eder. Aksine, kanser hücreleri oksijen varlığında bile (aerobik glikoliz) glukozu laktata metabolize ederler. Aerobik koşullar altında kanser hücrelerinin glukozu laktata metabolize etme eğilimi, Warburg etkisi olarak bilinir (Koppenol *et al.* 2011). Normal hücreler ATP üretimini mitokondriyal oksidatif fosforilasyon ile gerçekleştirir. Aerobik koşullar altında normal hücreler ve dokular, glukozu karbondioksit (CO_2) ve suya (H_2O) oksidatif fosforilasyon aracılığıyla metabolize eder ve hipoksik (zayıf oksijenli) koşullar altında glukozu laktata dönüştürür. Çoğu kanser hücresi, oksidatif fosforilasyon mekanizmasını daha az kullanarak önemli ölçüde daha az miktarda ATP üretmek için bol oksijen varlığında bile glikolizi kullanır (Vander *et al.* 2009). Kanser hücreleri, hücre yüzeyinde bulunan glukoz taşıyıcı protein (GLUT) ifadelerini artırarak enerji üretimini gerçekleştirir.



Şekil 4. Normal ve kanser hücrelerinde/dokularında metabolik farklılıklar (Kalyanaraman 2017)

HIF-1 (Hipoksi indükleyici faktör-1), kanser hücrelerinin hipoksik koşullara adaptasyonunu sağlayan ve hipoksik şartlardaki kanser hücrelerinde yüzlerce genin ifadesini değiştiren bir transkripsiyon faktörüdür. HIF-1 α ve HIF-1 β olmak üzere iki alt üniteden oluşmaktadır (Kalyanaraman 2017). HIF-1 aracılığıyla değişen gen aktivasyonu ile kanser hücrelerinin glukoz tüketimi artar, mitokondriyal enerji üretimi baskılanır böylece hipoksik dokuda oksijen ihtiyacı azalır. Kanser hücreleri hipoksik koşullara adapte olarak yeterli enerji üretimini gerçekleştirebilmektedir. Ayrıca kanser hücreleri sürekli bölünüp, çoğaldıkları için glikolitik yolla biyosentez yapabilirken, sağlıklı hücreler metabolik olarak ATP'ye bağımlıdır. Kanser hücrelerinin metabolik aktiviteleri için ATP'ye bağımsız oluşu bir dezavantaj oluşturmaktadır (Kalyanaraman 2017; Gedik ve Doğan 2018).

Kanser hücreleri sağlıklı hücelere kıyasla hücre içerisine 100 kat daha fazla glukoz almakta ve hızlıca tüketmektedir (Ortega *et al.* 2009). Kanser hücrelerinin tükettiği glukozun büyük bir kısmı laktata dönüştürülerek, hücrenin çoğalması için gerekli olan nükleik asit ve lipid sentezi için kullanılmaktadır. Glukozun kalan diğer küçük kısmı ise oksidatif fosforilasyon ile ATP'ye dönüştürülmektedir (Tennant *et al.* 2009).

Kanserin Moleküler Biyolojisi ve Mekanizmaları

Normal hücrelerin aşamalı olarak maligniteye dönüştüğü süreç, genom hasarının bir sonucu olarak ortaya çıkan ardışık mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu hasar, DNA replikasyonundaki hatalar, belirli DNA bazlarının kimyasal kararsızlığı, metabolizma sırasında üretilen serbest radikallerin saldırısı gibi endojen süreçlerin sonucunda veya iyonize radyasyon, UV ve kimyasal kanserojenler gibi eksojen ajanlarla etkileşimlerden de kaynaklanabilmektedir. Hücreler bu tür hasarları onarmak için tamir mekanizmaları geliştirmişlerdir. Ancak çeşitli nedenlerle bu tamir mekanizmalarında hatalar meydana gelir ve genomda kalıcı mutasyonlar oluşabilmektedir. Bazı inaktive edici mutasyonlar, genomik bütünlüğün korunmasından sorumlu genlerde ortaya çıkmakta ve ek mutasyonların edinilmesini kolaylaştırmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2000).

Normal hücrenin kanserli hücreye dönüşmesi, proliferasyonu ve hücre ölümünü kontrol eden normal hücresel mekanizmalara dâhil olan genlerin, çoğalmayı veya hücre ölümüne, onkogenlere ve inaktivasyona karşı korumayı uyaran genlerin aktivasyonu ile sonuçlanan mutasyonel hasara uğradığı süreçleri içerir. Normalde proliferasyonu engelleyen genler, tümör baskılayıcı genlerdir (Hanahan ve Weinberg 2000).

Hücre bölünmesi ve apoptozis üzerindeki normal kontrolleri aşan bir kanser hücresi replikatif yaşlanmanın üstesinden gelerek ölümsüz hale gelmeli ve bu yüksek proliferasyon oranını sürdürmek için yeterli besin ve oksijen tedarik etmelidir (Hanahan ve Weinberg 2000).

Kanserde meydana gelen altı anahtar değişiklik, büyüme faktörü bağımsızlığı, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, apoptozdan kaçınma, replikatif potansiyeli sürdürme, anjiyogenez ve invazyon/metastaz olarak tanımlanmıştır (Hanahan ve Weinberg 2000).

Kanser genleri

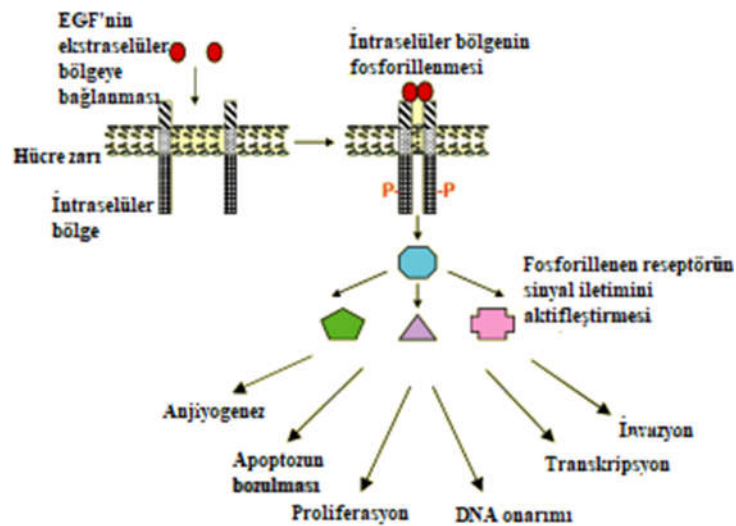
Kanser, her biri normal hücrelerde temel bir işlev sağlayan iki gen sınıfı (onkogenler ve tümör baskılayıcı genler) tarafından yönlendirilir. Onkogenler, hücre çoğalmasını, hayatta kalmasını ve yayılmasını kontrol eden normal hücresel genlerin (proto-onkogenler) mutasyona uğraması ile türetilir. Normal hücrelerde, kontrolsüz hücre büyümesini önlemek için proto-onkogenlerin ifadesi sıkı bir şekilde düzenlenir. Kanserde, proto-onkogenlerin mutasyonları,

kontROLSÜZ hücre bölünmesinden, artmış hayatta kalmadan ve yayılmadan sorumludur. Onkogenler, fenotipik olarak dominant olarak tanımlanır ve bir proto-onkogenin bir kopyasının mutasyona uğraması kanser için yeterlidir. Tümör baskılayıcı genler, insan fonksiyonu ve gelişiminin normal biyofizyolojisi için gereklidir. Bu genler, hücre çoğalmasını ve hayatta kalmanın engellenmesini sağlayan normal hücresel genlerdir. Sıklıkla hücre döngüsü ilerlemesinin ve apoptozun kontrolünde yer alırlar. Tümör baskılayıcı genler fenotipik olarak resesiftir ve kanser oluşumu için her iki kopyasının da kaybolması gerekmektedir (Harrington 2016).

Büyüme faktörlerinden bağımsızlık

Epidermal büyüme faktörünün, epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) hücre dışı bileşeni üzerindeki spesifik ligand bağlama alanına bağlanması, membrandan çekirdeğe bir sinyalin geçmesine neden olur. Bu durum, hücrenin davranışını değiştirir. Normal koşullar altında, büyüme faktörü reseptörlerinin aktivasyonu çok sıkı bir şekilde kontrol edilir, çünkü onları uyaran ligandların sentezi ve salınmasıdır. Kanser hücreleri normal büyüme faktörü sinyal yollarını sınırsız hücre bölünmelerini uyarmak için kullanır (Rogers *et al.* 2005).

Kanser hücreleri, büyüme faktörlerinden üç ana stratejiden yararlanır. Bunlardan ilki, kendi reseptörlerini ve komşularının reseptörlerini uyaran büyüme faktörlerini üretirler ve serbest bırakırlar. İkincisi, yüzeylerindeki büyüme faktörü reseptörlerinin sayısını, yapısını veya işlevini değiştirirler. Üçüncüsü, büyüme faktörü reseptörünün aşağı akışındaki sinyal yolununun düzenlenmesini bozarlar (Harrington 2016).



Şekil 5. Kanser hücrelerinin büyüme faktörlerinden bağımsızlığı (Harrington 2016)

Büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık

Büyüme karşıtı sinyaller normal hücrelerde, hücre döngüsünün G_0 evresinde durdurulmasını indükler. Büyüme karşıtı sinyallerin aktive edilmesine, hücre reseptörler (TGF) üzerine etki eden ve nükleusa sinyaller gönderen ligandlar (TGF- β) aracılık eder. Bu yollar, esas olarak hücre döngüsünü kontrol etmede rol oynar ve bunlara retinoblastoma proteini (Rb), siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve bunların inhibitörlerini (CDKi) içeren proteinler eşlik eder. Büyüme karşıtı sinyal yollarındaki anormallikler kanserde son derece yaygındır ve kanser hücrelerinin hücre döngüsü boyunca ilerlemesinde rol oynarlar. Kanserde, Rb'nin, CDKi ailesinin üyelerinin, belirli siklinlerin ve CDK'nın aşırı ifade edildiği birçok tümörde gösterilmiştir (Harrington 2016).

Apoptozisten kaçış

Normal hücreler, aldıkları hayatta kalma (anti-apoptotik) ve ölüm (pro-apoptotik) sinyallerinin dengesini değerlendirerek sürekli olarak canlılıklarını denetler. Normal hücrelerde, DNA hasarı ve onarım potansiyeli denetlenirken hücre döngüsü durdurulur. Hasar seviyesi onarım kapasitesini aşarsa, anti ve pro-apoptotik sinyallerin dengesi bozulur ve hücre apoptoza girer. Apoptoz, DNA hasarının birikimini önler ve mutasyonların hücre bölünmesi ile yeni hücrelere geçme riskini ortadan kaldırır. Bu nedenle, bu mekanizma kanser gelişiminin engellenmesinde oldukça önem arz eder (Harrington 2016).

Kanser hücreleri, hücre içi pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesini apoptozun inhibisyonu lehine çevirerek apoptozdan kaçabilir. Böylece hücre ölümüne neden olmadan DNA hasarını sürdürebilir. Apoptoz yolunu bozan kanser hücrelerinin, antikanser tedavilerine dirençli olma olasılığı daha yüksektir (Harrington 2016).

Anjiyogenez

Normal dokularda, yeni kan damarlarının oluşması (anjiyogenez), pozitif (pro-anjiyogenik) ve negatif (anti-anjiyogenik) sinyaller arasındaki bir denge ile çok sıkı bir şekilde kontrol altında tutulur. Kanser hücreleri, pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki dengeyi bozarak ihtiyaç duyduğu oksijen ve besin moleküllerini temin etmek için vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi pro-anjiyogenik proteinlerin üretimini artırarak veya trombospondin-1 gibi anti-anjiyogenik proteinlerin üretimini azaltarak yeni kan damarları oluşturabilirler (Harrington 2016).

Ölümsüzlük

Normal somatik hücreler, replikatif yaşlanma olarak bilinen kalıcı büyüme durması dönemine girmeden önce yalnızca sınırlı sayıda hücre bölünmesine (Hayflick sınırı) uğrayabilir. Bu süreç, hücrelerin kromozomlarının uçlarını (telomerler) her bölünmede tam olarak kopyalayamamasının bir sonucu olarak meydana gelir. Bu nedenle, zamanla telomerler giderek kısalır ve etkili bir şekilde hücrelerin ömrünü geri sayan moleküler saatler görev yapar. Bunun aksine kök hücreler ve kanser hücreleri, telomerlerinin uzunluğunu koruyarak ölümsüzlük kazanırlar. Çoğu tümörde, bu durum telomeraz enzimi aktivitesi ile düzenlenir. Telomeraz aktivitesi ile her bir hücre bölünmesinde kaybettikleri kısımlarını yeniden oluşturarak hücrel replikatif yaşlanmadan kaçabilirler (Harrington 2016).

Metastaz

Metastazlar kanser ölümlerinin %90'ına neden olur. Kanser hücrelerinin devamlı olarak bölünmesi ve çoğalması sonucunda, hücreler yapışma özelliklerini kaybettiğinden tümörlü dokudan ayrılır ve çevre dokuları istila ederler. Bu hücreler ayrıca lenf ve kan dolaşımına katılarak, metastazı oluşturan birincil dokudan uzaktaki diğer organlara/dokulara taşınırlar.

Metastaz oluşumuna neden olan basamaklar aşağıda verilmektedir:

- Çevredeki normal dokuların istilası,
- Lenf ve kan sistemlerinde neoplastik hücrelerin yayılması,
- Uzaktaki dokularda/organlarda ikincil tümör oluşumunun başlaması.

Tümör metastazındaki adımların çoğu, hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimlerini içerir. Malign hücrelerin birbirine yapışma potansiyeli düşük olduğundan primer tümörden ayrılır ve diğer dokuları/organları istila eder. Tümörlerin davranışı, hücre adezyon moleküllerinden (örn. E-kadherinler) etkilenir. Gen mutasyonları da tümör vaskülatürünün gelişimi ile metastaz oluşumu için tetikleyici bir durumdur.

Epitelyal tümörlerin invazyonu ve metastazının altında yatan anahtar süreçlerden biri epitelden mezenkime geçiştir (EMT). Farklı kanserlerin belirli organlara (meme kanserinden karaciğer, kemik ve beyine; akciğer kanserinden beyine ve adrenal beze) metastazları rastgele değildir, kemokin reseptörleri tarafından düzenlenmektedir (Harrington 2016).

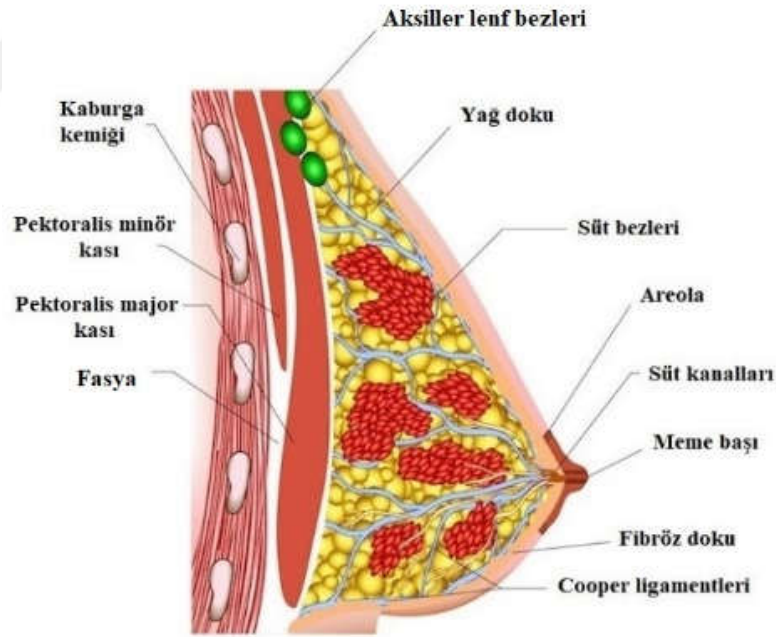
Enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi

Kanser hücrelerinde, normal hücrelere göre meydana gelen metabolik farklılıklar kanserin aşırı ve anormal bölünmelerine yol açar. Kanser hücre metabolizması, büyüme ve proliferasyon üzerine kurulmuştur ve temel besin kaynağı glukozdur. Kanser hücreleri Warburg

Etkisi ile glukoz alımını artırarak enerji üretimi için hızlı bir yol oluşturmaktadır. Hücre içerisinde artan glukoz miktarının, biyokütle birikimini desteklemeye ve sürekli çoğalan hücrelerde redoks dengesinin korunmasına yönelik olduğu düşünülmektedir (Kısaçam ve Temizer 2017).

Meme Dokusu

Göğüs ön duvarında yer alan ve gelişmiş modifiye bir ter bezi olan memenin asıl görevi laktasyon ile yenidoğan bebeği beslemektir. Meme, embriyonik dönemin 5-6. haftalarından itibaren başlayan ve menapoza kadar devamlı anatomik ve fizyolojik değişimler geçiren bir organdır (Başoğlu 2010). Meme dokusu hem erkeklerde hem kadınlarda bulunmasına rağmen meme bezleri yalnızca doğum sonrası dönemde yenidoğan bebeği beslemeye yönelik süt salgıladığından fonksiyonel olabilmektedir. Meme dokusu, meme bezleri, yağ ve bağ dokudan oluşmaktadır. Meme bezleri subkutan olarak anterior ve lateral torasik duvarda konumlanır. Her iki memede 15-20 adet lob bulunmaktadır. Memenin apeksinde yer alan ve meme başını çevreleyen pigmentli alana areola denilmektedir (Demirali 2009). Meme kanserli hücreler, genellikle lenf yolları aracılığıyla metastazlarını yapmaktadır (Romrell and Bland 1997).



Şekil 6. Meme anatomisi ve yapısı (Anonymus 2017)

Meme Histolojisi

Parankima dokusu

Lüminal epitel hücreleri, asıl görevi laktasyonu yani süt salgılanmasını sağlamaktır (Pitelka 1988).

Miyoeptilyal hücreler, sütün meme başından boşaltılmasını sağlarken aynı zamanda epitelyal polariteyi sağlayan alttaki bazal membranı sekrete etmektedirler. Ayrıca lüminal hücrelerin büyümesinde, gelişmesinde ve duktal dallanmada rol oynarlar (El-Sabban *et al.* 2003).

Kök hücreler, meme dokusunda bulunan kök hücrelerin multipotent kök hücreler olduğu, lüminal ve/veya miyoeptilyal hücrelere farklılaşabildiği düşünülmektedir (Hennighausen and Robinson 2005).

Bazal membran

Bazal membran, meme dokusunda bulunan duktusları, lobülleri ve alveollerini sarar. Kollajen tip IV, laminin, nidogens 1 ve 2, perlekan ve fibronektinden oluşmaktadır (Guelstein *et al.* 1993; Woodward *et al.* 2001) süt üretimi (Streuli and Bissell 1990) apoptozun baskılanması (Pullan *et al.* 1996), prolaktinle etkileşim (Streuli 1999) gibi birçok epitelyal hücre fonksiyonu bazal membran varlığını gerektirir.

Stroma hücreleri, meme stromasını bağ doku, hücreler ve ekstraselüler matriks (ESM) oluşturur. Lobüllerin içinde gevşek bağ doku, lobüllerin arasında düzensiz yoğun bağ doku ve yağ doku olmak üzere meme dokusunda 3 tip bağ doku bulunur. Meme stroması memeye hem yapısal destek sağlamakta hem de epitelyal-stromal etkileşimler ile hücre gelişim ve farklılaşmada rol oynamaktadır.

Ekstraselüler matriks, hücrelerin şekil, proliferasyon, göçü, farklılaşması, duktus dallanması, polarite ve lümen formasyonu gibi birçok hücre fonksiyonunu etkiler (Sternlicht 2006). Bu etkiler ya çeşitli faktörler ve/veya bağlama proteinlerinin salgılanması ya da direk hücre-ESM etkileşimleri sonucu oluşmaktadır (Streuli 1999).

Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlarda en fazla görülen kanser türlerinden bir tanesidir. Kadınlarda meme kanserine bağlı ölüm oranı %18'dir ve meme kanserine bağlı ölümler; akciğer ve kolorektal kanserlerinden sonra üçüncü sırayı almaktadır. Meme kanseri 30 yaş altı kadınlarda nadir görülürken bu yaştan sonraki yıllarda görülme sıklığı artmaktadır ve menapoz sonrası ise yavaş bir şekilde görülme sıklığı yükselmeye başlar. Meme kanseri hakkında kadınların risk faktörleri, erken tanı ve tedavi yöntemleri hakkında bilgilendirilmesi hastalık ile mücadelede önem arz etmektedir (Çapanoğlu ve Bakar 2018). Meme kanseri hastalarından elde edilen veriler incelendiğinde meme kanserinin oluşum mekanizmasından çoklu risk faktörlerinin sorumlu olduğu bildirilmektedir (Çapanoğlu ve Bakar 2018). Başlıca risk faktörleri yaş, etnik köken, canlı doğum sayısı, menapoz yaşı, BRCA1, BRCA2, PTEN, p53 genlerinde veya diğer

ilişkili genlerde meydana gelen mutasyonlar, ailesel yatkınlık, alkol ve sigara kullanımı, radyasyona maruziyet olarak sıralanabilir (Koçak vd 2011).

Meme kanserlerinin histolojik ve moleküler sınıflandırılması karsinom tipinin anlaşılması için önem arz etmektedir. Meme kanserlerinin sınıflandırılması, histolojik derecesi, lenf nodülü metastazı varlığı ve prognostik klinikopatolojik parametrelere göre yapılmaktadır. Ayrıca östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ekspresyonu ve insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2) durumunun değerlendirilmesi gibi biyobelirteçler klinik olarak yararlıdır (Çapanoğlu ve Bakar 2018).

Meme Kanseri Evreleri

Meme kanserleri, tümörün oluşumu, boyutu ve metastaz durumuna göre çeşitli evrelere ayrılır. Meme kanseri tedavisini planlamak için kanserin hangi evrede olduğunun tespiti önem arz etmektedir.

Evre 0, “in-situ” olarak da adlandırılan bu evre, kanserli hücrelerin çevre dokulara metastaz yapmadığı, yerinde kalan kanser hücre tipini ifade etmektedir. Evre 0 meme kanserleri oluştukları yere göre iki gruba ayrılır. Eğer kanser süt kanallarında (duktus) oluşmuş ise duktal karsinoma in situ (DCIS), süt bezlerinde (loblar) oluşmuşsa lobular karsinoma in situ (LCIS) olarak adlandırılmaktadır. LCIS mikroskobik olarak kanser hücrelerine benzer görünmesine rağmen kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerini taşımazlar. Bu nedenle kanser tedavisi gibi tedavi yöntemlerine başvurulmaz. LCIS yalnızca memenin herhangi bir bölgesinde kanser oluşabilme potansiyelinin arttığını gösteren bir belirteç olarak kabul edilebilir. DCIS’da ise kanser hücreleri süt kanalları içinde oluşur ve orada kalırlar, memenin yağ dokusu veya lenf bezleri gibi vücudun farklı bölgelerine metastaz yapmazlar (Anonymus 2021).

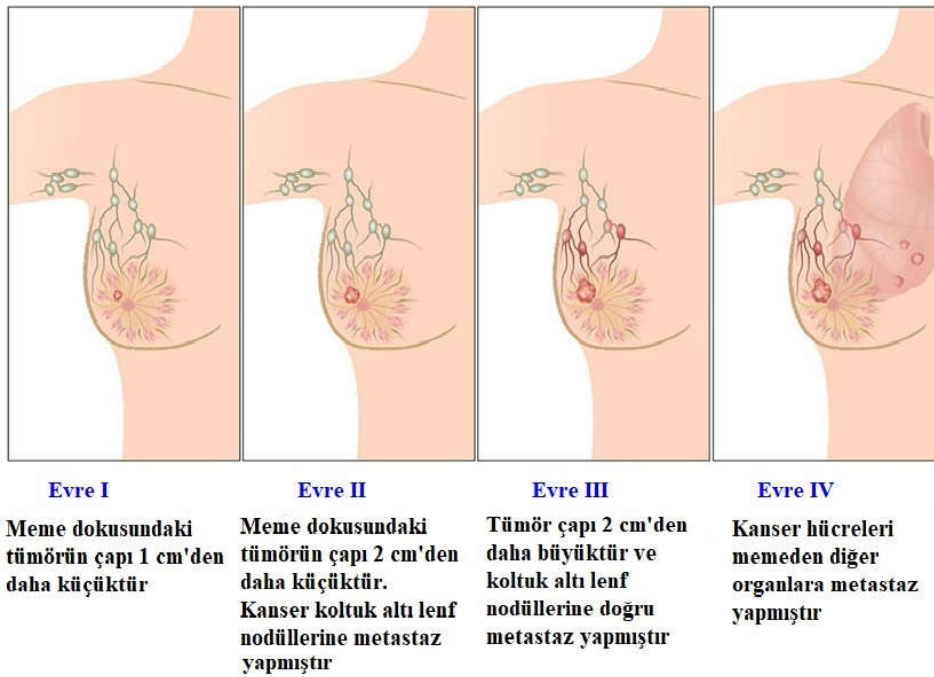
Evre I, meme kanserinin başlangıç evresidir ve bu evrede kanser hücreleri metastaz yapma eğilimindedir. Ancak bu eğilim kanser hücrelerinin memeden başka organlara metastaz yapmadığı durumdur. Bu evrede tümör boyutu 2 cm’den daha küçüktür (Anonymus 2021).

Evre II, IIA ve IIB olmak üzere iki alt bölüme ayrılmaktadır. Evre IIA’da memede tümör gözlenmez fakat koltuk altında bulunan lenf bezlerinde tümör görülmektedir. Koltuk altı lenf bezlerine metastaz yapan tümörün boyutu 2 cm’den büyük veya küçük olabilir. Koltuk altı lenf bezlerine metastaz yapmayan tümör boyutu 2-5 cm olabilir. Evre IIB’de koltuk altı lenf bezlerine metastaz yapan tümör boyutu 2-5 cm, koltuk altı lenf bezlerine metastaz yapmayan tümör boyutu 5 cm’den daha büyüktür (Anonymus 2021).

Evre III, ilerlemiş kanser evresidir. Bu evre, Evre IIIA, IIIB ve IIIC olmak üzere üç alt evreye ayrılmaktadır. Evre III’te, koltuk altı lenf bezlerinde kanserli hücre görülür fakat

memede tümör görülmez. Tümör boyutu 5 cm ya da daha büyüktür ve çevredeki diğer dokulara metastaz yapmamıştır. Evre IIIB'de, tümör farklı boyutlarda olabilir ve memeye yakın dokulara (deri veya göğüs duvarı, kaburgalar veya göğüs duvarındaki kaslar) ve lenf nodüllerine metastaz yapmış durumdadır. Evre IIIC'de ise kanserli hücreler köprücük kemiğinin altında yer alan meme içerisindeki lenf nodüllerine ve memeye yakın dokulara metastaz yapma eğilimindedir (Anonymus 2021).

Evre IV, meme kanserinin son evresidir. Kanser hücreleri memeden diğer organlara (karaciğer, akciğer, beyin ve kemikler) metastaz yapmıştır (Anonymus 2021).



Şekil 7. Meme kanseri evreleri (Anonymus 2018)

Meme Kanseri İçin Risk Faktörleri

Genetik olmayan ve değiştirilemez risk faktörleri

Yaş

Meme kanseri insidansı ve ölüm oranı yaşa bağlı olarak orantılı olarak artar. Dünya çapında, bu hastalık genellikle 40 yaşında başlamakta ve artan bir ivmeyle 60 yaş civarında zirveye çıkmaktadır (Ferlay *et al.* 2013; Howlader *et al.* 2016). Bu durum bazı istisnalar göstermektedir. Örneğin; Latin Amerika'da, meme kanserlerinin %20-30'u 20 ile 44 yaşları arasında teşhis edilmektedir. Tanı anındaki en yüksek yaş Asya ve Afrika Ülkelerinde 40-50 yaş iken Batı ülkelerinde 60-70 yaşır (Franco-Marina *et al.* 2015). Asya ve Afrika ülkelerinde meme kanseri tanısının konulduğu en yüksek yaş 40-50 iken batı ülkelerinde 60-70 yaşır (Leong *et al.* 2010; Abdulrahman and Rahman *et al.* 2012). ABD'de ise meme kanseri tanısı

ortalama 61 yaşında konulmaktadır (Iqbal *et al.* 2015). Meme kanserine bağlı ortalama ölüm yaşı ise genel olarak 68'dir (Howlader *et al.* 2016).

Irk

Siyah kadınlarda meme kanseri insidansı beyaz kadınlara göre biraz daha düşük olmasına rağmen, siyah kadınlarda meme kanserine bağlı ölüm oranı beyaz kadınlara göre daha yüksektir (Iqbal *et al.* 2015; DeSantis *et al.* 2016). Meme kanseri kaynaklı ölüm oranınının 2012 yılı itibariyle, siyahlarda beyazlara göre %42 daha yüksek olduğu bildirilmektedir (DeSantis *et al.* 2016). Siyah kadınların, hastalığın evresi, tümör özellikleri, takip ve diğer meme kanseri risk faktörleri kontrol edildikten sonra dahi, tedaviye rağmen meme kanserinden kurtulma olasılığı beyaz kadınlardan daha düşüktür (Chlebowski *et al.* 2005; Albain *et al.* 2009; Iqbal *et al.* 2015). Bazı siyah topluluklarda ortaya çıkan bariz sosyoekonomik eşitsizliklere ek olarak, genel olarak siyah kadınların genetik olarak daha agresif bir kanser türüne sahip olma olasılığı daha yüksektir (DeSantis *et al.* 2016). Siyah kadınlar, diğer ırk/etnik kökene sahip kadınlarla karşılaştırıldığında en büyük HR-/HER2 meme kanseri oranına sahiptir (Iqbal *et al.* 2015; Tao *et al.* 2015; DeSantis *et al.* 2016). Bazı etnik gruplarda daha düşük meme kanseri insidansının nedeninin, daha fazla sayıda çocuk, ilk doğumun daha genç yaşlarda yapılması ve daha uzun emzirme süresi dâhil olmak üzere üreme modellerinin çeşitliliğini yansıttığı düşünülmektedir (Chlebowski *et al.* 2005).

Erken adet ve geç menopoz

Erken yaşta adet ve menopozda ileri yaş meme kanseri riskini artırmaktadır (Nichols *et al.* 1986; Heflin *et al.* 2002). Meme kanseri riski, 11 yaşından önce adet görmeye başlayan kızlarda 13 yaşında başlayanlara göre yaklaşık %20 daha fazladır (Masi *et al.* 2007; Duggan *et al.* 2012). Buna ek olarak, 55 yaş ve üzerinde menopoz yaşayan kadınlar, bunu 50-54 yaşları arasında yaşayanlara kıyasla yaklaşık %12 daha yüksek meme kanseri riskine sahiptir (Duggan *et al.* 2012).

Meme özellikleri

Meme kanseri tanısı 40 yaşın altında konulan kadınların, hastalığa yeniden yakalanma riski daha yüksektir (Kroenke *et al.* 2004). In situ duktal karsinom veya in situ lobuler karsinoma gibi bir kanser öncüsü teşhisi konulan kadınların, yeni bir invaziv meme kanseri geliştirme olasılığı, önceden tanı konmamış kadınlara kıyasla sırasıyla 8-10 ve 7-12 kat daha fazladır (Goel and O'Connor 2016). Meme yoğunluğu %11–%25 olan kadınlarla karşılaştırıldığında, meme yoğunluğu %26–50 veya %50'den fazla olan kadınlarda sırasıyla

yaklaşık 1,6 veya 2,3 kat daha yüksek meme kanseri riski vardır (Thrush and Lanese 1962; Wilson *et al.* 2008).

Genetik olmayan ve değiştirilebilir risk faktörleri

Sosyoekonomik durum ve eğitim durumu

Toplum geliri, yaşam beklentisi ve eğitim düzeyi göz önünde bulundurularak hesaplanan insani gelişme endeksi ile meme kanseri insidans ve ölüm oranları ilişkilidir. Buna göre insani gelişme endeksi yüksek olan ülkelerde meme kanseri ölüm oranı, düşük insani gelişme endeksine sahip ülkelere kıyasla daha düşüktür (Mendez *et al.* 2002; Wallace *et al.* 2007). Sosyoekonomik koşulların daha iyi olduğu bölgelerde yaşayan kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı artmasına rağmen (Pe'rez *et al.* 2006), düşük gelirli bölgelerde ikamet eden meme kanseri hastalarında ölüm oranı daha yüksektir (Mier *et al.* 2007; Winters *et al.* 2017). Ayrıca düşük eğitim düzeyine sahip kadınların, daha eğitilmiş kadınlara kıyasla metastatik meme kanseri insidansı daha yüksektir (Winters *et al.* 2017).

Menopozda hormon tedavisi

Menopoz semptomlarını kontrol etmek için kullanılan iki genel hormonal tedavi bulunmaktadır. Bunlar, kombine östrojen ve progesteron ile sadece östrojen tedavisidir. Kombine östrojen ve progesteron tedavisi meme kanseri gelişme riskini artırır (Winters *et al.* 2017). Yapılan araştırmalar ile 6 yıl boyunca yalnızca östrojen tedavisi kullanan kadınların meme kanseri geliştirme riskinin %23 daha düşük olduğunun ifade edilmesine rağmen (Winters *et al.* 2017), başka araştırmalarda menopoz başlangıcından hemen sonra östrojen tedavisine başlayan kadınlarda özellikle meme kanseri riski ile pozitif bir korelasyon mevcuttur (Winters *et al.* 2017).

Sigara ve alkol

Menopozdan önce sigara kullanımının meme kanseri riskini artırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. İlk gebeliğinden önce sigara kullanmaya başlayan kadınlarda (% 21'e kadar daha yüksek risk) ve fazla sigara kullananlarda (yılda 40 paketten fazla) daha fazla risk bulunmaktadır. Bazı araştırmalar ise, menopozdan sonra sigara içmeye başlayan kadınların, tütünün antiöstrojenik etkisine bağlı olarak meme kanseri riskinde önemli bir düşüş olduğunu göstermektedir (Slater *et al.* 1998; Alberti *et al.* 2009).

Alkol tüketimi, meme kanseri riskinin artmasıyla ilişkilidir ve doza bağlıdır (Stocks *et al.* 2008). Spesifik olarak, günde 5–9,9 gr (haftada 3–6 bardak şarap) tüketimi %10'a kadar artan riskle ilişkilendirilmektedir (Byrd *et al.* 2012). Bu bulguların arkasında muhtemelen

alkolün kandaki östrojen seviyelerini artırma mekanizması yatmaktadır. Bu nedenle, alkol tüketimiyle bağlantılı meme kanserlerinin çoğu östrojen reseptörü pozitif (ER+) alt tipindedir (Winters *et al.* 2017).

Spor ve beslenme

Düzenli fiziksel aktivite yapan kadınlarda ve yüksek miktarda meyve ve sebze tüketenlerde meme kanseri riski azalmaktadır. Haftada en az 7 saat yürüyen kadınlar, hareketsiz kadınlara kıyasla %10-%25 daha düşük meme kanseri riskine sahiptir ve menopoza sonrası kadınlarda daha da fazla koruyucu etki göstermektedir (Marmot *et al.* 2005).

Genetik risk faktörleri

BRCA1 ve BRCA 2 gen mutasyonları

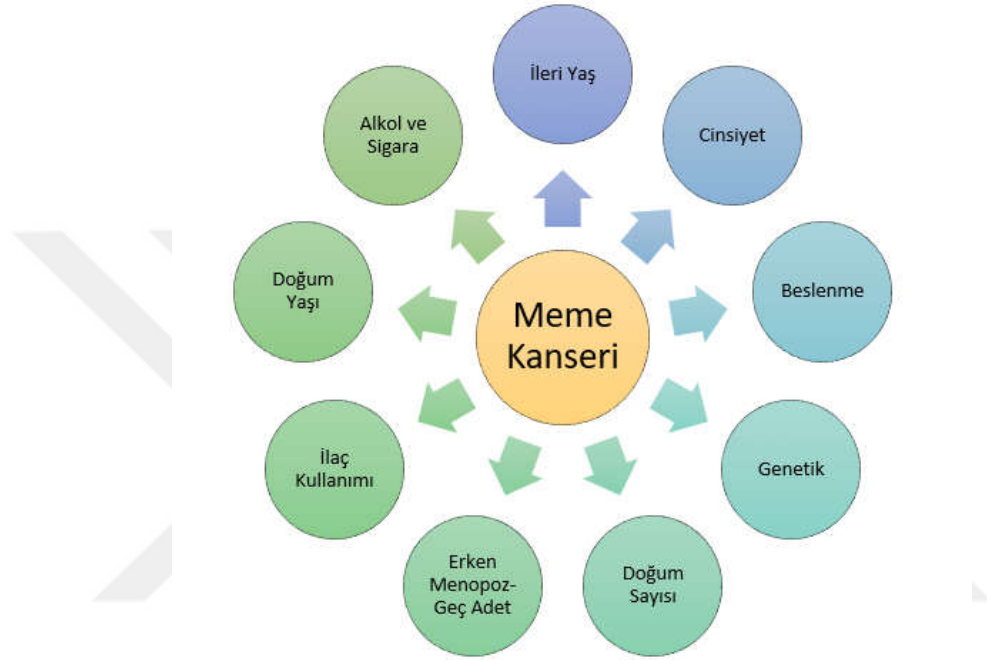
Meme kanseri ile ilişkili iki gen olan BRCA1 ve BRCA2'de dâhil olmak üzere tümör baskılayıcı genler, genomik bütünlük ve transkripsiyonel düzenleme yoluyla işleyişleri hücresel süreçlerde önem arz etmektedir (Legler *et al.* 2002; New *et al.* 2013). Meme kanserlerinin yaklaşık %3'ü ve yumurtalık kanserlerinin yaklaşık %10'u bu genlerin mutasyonlarından kaynaklanmaktadır (Escribà-Agüir *et al.* 2016). Bu mutasyonlar, maligniteye yol açan kalıtsal veya sporadik bir süreç yoluyla ortaya çıkabilir.

Kalıtsal BRCA mutasyonlarına sahip olan bireyler ayrıca inaktif bir BRCA alleline sahiptir. Ergenlik döneminde, östrojen bağımlı meme epiteli hızlı hücre bölünmesine ve çoğalmasına uğrar. Bu değişiklikler, DNA onarım sistemi üzerinde hasarlı DNA'yı tamir edemez ve apoptosiz ile hücre ölümü gerçekleşir. Bu süreç sırasında, hasarlı DNA'ya sahip küçük bir hücre popülasyonu, apoptozisten kaçarak mutasyona uğrayan ve hasarlı DNA'ya dayalı protein üretimi gerçekleşir. Hasar gören birden fazla DNA bölgesi, genellikle hücre döngüsü kontrol noktası aktivasyonundan sorumlu genleri etkiler. Bir hücre bu kontrol noktasını atlayabildiğinde, kalıcı olarak hücre ölümünden kaçır ve kontrolsüz hücre çoğalmasına uğrar.

Sporadik BRCA mutasyonları, kalıtsal bir süreçte görülen patofizyolojiye benzer. Östrojen tarafından uyarılan meme epitelinde hızlı çoğalma ile BRCA geninde meydana gelen mutasyonların oranı artmaktadır. Sporadik malignitede BRCA allellerinin veya hipofonksiyonel aktif bir allelin inaktivasyonu gerekir. Klinik semptomlar tipik olarak yaşamın ilerleyen dönemlerinde mutasyonlar ve hücre inaktivasyonu arttıkça ortaya çıkar (Welsh *et al.* 2001).

Transkripsiyonel susturma da BRCA ekspresyonuna katkıda bulunan bir faktör olarak kabul edilmiştir. BRCA allelleri düzenleyici proteinlere bağlıdır. Pozitif olarak düzenlenen proteinlerin inaktivasyonu, tümör baskılayıcı hücrelerin ekspresyonunun azalmasına neden olurken, negatif düzenleyici proteinlerin artan ekspresyonu, malignite riskiyle sonuçlanan gen ekspresyonunu azaltır (Welch *et al.* 2001).

BRCA1 içinde 1800'den fazla mutasyon tanımlanmıştır ve bu mutasyonlar vücuttaki her hücrede mevcut olup bu nedenle gelecek nesillere aktarılabilir (Winters *et al.* 2017).



Şekil 8. Meme kanseri için risk faktörleri

Meme Kanserinin Tedavisi

Meme kanseri tedavisinde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hormonal tedavi ve hedefe yönelik tedavi uygulamaları bulunmaktadır.

Cerrahi

Kanser tedavisinde cerrahinin gerekliliği, kanserin evresi, biyolojik özellikleri, klinik seyri ve hastanın isteği gibi birçok faktöre bağlıdır. Cerrahi tedavide, tüm meme dokusunun çıkarılması olan mastektomi, sadece küçük miktarda çevre dokuya sahip tümörün çıkarılması olan lumpektomi, lenf nodunun çıkarılması ve sentinel lenf nodu diseksiyonu arasında seçim yapılması gerekir. Ayrıca cerrahi sonrasında meme rekonstrüksiyonuna ihtiyaç duyulabilir (Yenigün 2011).

Radyoterapi

Radyoterapi, X-Ray'in keşfedilmesinden sonra meme kanserinin tedavisinde cerrahi ile kombinasyon halinde veya cerrahi ve kemoterapinin kombinasyonel tedavisinin bir parçası olarak kullanılmaya başlanan bir tedavi yöntemidir. Radyasyon enerjisinin tümör üzerindeki temel amacı, tümörlü hücreleri öldürmek ve tümörü çevreleyen dokuyu kurtarmaktır. Radyasyon tedavisinin tolere edilmesi nispeten kolaydır ve yan etkileri tedavi edilen alanla sınırlıdır. İki tür radyasyon vardır; dış ve iç radyasyon. Dış radyasyon, tipik olarak lumpektomi ve bazen mastektomi sonrası verilen en yaygın radyasyon türüdür. Dahili radyasyon, lumpektomi sonrası kullanılan daha az yaygın bir radyasyon verme yöntemidir (Yenigün 2011).

Kemoterapi

Kemoterapi, kanserin esas olarak ortaya çıktığı doku veya organdaki kanser hücrelerini veya ileri evre meme kanseri hücrelerini öldürmek için ilaç olarak uygulanmaktadır. Kemoterapi, cerrahiden sonra kalabilen kanser hücrelerini öldürmek için erken evre invaziv meme kanserini tedavisinde kullanılmaktadır. İleri evre meme kanserinde ise, kanser hücrelerini mümkün olduğunca öldürmek için ileri evre için kullanılmaktadır. Bazı durumlarda ise kanseri küçültmek için ameliyattan önce kemoterapi uygulanmaktadır. Kemoterapi kan dolaşımından geçerek tüm vücudu etkileyebilir. Çoğu durumda, iki veya daha fazla ilacın kombinasyonları, meme kanseri için kemoterapi tedavisi olarak verilmektedir (Yenigün 2011).

Hormonal tedavi

Östrojen aynı zamanda meme karsinojeni olarak da rol oynadığından, ana tedavilerin bir yolu da östrojeni etkisiz hale getirmektir. Östrojen miktarını azaltmak, erken evre ER (+) meme kanserlerinin ameliyattan sonra yeniden ortaya çıkma riskini azaltabilir. Ayrıca ileri evre veya metastatik ER (+) pozitif meme kanserlerinin büyümesini yavaşlatmaya yardımcı olabilir. Tedavide kullanılan hormonal ilaçlar, ER (-) meme kanserlerine karşı etkili değildir (Yenigün 2011).

Östrojen, seçici östrojen reseptör modülatörleri (SERM'ler) veya seçici östrojen enzim modülatörleri (SEEM'ler) kullanılarak inhibe edilebilir. Tamoksifen gibi SERM'ler östrojen reseptörü aracılığıyla çalışır ve östrojene müdahale eder. Aromataz inhibitörleri (formestan) gibi SEEM'ler, androjenik öncüllerden östrojen sentezini inhibe eder (Yenigün 2011).

Hedefe yönelik tedavi

Hedefe yönelik tedavi, kanser hücrelerinin hızlı veya anormal bir şekilde büyümesine izin veren bir protein gibi kanser hücrelerinin spesifik özelliklerini hedefleyen bir tedavi

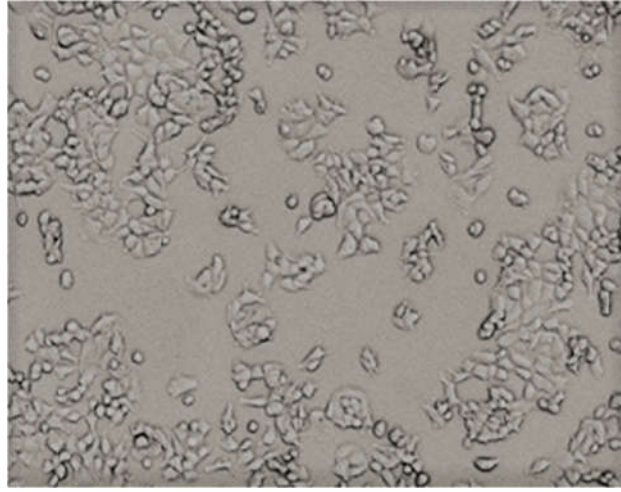
türüdür. Bu tedaviler genellikle sağlıklı hücelere kemoterapiden daha az zarar verir. Hedefe yönelik tedaviler antikorları içeriyorsa, bunlara immün hedefli tedaviler denir. Meme kanserinin tedavisinde kullanılan hedefe yönelik üç tedavi vardır. Bunlardan ilki, kanser hücrelerinin, büyüme sinyallerini alma yeteneğini bloke ederek HER2 (İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2) pozitif meme kanserlerine karşı çalışan Herceptin'dir. İkincisi, kontrolsüz hücre büyümesine neden olabilecek belirli proteinleri bloke ederek HER2 pozitif meme kanserlerine karşı çalışan Tykerb'dir. Üçüncüsü ise, kanser hücrelerinin büyümesi ve çalışması için ihtiyaç duyduğu yeni kan damarlarının oluşmasını engelleyerek çalışan Avastin'dir (Yenigün 2011).

MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı

Hücre hatları, laboratuvar araştırmalarında yaygın kullanımı ve özellikle kanser araştırmalarında *in vitro* model olarak tercih edilmelerinden dolayı meme kanseri çalışmaları için de anahtar bir element olarak görülebilir (Burdall *et al.* 2003).

1970 yılında Dr. Soule ve arkadaşları tarafından Michigan Kanser Vakfı'nda 69 yaşında, metastatik meme kanseri hastalığı olan beyaz ırktan bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir (Soule *et al.* 1973). Michigan Kanser Vakfı -7'nin kısaltması olarak izole edilen meme kanseri hücrelerine MCF-7 ismi verilmiştir. MCF-7 yıllardır çok sayıda araştırmacı tarafından yaygın olarak kullanılan bir meme kanseri hücre dizisidir (Baguley *et al.* 2011). Antikanser ilaçları da dâhil olmak üzere dünya çapında meme kanseri araştırmaları için uygun bir model hücre hattı olduğu kanıtlanmıştır (Shirazi *et al.* 2011). ER (+) ve progesteron reseptörü (PR) pozitif olup (Shirazi *et al.* 2011) luminal A moleküler alt tipine aittir (Done 2011). MCF-7, normalde düşük metastatik potansiyele sahip olduğu düşünülen, epitelyal morfolojiye sahip, zayıf agresif ve noninvaziv bir hücre hattıdır (Gest *et al.* 2013). MCF-7 hücre hattında BCL-2 ve Kaspaz-6, -7 ve -9 genleri yüksek seviyede ifade edilirken, p53 ve p21 genleri de normal seviyede ifade edilmektedir (Chodosh 1998).

MCF-7 hücreleri 75 cm²'lik hücre kültür flasklarında %10 fetal sığır serumu (FBS), 2 mM glutamin, 0,01 mg/mL insülin ve %1 penisilin/streptomisin karışımı içeren, düşük glukozlu DMEM (Dulbecco'nun Modifiye edilmiş Eagle) besiyerinde 37°C'de kültüre edilebilir (Barabutis *et al.* 2007).



Şekil 9. MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin mikroskopik görüntüsü

Apoptozis (Programlanmış Hücre Ölümü)

Apoptozis terimi ilk olarak, hücre ölümünün morfolojik bir formunu tanımlamak için kullanılmıştır (Kerr *et al.* 1972). Apoptoz, fetal gelişim sırasında ve yetişkin dokularda çok çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde kritik rol oynayan programlanmış bir hücre ölümü biçimidir (Reed 2000). Fizyolojik hücre ölümü çoğu durumda nekrozun aksine apoptozla gerçekleşir (Fulda 2015).

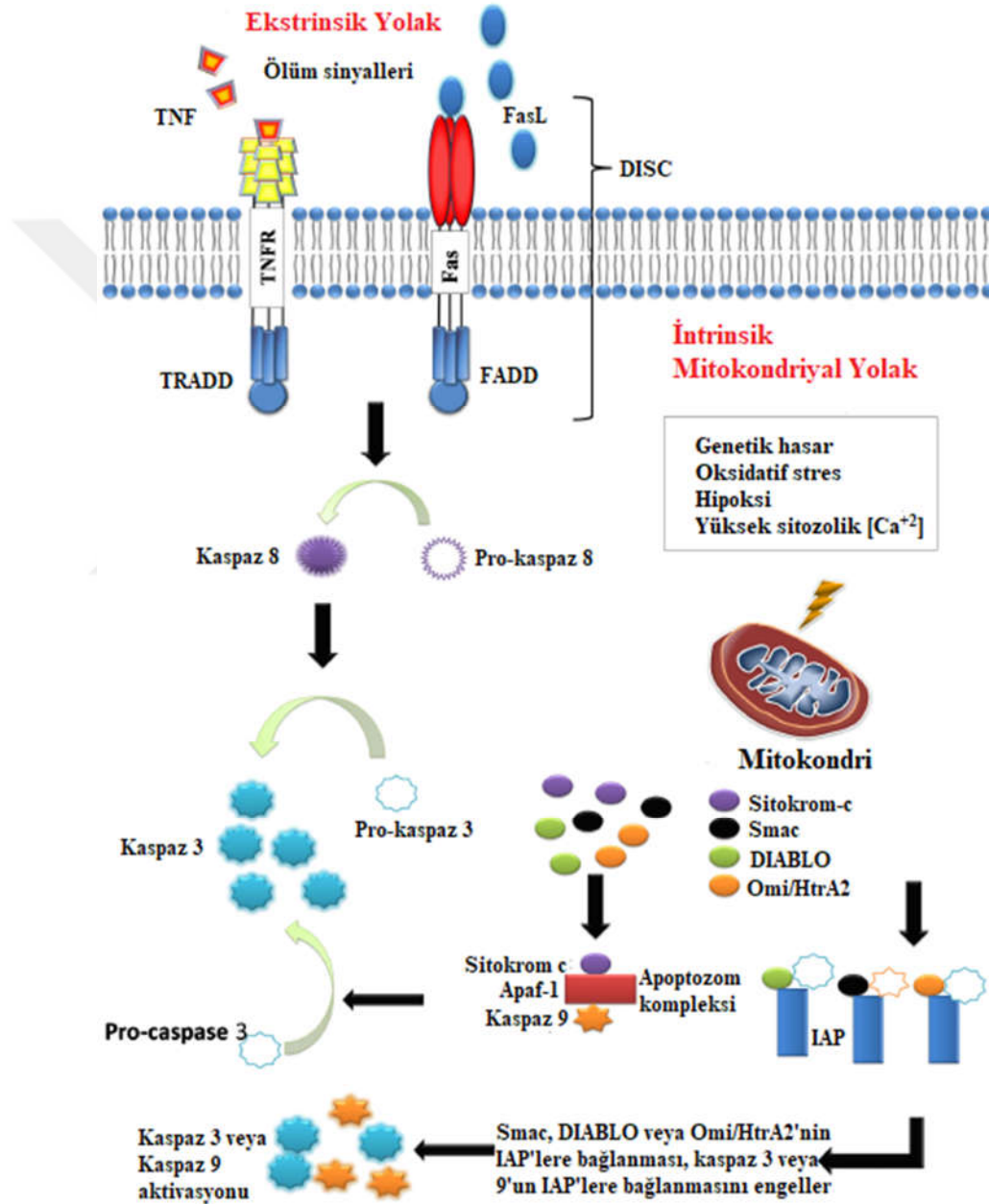
Apoptozis normal olarak gelişim, yaşlanma ve dokulardaki hücrelerin devamını sağlamak için bir homeostatik mekanizma olarak oluşmasının yanı sıra, hastalık durumunda ya da zararlı ajanlar tarafından hücreler zarar gördüğünde bir savunma mekanizması olarak da oluşabilir (Elmore 2007). Kanser tedavisinde kullanılan radyoterapi veya kemoterapide kullanılan ilaçlar, bazı hücrelerde DNA hasarına neden olur ve bu da p53'e bağlı bir yolla apoptotik ölüme yol açabilir. Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar, bazı hücrelerde (örn. Timositler) apoptotik ölüme yol açabilirken diğer hücreler etkilenmezler (Elmore 2007). Son olarak, apoptoz, "kaspazlar" adı verilen bir grup sistein proteazın aktivasyonu ile hücrenin nihai ölümüne yol açan karmaşık olaylar dizisini içeren koordineli ve genellikle enerjiye bağımlı bir süreçtir (Elmore 2007).

Apoptoz Morfolojisi

Apoptoz sırasında hücrede meydana gelen değişiklikleri ışık ve elektron mikroskobu ile tanımlamıştır (Häcker 2000). Erken apoptoz sürecinde, hücre küçülür, sitoplazma yoğunlaşır, organeller daha sıkı paketlenir ve piknoz ışık mikroskobu ile görülebilir (Kerr *et al.* 1972; Elmore 2007). Apoptozun en karakteristik özelliği kromatin yoğunlaşması olan piknozdur. Apoptotik hücre, koyu renkli eozinofilik sitoplazmalı ve yoğun mor nükleer kromatin parçacıklı yuvarlak veya oval bir kitle olarak görünür (Elmore 2007).

Apoptoz Mekanizması

Yapılan araştırmalar ışığında ekstrinsik veya ölüm reseptör yolu ve intrinsik veya mitokondriyal yol olmak üzere iki ana apoptotik yol olduğu bilinmektedir. Her iki yol birbiri ile bağlantılıdır ve bir yoldaki moleküller diğer yoldaki molekülleri etkileyebilir (Igney and Krammer 2002). T-hücre aracılı sitotoksositeyi ve hücrenin perforin-granzime bağlı öldürölmesini içeren ek bir yol vardır. Ekstrinsik, intrinsik ve perforin-granzim yolları aynı terminalde veya yürütme yolunda birleşir.



Şekil 10. Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik yolları (Wong 2011)

Ekstrinsik apoptoz yolak

Ekstrinsik ölüm reseptörü yolu, ölüm sinyalleri ölüm reseptörlerine bağlandığı zaman başlar. Birkaç ölüm reseptörü tanımlanmasına rağmen en iyi bilinen ölüm reseptörleri tip 1 TNF reseptörü (TNFR1) ve Fas (CD95) proteinleridir. Bunların sinyalleri sırasıyla TNF ve Fas ligandı (FasL) olarak isimlendirilir (Hengartner 2000). Bu ölüm reseptörleri TNFR-1 ile ilişkili TRADD ve FADD adaptör proteinleri ve Kaspaz-8 gibi sistein proteazlarla etkileşen hücre içi bir ölüm bölgesine sahiptirler (Schneider and Tschopp 2000). Ölüm ligandının ölüm reseptörüne bağlanması, bir adaptör protein için bir bağlanma bölgesinin oluşumuyla sonlanır ve ligand-reseptör-adaptör kompleksi ölüm indükleyici sinyallemeye kompleksi (DISC) olarak isimlendirilir (O'Brien and Kirby 2008). DISC prokaspaz-8'i aktive eder. Başlatıcı bir kaspaz olan ve prokaspaz-8'in aktif formu olan Kaspaz-8 diğer kaspazlar ile etkileşim kurarak apoptozu başlatır (Karp 2008).

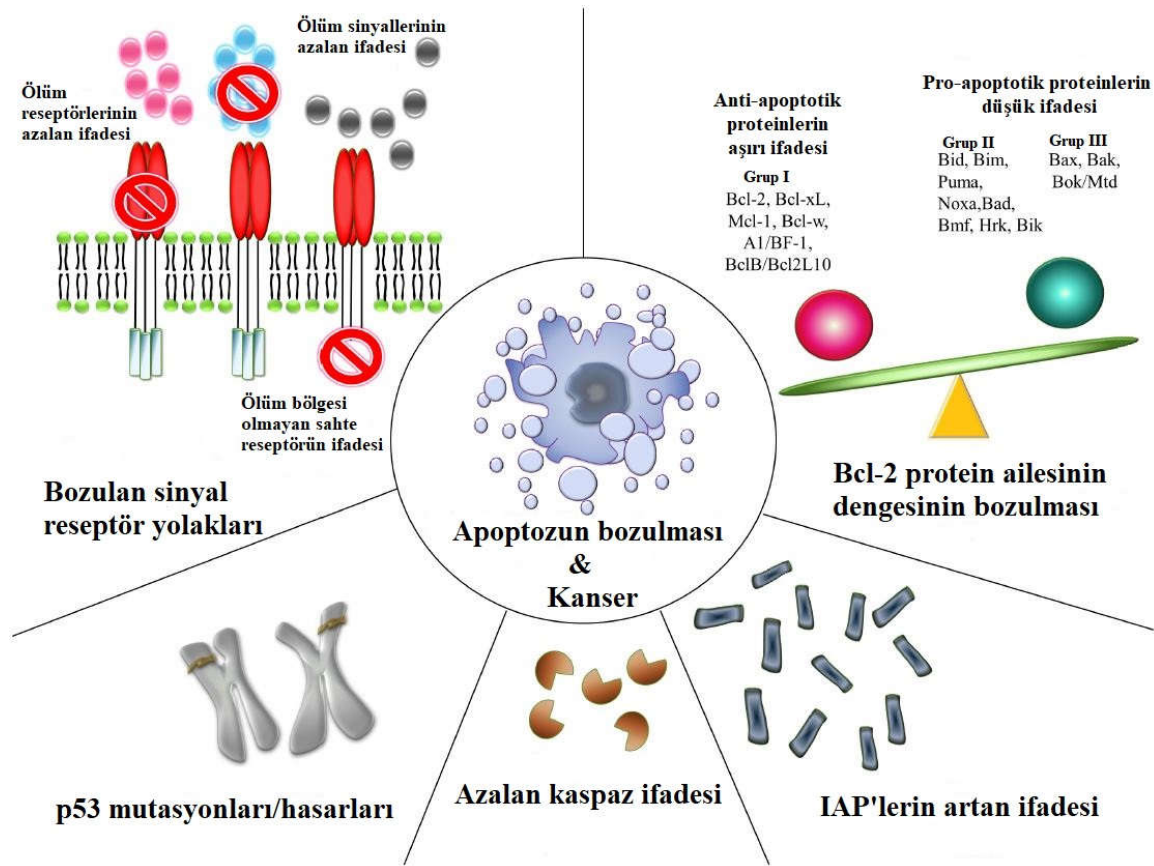
İntrinsik mitokondriyal yolak

Adından da anlaşılacağı gibi, intrinsik yolak hücre içinde başlatılır. Onarılamaz genetik hasar, hipoksi, sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonlarının aşırı yükselmesi ve şiddetli oksidatif stres gibi iç uyarıcılar, intrinsik mitokondriyal yolun başlamasını tetiklemektedir (Karp 2008). Bu yolak uyarıcılardan bağımsız olarak mitokondri geçirgenliğinin artması ve sitokrom-c gibi pro-apoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınması sonucunda aktifleşir (Danial and Korsmeyer 2004). Bu yolak, BCL-2 ailesine ait bir grup protein tarafından düzenlenmektedir (Tsujimoto *et al.* 1984). BCL-2 proteinlerinin pro-apoptotik üyeleri (örn. BAX, BAK, BAD, BCL-XS, BİD, BİK, BİM ve HRK) ve anti-apoptotik üyeleri (örn. BCL-2, BCL-XL, BCL-W, BFL-1 ve MCL-1) olmak üzere iki ana grubu vardır. Anti-apoptotik üyeler, sitokrom-c'nin mitokondriyal salınımını bloke etmek suretiyle apoptozu düzenlerken, pro-apoptotik üyeler sitokrom-c'nin mitokondriyal salınımını aktive ederek apoptozu tetikler. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki denge apoptozun başlatılıp başlatılmayacağını belirler (Reed 1997). Mitokondriden sitoplazmaya salınan diğer apoptotik faktörler apoptoz indükleyici faktör (AIF), mitokondri kaynaklı ikinci kaspaz aktivatörü (Smac), DIABLO ve Omi/HtrA2'dir. (Kroemer *et al.* 2007). Sitoplazmik sitokrom-c salınımı, sitokrom-c, Apaf-1 ve Kaspaz-9'dan oluşan apoptozom kompleksinin oluşumu ile Kaspaz-3'ü aktifleştirir (Kroemer *et al.* 2007). Diğer yandan, Smac/DIABLO veya Omi/HtrA2, apoptoz proteinleri inhibitörüne (IAP'ler) bağlanarak kaspaz aktivasyonunu destekler. Daha sonra Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2 IAP'lerin Kaspaz-3 veya -9 ile etkileşiminin bozulmasına yol açar (Kroemer *et al.* 2007; LaCasse *et al.* 2008). Ekstrinsik ve intrinsik yolların her ikisi de Kaspaz-3'e çıkar. Kaspaz-3, nükleer apoptozda görevli kaspaz ile aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü parçalar. Hücre döngüsü, hücre

iskeleti ve sinyal yolları üzerinde de etkileri olan kaspazlar, hücre iskelet proteinlerinin, protein kinazların, DNA tamir proteinlerinin ve endonükleazların inhibe edici alt birimlerinin aktivasyonuna neden olur. Böylece apoptozdaki tipik morfolojik değişiklikler meydana gelir (Ghobrial *et al.* 2005).

Apoptozis ve Karsinogenez

Apoptoz direnci kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden bir tanesidir. BCL-2 ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri arasındaki dengenin bozulması, kaspaz fonksiyonunun azalması ve ölüm reseptörü sinyallemesinde meydana gelen bozukluklar hücrenin apoptoza girişini engellemektedir (Wong 2011).



Şekil 11. Apoptozun bozulmasına ve karsinogeneze katkıda bulunan mekanizmalar (Wong 2011)

Pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein dengesinin bozulması

Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki denge hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, bazı genlerin aşırı veya yetersiz ekspresyonunun, kanser hücrelerinde apoptozu azaltarak karsinogeneze katkıda bulunduğu bilinmektedir (Wong 2011).

BCL-2 protein ailesi

BCL-2 protein ailesi, apoptozun düzenlenmesinde intrinsik yolda önemli bir rol oynayan pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerden oluşur (Grosset *et al.* 1999). BCL-2 proteinlerinin tümü mitokondri dış membranında konumlanır (Minn *et al.* 1997). İşlevlerine ve BCL-2 homoloji (BH) alanlarına göre BCL-2 protein ailesinin üyeleri üç gruba ayrılır (Dewson and Kluc 2010). İlk grup, dört BH alanının tümünü içeren anti-apoptotik proteinlerdir ve hücreyi apoptotik uyarılardan korurlar. BCL-2, Bcl-XL, MCL-1, BCL-W, A1/BF1-1 ve BCL-B/BCL2L10 proteinleri bu grupta yer alır. İkinci grup, yalnızca BH-3 proteinlerinden oluşur. Bu gruptaki proteinler BİD, BİM, PUMA, NOXA, BAD, BMF, HRK ve BİK'dir. DNA hasarı, büyüme faktörü eksikliği ve endoplazmik retikulum stresi gibi hücresel strese apoptozun başlatıcıları olarak aktive edildikleri için pro-apoptotiktirler. Üçüncü grubun üyeleri, dört BH alanını da içerir ve bunlar pro-apoptotiktir. BAX, BAK ve BOK/MTD bu gruptadır (Dewson and Kluc 2010). Pro-apoptotik BCL-2 üyeleri apoptozu indüklerken, anti-apoptotik BCL-2 üyeleri apoptozu engeller (Cory and Adams 2002).

BCL-2 protein ailesinin anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyelerinin dengesindeki bozulma, apoptoz mekanizmasında düzensizliklere yol açabilir. Bu duruma, bir veya daha fazla anti-apoptotik proteinin aşırı ifadesi, bir veya daha fazla pro-apoptotik proteinin yetersiz ifadesi ya da her iki durumun birlikteliği neden olabilir (Wong 2011).

p53

p53 proteini, 17. kromozomun kısa kolunda (17p13.1) yer alan TP53 tümör baskılayıcı gen tarafından kodlanan ve en iyi bilinen tümör baskılayıcı proteinlerden birisidir. İsmi molekül ağırlığından (53 kDa) almaktadır (Levine *et al.* 1991). Apoptozun uyarılmasında, hücre döngüsünün düzenlenmesinde, hücre yaşlanmada, DNA rekombinasyonunda ve gen amplifikasyonunda (Oren and Rotter 1999) rol oynamaktadır ve "genomun gardiyanı" olarak adlandırılır (Lane 1992). İnsan kanserlerinin %50'den fazlası p53 genindeki mutasyonlar ile ilişkilidir (Bai and Zhu 2006).

Apoptoz proteinleri inhibitörü (IAP'ler)

Apoptoz proteinleri inhibitörü (IAP'ler), apoptozisi, sitokinezi ve sinyal iletimini düzenleyen yapısal ve işlevsel olarak birbirine benzer protein grubudur. Bugüne kadar, NAIP (BIRC1), c-IAP1 (BIRC2), c-IAP2 (BIRC2), c-IAP2 (BIRC3), X'e bağlı IAP (XIAP, BIRC4), Survivin (BIRC5), Apollon (BRUCE, BIRC6), Livin/MLIAP (BIRC7) ve IAP benzeri protein 2 (BIRC8) olmak üzere sekiz IAP tanımlanmıştır (Vucic and Fairbrother 2007). Kaspazların endojen inhibitörleri olan IAP'ler, korunmuş BIR alanlarını kaspazların aktif bölgelerine

bağlayarak, aktif kaspazların bozunumuna yol açarak veya kaspazların substratlarına bağlanmasını engelleyerek kaspaz aktivitesini inhibe edebilirler (Wei *et al.* 2008). Birçok kanserde düzensiz IAP ekspresyonu bildirilmiştir (Wong 2011).

Kaspazlar

Kaspazlar apoptozun başlaması ve yürütülmesinde önemli moleküllerdir. İnflamasyon sürecinde görev alan kaspazlar (Kaspaz-1, -4, -5, -13 ve -14) ve apoptozda merkezi oynayan kaspazlar (Kaspaz-2, -3, -6, -7, -8, -9 ve -10) olmak üzere iki kaspaz grubu bulunmaktadır. Apoptozda görev alan kaspazlar kendi içinde başlatıcı (Kaspaz-2, -8, -9 ve -10) ve efektör (Kaspaz-3, -6 ve -7) kaspazlar olmak üzere ikiye ayrılır. Başlatıcı kaspazlar, apoptotik yolağın başlamasından birinci derecede sorumludur. Efektör kaspazlar ise, kendilerine spesifik proteinleri parçalamak suretiyle apoptotik hücre morfolojisinin oluşmasında etkili olurlar. Düşük kaspaz seviyesi veya kaspaz fonksiyonundaki bozulma apoptozun azalmasına sebebiyet vererek karsinogeneze katkıda bulunur (Fink and Cookson 2005). Bazı durumlarda, birden fazla kaspaz aşağı regüle edilerek tümör hücresi büyümesine ve gelişimine katkıda bulunabilir (Wong 2011).

Karsinogeneze PI3K/AKT/mTOR Sinyali

PI3K/AKT/mTOR sinyali, hücre büyümesi, çoğalması, hareketliliği ve sağ kalımı gibi hücrel fonksiyonları yürüten hücre içi ve hücre dışı uyarıları hücre içi sinyallere dönüştüren önemli bir yoldur. PI3K sinyalinin aktivasyonu, artan hücre döngüsü, metabolizma, hayatta kalma ve hareket kabiliyeti dâhil olmak üzere çoğu kanser gelişim sürecine katkıda bulunur (Vivanco and Sawyers 2002). Tablo 1’de, PI3K/AKT/mTOR yolağının ana düğümlerinde meydana gelen moleküler değişiklikler ve neden olduğu tümör tipleri gösterilmiştir.

Tablo 1. Kanserde PI3K/AKT/mTOR Yolağındaki Değişimler (Vivanco and Sawyers 2002)

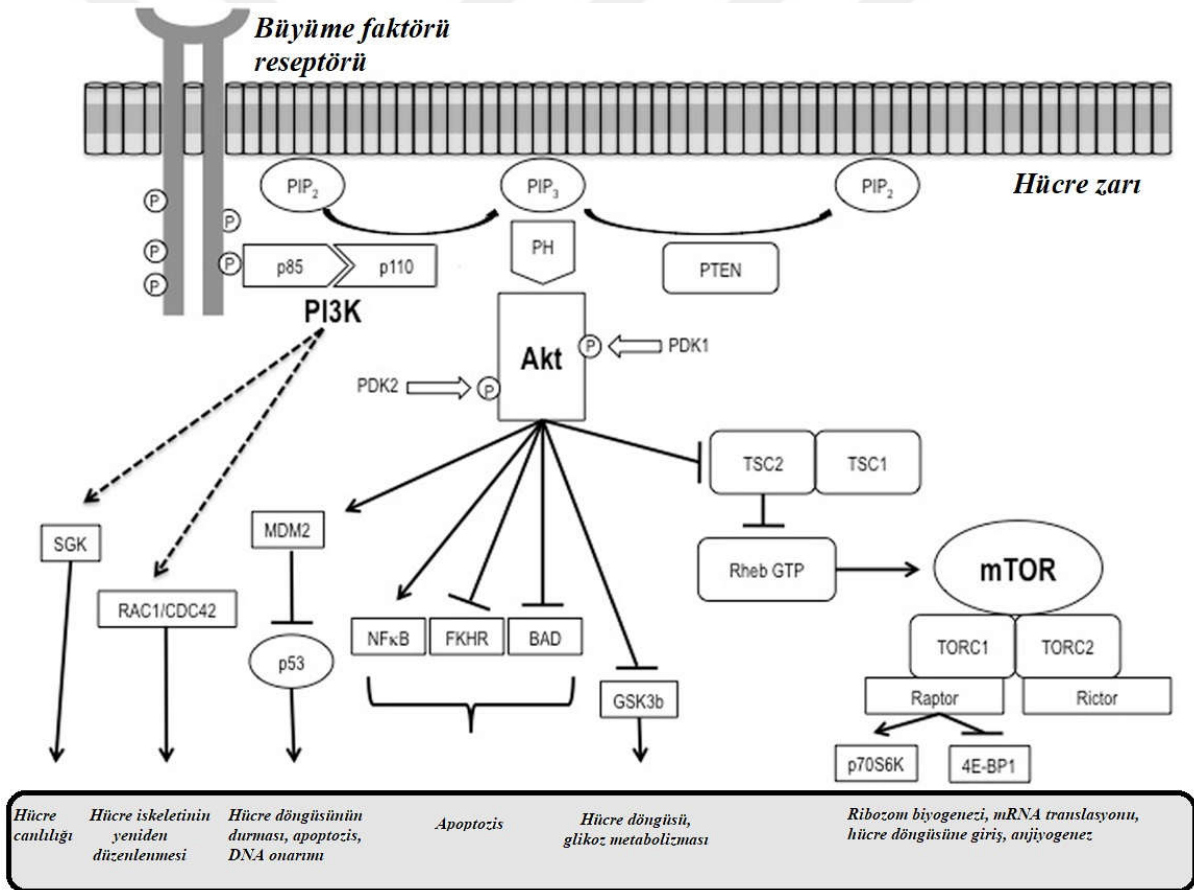
Tümör Tipi	Değişiklik Tipi
Glioblastoma	PTEN mutasyonu/eksikliği PTEN mutasyonları Artmış AKT-1 aktivitesi AKT-2 ampfikasyonu ve aşırı ekspresyonu PI3K <i>p110α</i> ampfikasyonu PI3K <i>p85α</i> ampfikasyonu
Meme	Artmış AKT-1 aktivitesi AKT-2 ampfikasyonu ve aşırı ekspresyonu RSK ampfikasyonu ve aşırı ekspresyonu PTEN heterozigot lokusunun kaybı PI3K ve AKT aşırı aktivasyonu
Endometrial	PTEN mutasyonu
Hepatoselüler karsinoma	PTEN mutasyonu
Melanoma	PTEN mutasyonu
Akciğer	PTEN mutasyonu
Böbrek hücreli karsinoma	PTEN mutasyonu
Tiroid	PTEN mutasyonu AKT aşırı aktivasyonu ve ekspresyonu

Büyüme faktörü reseptörleri tarafından düzenlenen PI3K aktivitesi, RTK'larda meydana gelen herhangi bir mutasyon ile artış gösterebilir. Bir PI3K aktivatörü olan epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) mutasyonu, küçük hücreli akciğer kanserinin gelişimine yol açan en önemli değişikliklerden biridir. EGFR gen amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu, glioblastom tipi tümörlerde sıklıkla gözlenirken, diğer kanser türlerinde çok yaygın değildir (Fumarola *et al.* 2014). PI3K'nın katalitik alt birimini şifreleyen PIK3CA geni, meme, endometriyal, kolorektal ve yumurtalık tümörleri dâhil olmak üzere çeşitli insan kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğrar. PI3K sinyalini antagonize eden PTEN tümör baskılayıcı geni, insan kanserinde en sık görülen mutasyona uğramış ikinci genidir. PTEN mutasyonu, glioblastoma ve endometrial sarkom dâhil olmak üzere hem kendiliğinden hem de kalıtsal kanserlerde tanımlanmıştır. Meme, kolorektal, pankreas ve yumurtalık kanserlerinde AKT-1'in mutasyonu bildirilmiştir (Freudlsperger *et al.* 2011).

Artan PI3K/AKT/mTOR sinyalleri, tümör anjiyogenezini teşvik eder. Nitrik oksit sentaz'ın (NOS) uyarılması, Glikojen sentaz kinaz-3β (GSK-3β) ve FOXO transkripsiyon faktörünün inhibisyonu ile bu sinyal yolu, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) aktivasyonunu indükleyen hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa (HIF-1α) ekspresyonunu artırır (Tokunaga *et al.* 2008). Ek olarak, AKT endojen anjiyojenik inhibitör trombospondin-1

proteinini (TSP-1) baskılar. Böylece, PI3K yolu, proanjyogenik faktörlerin aşırı ekspresyonu, antianjyogenik faktörlerin inhibisyonu ile anjyogenezi teşvik eder. PI3K yolu, çeşitli mekanizmalar yoluyla tümör metastazını arttırmaktadır (Şekil 12) (Yuan and Cantley 2008).

GSK3 β ve retinoblastoma (Rb) proteininin siklin bağımlı kinaz 4/6 (cdk4/6) ile AKT inhibisyonu, hücre döngüsü S-fazı giriş genlerinin E2F aracılı transkripsiyonu ile sonuçlanır. Ribozomal protein S6 kinaz beta-1'in (S6K1) rapamisin kinaz kompleksi-1'in hedefi (TORC1) aracılı aktivasyonu ve haberci RNA'ların translasyonuna izin veren ökaryot translasyon başlatma faktörü 4E bağlayıcı proteinin (4E-BP1) inhibisyonu, hücre döngüsünün S fazında ilerlemesi için gereklidir (Owusu-Brackett *et al.* 2019). Ek olarak, S fazına geçiş, p27 ve p21 gibi hücre döngüsü ilerlemesinin negatif regülatörlerini inhibe ederek gerçekleşir. Son olarak, FOXO3 proteinleri, MDM2 ve BAD gibi pro-apoptotik faktörlerin inhibisyonu, hücre döngüsü ilerlemesini arttırmaktadır (Şekil 12) (De *et al.* 2016).



Şekil 12. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağına dâhil olan anahtar moleküller (Porta *et al.* 2014)

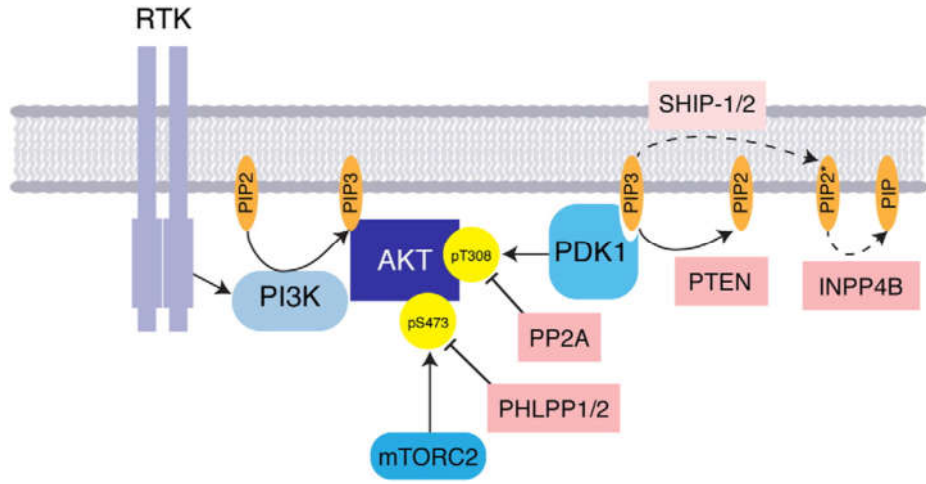
Karsinogeneizde AKT'nin Rolü

Serin/Treonin Kinaz AKT, aynı zamanda Protein Kinaz B (PKB) olarak da bilinen, insan kanserlerinde en sık aktive olan, AKT-1, AKT-2 ve AKT-3 olmak üzere üç izoformu olan bir protein kinazdır (Nelson *et al.* 2007). Hücre çoğalması, hücre sağ kalımı ve glukoz

metabolizmasının düzenlenmesinden sorumlu olan AKT-1 ve AKT-2 birçok dokuda ifade edilerek onkogenik ve apoptotik sinyal yolağında aktif olarak rol alır (Tokunaga *et al.* 2008). AKT-3 beyin dokusunda yoğun olarak ifade olur ve mitokondriyal biyogeneze katılır (Wright *et al.* 2008). AKT'nin hiperaktivasyonu apoptoz direnci, hücre büyümesi, hücre çoğalması ve enerji metabolizması ile ilişkilidir. Bu yoldaki sapmalar kilit bir faktördür ve tümör direncinde önemli bir rol oynar (Campbell *et al.* 2001; Tokunaga *et al.* 2006). AKT molekülünün ilişkili olduğu, PI3K/AKT/mTOR sinyalinin düzensizleştirilmesi meme kanseri, böbrek kanseri ve nöroendokrin tümörleri gibi birçok insan kanserlerinde ortaya konmuştur (Ocana *et al.* 2014). AKT/mTOR yolağının düzenlenmesi tümör baskılayıcı özellikte olan PTEN geni tarafından kodlanan hem lipid hem de protein fosfataz aktivitesine sahip olan PTEN proteini aracılığıyla gerçekleşir (Feng 2010). PTEN proteinin mutasyonu, aşırı AKT aktivasyonuna yol açarak kontrolsüz hücre çoğalması ile apoptozdan kaçış ve anjiyogenez meydana gelir (Phin *et al.* 2013). Bu nedenle AKT sinyali, tümör oluşum sürecinde yer alan çoklu yollarda merkezi bir rol oynar ve PI3K/AKT yolunun hiperaktivasyonu kanserlerde yaygın olarak görülür (Liu *et al.* 2009).

AKT aktivitesi, reseptör tirozin kinazlar (RTK) ile düzenlenir. RTK'lar, direkt veya adaptör proteinler ile birlikte sınıf I fosfatidilinositol 3-kinazları (PI3K) aktive eder. PI3K'lar, fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat (PIP3) üretmek için fosfatidilinositol-4,5-bifosfatı (PIP2) fosforile eder. Plazma membranında PIP3'e AKT bağlanması, AKT'nin fosforillenmesine neden olan bir konformasyonel değişikliği indükler. Bu değişiklik ağırlıklı olarak AKT aktivasyonuna yol açan T308 (Tirozin308) ve S473 (Serin473) rezidülerinde meydana gelir (Şekil 13). Fosfoinositid bağımlı kinaz-1 (PDK1) tarafından T308'in fosforilasyonu, substrat afinitesini arttıran ve AKT kinaz aktivitesini destekleyen yapısal bir değişikliğe yol açar (Lien *et al.* 2017). MTORC2 (rapamisin kompleksi-2'nin memeli hedefi) tarafından AKT'nin PIF cebinde S473'ün fosforilasyonu, AKT'nin PDK1'e afinitesini artırarak AKT aktivitesini arttırdığı düşünülmektedir (Sarbasov *et al.* 2005).

PI3K/AKT sinyal yolağının önemli negatif regülatörleri olan tümör baskılayıcı genler, PTEN (fosfataz ve tensin homologu), PP2A (protein fosfataz 2A), PHLPP (pH domain ve lösin bakımından zengin tekrarlı protein fosfataz I içerir) ve PIP3, AKT pT308 ve AKT pS473'ü defosforile eder (Şekil 13) (Gao *et al.* 2005).



Şekil 13. AKT'nin aktivasyonu ve negatif regülasyonu (Brown and Banerji 2017)

Normal Hücre Fizyolojisinde AKT'nin Rolü

AKT sinyali, kanserde merkezi bir rol oynamanın yanı sıra, normal hücre fizyolojisi için de gereklidir. Yetişkinlerde, AKT-1 hemen hemen her dokuda ifade edilir, AKT-2 insüline duyarlı dokularda daha yüksek ifade edilir ve AKT-3 tüm dokularda düşük seviyelerde bulunurken, beyin ve endokrin dokularda daha fazla ifade edilir (Uhlen *et al.* 2010; Uhlen *et al.* 2015).

AKT, glukoz homeostazında da önemli bir rol oynar ve AKT'nin farmakolojik inhibisyonu hiperglisemi ve hiperinsülinemi ile ilişkilidir (Crouthamel *et al.* 2009). AKT, glikojen sentezini uyarmanın yanı sıra, glukoz taşıyıcı GLUT4'ün plazma zarına translokasyonunu tetikleyerek hücrenin glukoz alımını da teşvik eder. (Manning and Cantley 2007).

Özellikle AKT-1 ve AKT-2, kardiyak büyümesini, kasılma fonksiyonunu ve koroner anjiyogenezi düzenlemek için de önemlidir. AKT-1 nakavt farelerde görülen ateroskleroza karşı normal endotelial fonksiyonu ve endotelial nitrik oksit sentezini korumak için AKT-1'in gerekliliği belirtilmiştir (Hers *et al.* 2011). AKT ayrıca trombosit aktivasyonunu ve agregasyonunu destekleyen, AKT sinyallemesinin sıkı kontrol ihtiyacını vurgulayan pro-trombotik bir etkiye sahiptir (Hers *et al.* 2011). AKT'nin kardiyovasküler ve endokrin sistemlerde oynadığı rolün yanı sıra nöro-koruyucu olduğu ve nöronlar arasındaki sinaptik iletimde rol oynadığı gösterilmiştir (Hers *et al.* 2011). Normal insan fizyolojisinde AKT sinyallemesinin geniş kapsamlı etkileri göz önüne alındığında, klinikte AKT inhibitörlerinin geniş kapsamlı etkileri olduğu görülmektedir.

AKT İnhibitorleri

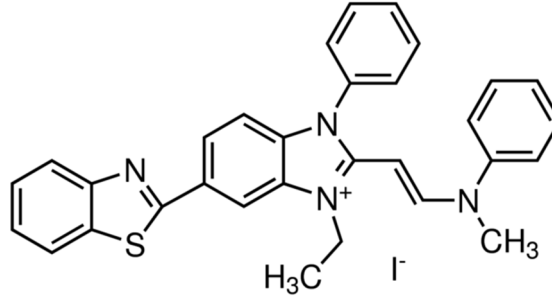
AKT molekülü, kanser tedavisi için bir hedef olarak kabul edilir ve etkili farmasotik inhibitörlerin/ajanların geliştirilmesi önem arz etmektedir (Brasseur *et al.* 2017). Yapılan prelinik çalışmalar ile potansiyel inhibe edici fonksiyonları bulunan çeşitli AKT inhibitörleri bildirilmiştir. AKT inhibitörleri, inhibisyon mekanizmalarına ve bunların kimyasal bileşimlerine göre sınıflandırılır. Bunlar ATP-rekabetçi inhibitörler, allosterik inhibitörler ve geri dönüşümsüz inhibitörler olarak üç başlık altında sınıflandırılabilir. ATP-rekabetçi inhibitörler, hedeflerinin fosfotransferaz aktivitesini bloke etmek için ATP ile rekabet ederek hareket eden en güçlü protein kinaz inhibitörleridir. Örneğin, izokinolin-5-sülfonamidler, aminofurazanlar, azepan türevleri, tiyofenkarboksamidler ve türevleri ve 2,3-difenilkinoksalin. Allosterik inhibitörler, aktif bölgeden başka bir bölgedeki enzime bağlanarak enzimin yapısal olarak değişmesine neden olur, böylece aktif bölge artık substrat için kullanılamaz. ATP-rekabetçi ve allosterik inhibitörler doza bağımlı bir şekilde AKT kinaz aktivitesini inhibe eder (Thorpe *et al.* 2015). Allosterik inhibitörler, ATP-rekabetçi inhibitörlere göre daha fazla spesifiteye, düşük toksisiteye ve daha az yan etkiye sahiptir (Lu *et al.* 2014). AKT'yi hedef alan diğer belirgin allosterik inhibitörlerin bazıları, 2,3-Diphenilquinoxaline, indol-3-karbinol ve bunların analogları, sülfonamiderivatifleri, tiyoüre türevleri ve pürin türevlerinin plazma zarının toplanmasını önleyen alkil fosfolipitlerdir (ALP'ler). Üçüncü tip inhibitörler, enzimlere kovalent veya kovalent olmayan şekilde bağlanan ve etkilerini geri dönüşümsüz olarak inhibe eden geri dönüşümsüz inhibitörlerdir. *Streptomyces sp.*'den izole edilen doğal bir ürün olan laktokinomisin, kendisine kovalent olarak bağlanan ve fosforilleme kabiliyetini potansiyel olarak inhibe eden geri dönüşümsüz bir AKT inhibitörüdür (Brasseur *et al.* 2017). Ayrıca, doğal olarak oluşan antosiyaninler, likorin ve verrucarın J gibi, AKT inhibitör aktiviteleri ile anti-tümör ve anti-metastatik özellik gösteren başka küçük inhibitörler de vardır. Kanser tedavisi için en etkili AKT inhibitör tipinin belirlenmesi, AKT geninde meydana gelen mutasyon tipine bağlıdır. Çeşitli AKT inhibitörlerinin anti-tümör etkisini ve moleküler mekanizmasını anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Urak *et al.* 2017).

AKT inhibitörü-IV

AKT inhibitörü-IV (5-(2-Benzotiyazolil)-3-etil-2-[2-(metilfenilamino)etenil]-1-fenil-1H-benzimidazolium iyodür), AKT'nin yukarı akışında, ancak PI3K'nın aşağı akışında bir kinazın ATP bağlanma bölgesini hedefleyerek AKT fosforilasyonunu/aktivasyonunu inhibe eden hücre geçirgen bir benzimidazol bileşiğidir (Sun *et al.* 2011).

PI3K/AKT (protein kinaz B) yolağının inhibitörleri, antikanser ve antiviral ajanlar olarak araştırılmaktadır. Benzimidazol türevi AKT inhibitörü-IV (5-(2-Benzotiyazolil)-3-etil-

2-[2-(metilfenilamino)etenil]-1-fenil- 1H-benzimidazolyum iyodür) bu yolu etkiler ve güçlü antikanser ve antiviral aktivite sergiler (Sun *et al.* 2011).



Şekil 14. AKT inhibitörü-IV'ün kimyasal yapısı

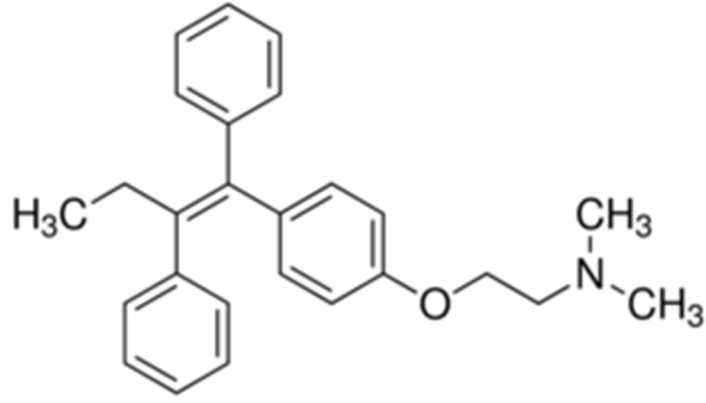
Tamoksifen

Tamoksifen, 1977 yılında, birincil meme kanserinin adjuvan tedavisi için kullanımı onaylanmış bir ilaçtır (Jordan 1994).

Tamoksifen, östrojenin kendi reseptörlerine bağlanmasını inhibe eden bir antiöstrojen görevi görerek antikanser etki göstermektedir (Osborne *et al.* 1996). Tamoksifen, otokrin veya parakrin mekanizmalar aracılığı ile büyümeyi uyarabilen büyüme faktörleri ve kanser hücreleri tarafından salgılanan anjiyogenik faktörler dâhil olmak üzere östrojen tarafından düzenlenen genlerin ekspresyonunu inhibe eder (Arteaga and Osborne 1991). Ayrıca, hücre döngüsünü G₁ fazında durdurarak hücre proliferasyonunu yavaşlatır ve programlanmış hücre ölümüne doğrudan neden olabilir (Ellis *et al.* 1997).

Tamoksifen, adjuvan tedavi olarak uygulanması meme kanseri nüks ve ölüm riskini azaltır. Bu nedenle, östrojen reseptör pozitif invaziv meme kanseri olan hem menopoz öncesi hem de menopoz sonrası kadınlar için kullanımı endikedir. Tamoksifen ayrıca metastatik meme kanserli menopoz sonrası kadınlar için tercih edilen ilk hormonal tedavidir ve genç kadınlarda birinci veya ikinci basamak tedavi olarak faydalıdır. Güvenli ve iyi tolere edilebilir bir ilaç tedavisi olmasının yanısıra endometriyal kanser riskini artırabilir (Osborne 1998).

Tamoksifenin meme kanseri gelişimi için yüksek risk altındaki kadınlarda kullanımına ilave olarak, kardiyovasküler mortalite ve kemik yoğunluğu üzerinede ek faydaları bulunmaktadır (Osborne 1998).



Şekil 15. Tamoksifenin kimyasal yapısı

Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, AKT inhibitörü-IV'ün MCF-7 insan meme kanseri hücrelerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerini, PI3K/AKT yolağının hormon tedavisine dirençte çok önemli bir mekanizma olduğunu göz önünde bulundurarak, meme kanseri tedavisinde kullanılan hormon tedavisi ilaçlarından biri olan tamoksifen ile kıyaslayarak belirlemeyi amaçladık. Bu bağlamda, MCF-7 hücreleri hücre kültür ortamında çoğaltıldı ve etkilerini araştırmak istediğimiz AKT inhibitörü-IV ve tamoksifen ile muamele edildi. Sonrasında yapılan çeşitli analiz yöntemleri ile uygulanan bileşiklerin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik, antiproleratif ve apoptotik yollarda görev alan bazı genler üzerine etkileri belirlendi.

KURAMSAL TEMELLER

Kanser, hücrelerin anormal olarak bölünmesi sonucu farklı doku ve organlara metastazı ile karakterize olan karmaşık süreçler içeren bir hastalıktır. Kanser tedavisinde hastalığın seyrine göre cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immünolojik ve kimyasal tedaviler gibi farklı tedavi yöntemleri uygulanmaktadır (DeVita *et al.* 2008). Son yıllarda kanser mekanizmasının daha iyi anlaşılması üzerine hedefe yönelik tedavi uygulamaları tedavinin başarısında önem arz etmektedir (Peters and Brown 2015).

Meme kanseri son yıllarda kadınlar arasında artan bir sorun olarak tanımlanmaktadır. Dünya çapında, meme kanseri her yıl tahminen 1,15 milyon kadını etkilemektedir (Ferlay *et al.* 2002). Meme kanserinin önlenmesi, erken teşhis ve tedavideki ilerlemelere rağmen, meme kanserli hastalar ortalama 2 yıllık sağ kalımla (18-24 ay) metastatik ve tedavisi olmayan evreye girmektedir (Chia *et al.* 2003).

Hem genetik hem de genetik olmayan risk faktörleri meme kanseri gelişimini etkiler. Genetik faktörler, yüksek ve orta riskli kanser yatkınlık genlerinde (sırasıyla BRCA1 veya BRCA2 ve CHEK2) ve meme kanseriyle ilişkili ortak tek nükleotid polimorfizmlerinde (SNP'ler) mutasyonları içerir (Coughlin 2019). Genetik olmayan risk faktörleri arasında artan yaş, kişisel meme patolojileri öyküsü (atipik hiperplazi ve in situ lobüler karsinom vb.), yüksek mamografik yoğunluk, yüksek vücut kitle indeksi, eksojen hormon kullanımı, alkol, yetersiz fiziksel aktivite ve üreme faktörleri bulunur (He *et al.* 2010; Stolk *et al.* 2012; Stone *et al.* 2006).

Canlılar yaşamını devam ettirebilmek için hücreleri sürekli kendilerini yenilemelidir. Ölen ve yaşlanan hücrelerin yerini yeni hücreler alır. Bu mekanizma hücrelerin bölünüp çoğalmasını sağlayan genler ve aşırı hücre çoğalmasını engelleyen genler tarafından kontrol edilmektedir (Kumar *et al.* 1992). Bu genler; proto-onkogenler ve anti-onkogenlerdir. Bu genlerin ekspresyonunun bozulması hücrelerin kontrolsüz ve anormal olarak çoğalmasına neden olur (Sutherland 1999).

İlk olarak Kerr ve arkadaşları tarafından hücre ölümünün morfolojik bir biçimi olarak tanımlanan apoptosiz (Kerr *et al.* 1972), organizmalarda fonksiyonunu kaybeden ve gereksinim duyulmayan hücrelerin programlı ölümüdür. Doku embriyogenezinde, organizmaların şekillenmesinde ve çeşitli hastalıklara kadar birçok mekanizmada önemli roller almaktadır.

Genel olarak apoptozis, belirli morfolojik özellikler ile karakterize edilen enerji bağımlı biyokimyasal bir mekanizmadır (Horvitz 1999.).

Apoptozis, spesifik reseptör molekülleri CD95, büyüme faktörleri, tümör nekroz faktör (TNF), ultraviyole ışınlar, radyasyon, ısı şoku, oksidatif stres, sitotoksik teröpatikler ve bakteriler gibi çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik indükleyiciler tarafından indüklenebilir (Janssen *et al.* 2003; Lancellotti *et al.* 2009). Apoptoza uğrayan hücrenin morfolojisi, hücre büzülmesi, nükleer kondensasyon, membran kabarması, membrana bağlı apoptotik cisimlere parçalanma ile karakterizedir (Saikumar *et al.* 1999).

Apoptozun bozulması, kanser, viral enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif bozukluklar ve AIDS dâhil olmak üzere bir dizi insan hastalığının patogenezinde katkıda bulunmaktadır (Thompson 1995).

Memelilerde, dışsal yol (ölüm reseptörünün aracılık ettiği yol) ve içsel yol (mitokondriyal aracılı yol) olmak üzere iki merkezi apoptotik yol vardır (Hassen *et al.* 2012). Bu iki yolun yanı sıra, endoplazmik retikulum stresi ile aktive edilen apoptozda Kaspaz-12 veya Kaspaz-2'nin başlatıcı rolü de dâhil olmak üzere daha az bilinen ek kaspaz aktivasyon yolları vardır (Szegezdi *et al.* 2006). Perforin/granzim yolu, T hücresi aracılı sitotoksititeyi içeren başka bir yoldur. Bu yol, granzim A veya granzim B yoluyla apoptozu indükleyebilir. Tüm bu apoptotik yollar (dışsal, içsel ve granzim B yolları) aynı terminalde birleşir (Jin and El-Deiry 2005).

BCL-2, apoptozu inhibe etmek suretiyle hücre sağkalımını artıran bir proto-onkogendir. Yapılan çalışmalar, BCL-2'nin birçok hücre tipinde çeşitli uyarılar tarafından apoptozu durdurabileceğini veya erteleyebileceğini göstermektedir (Hockenbery *et al.* 1990). BCL-2'nin anti-apoptotik fonksiyonunu açıklamak için birkaç hipotez ortaya atılmıştır. BCL-2, Ca^{+2} homeostazı için bir regülatör görevi görebilir (Gulbins *et al.* 2000) veya bir antioksidan olarak aktivite gösterebilir (Haunstetter and Izumo 1998). Buna ek olarak, BCL-2, apoptozise özgü intraselüler proteolize aracılık eden sitozolik kaspazların mitokondri aktivatörlerinin salınmasını önleyebilir (Chao and Korsmeyer 1998).

Pro-apoptotik ve anti-apoptotik BCL-2 proteinleri arasında bir denge mevcuttur. Bu dengenin bozulması hücrenin kontrolsüz çoğalmasına sebep olmaktadır. Anti-apoptotik üyelerinden olan BAX ve pro-apoptotik BCL-2 arasındaki dengenin, BAX lehine kayması ile hücreler bir ölüm komutu yürütür ancak dengenin BCL-2 lehine kayması ile apoptozis engellenir ve hücreler hayatta kalır. BAX eksikliği olan fareler hücresel hiperplazi sergiler ve bu durum BAX'ın bir pro-apoptotik molekül olarak rolünü teyit eder. BAX kaspazları aktive

edebildiği ve mitokondriyal disfonksiyonu tetikleyebildiği gibi, BCL-2 ifadesi her iki olayı da bloke edebilir (Reed 1997; Korsmeyer 1999.)

Apoptoz ile yakından ilişkili kaspazlar, aspartata özgü sistein proteazlar enzim ailesinin üyeleridir. Kaspazların aktivasyonu ve işlevi, IAP, BCL-2 ailesi proteinleri, kalpain ve Ca^{+2} gibi çeşitli moleküller tarafından düzenlenir (Fan *et al.* 2005). Sağlıklı hücrelerde kaspazlar inaktif durumdadır, ölüm uyarısına cevap olarak aktif hale geçerler. Kaspazlar, apoptozda morfolojik ve biyokimyasal özelliklerden sorumludur. Yapılarına ve fonksiyonlarına göre, başlatıcı kaspazlar (Kaspaz-2, -8, -9 ve -10) ve efektör kaspazlar (Kaspaz-3, -6 ve -7) olmak üzere iki kaspaz gruba bulunmaktadır. Başlatıcı kaspazlar, kaspaz takviye bölgesi (CARD) veya efektör ölüm bölgesi (DED) ile etkileşimi sağlayan uzun N-terminal bölgeleri bulundurmalarından dolayı efektör kaspazlardan ayrılırlar (Hunter *et al.* 2007).

AKT, üç izoformlu (AKT-1, AKT-2 ve AKT-3) bir Serin/Treonin kinazdır. PI3K'nın downstream hedefidir ve kanser hücrelerinin sağ kalımında, hücre döngüsüne girişte ve glukoz metabolizmasında önemli bir rol oynar (Engelman 2009). Meme kanserlerinde, artmış AKT-1 aktivitesi, AKT-2 ampfikasyonu ve aşırı ekspresyonu bildirilmiştir (Vivanco and Sawyers 2002).

PI3K/AKT/mTOR yolu, hücre dışı uyarılara yanıt olarak sinyal iletimi ile hücre fizyolojisinde merkezi bir rol oynar. Bu yolak proliferasyon, büyüme, hayatta kalma, hareketlilik ve metabolizma gibi birçok hücrel işlevleri kontrol etmektedir (Engelman *et al.* 2006). Bu sinyal yolundaki mutasyonlar, kanserde sıklıkla bulunur, özellikle meme kanserinde yaygındır ve tümörlerin yaklaşık %60'ı PI3K/AKT/mTOR yolunu aktive eden genetik değişiklikleri barındırır (Engelman 2009).

AKT, mitokondriyal değişiklikleri, kaspazdan bağımsız bir şekilde geciktirerek apoptozu ve prokaspazların aktif kaspaz formlarına dönüşmesini engeller ayrıca AKT aktivasyonu, sitokrom-c'nin mitokondriden salınmasını ve mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikleri inhibe etmektedir. Yani, AKT'nin sitokrom-c salınımından önce apoptoz zincirine müdahale ederek hücre canlılığını ve kaspaz aktivasyonunu desteklediğini göstermektedir (Kennedy *et al.* 1999).

Yapısal olarak aktif AKT veya BCL-2'nin kararlı ekspresyonunun apoptozu engellediğini, ancak yalnızca BCL-2'nin mitokondriden sitokrom-c'nin salınmasını önlemektedir. Bu da AKT'nin post-mitokondriyal düzeyde apoptozu düzenlediğini düşündürmektedir. Bununla tutarlı olarak, aktif AKT'nin aşırı ekspresyonu, endojen BCL-2, BCL-X veya BAX'ın ekspresyon seviyelerini değiştirmeden hücrelerin apoptozu girişini engeller (Zhou *et al.* 2000).

PI3K yolağının, kötü huylu fenotipe katkıda bulunabilecek çeşitli hücrel işlemlerde merkezi bir rol oynadığı iyi bilinmektedir. Buna göre, bu sinyalleme kademesindeki anahtar düğümlerin farmakolojik inhibisyonunu hedefleyen inhibitörlerin geliştirilmesi bir odak noktası olmuştur. Bugüne kadar, upstream reseptör tirozin kinazları hedefleyen teröpatikler klinik olarak başarı elde etmiştir. PI3K, AKT ve mTORC1 ve 2'nin yeni inhibitörleri erken faz klinik deneylerinden geçmektedir. Bu inhibitörlerin bazı eksiklikleri iyileştirilerek kanser hastaları için anlamlı faydalar sağlayacağı umulmaktadır (Markman *et al.* 2010).

AKT'yi hedefleyen ve inhibisyonuna neden olan bileşikler, hem ATP-rekabetçi aktif bölgeye yönelik inhibitörleri ve ATP-rekabetçi olmayan allosterik bileşikleri içermektedir. Bazı AKT inhibitörleri ise her iki bileşik sınıfını temsil eden inhibitörlerdir ve insan kanserlerinin tedavisi için etkinlikleri klinik deneyler ile değerlendirilmektedir (Pal *et al.* 2010).

Meuillet *et al.* (2003) tarafından yapılan araştırmaya göre, PH alanını hedefleyen ve membran lokalizasyonunu önleyen bir başka lipid bazlı AKT inhibitörü olan PX-316, MCF-7 insan meme kanseri ile HT29 insan kolon kanseri hücre hatlarında hücre canlılığını azalttığı aynı zamanda fareler ve sıçanlar için düşük toksisite sergilediği bildirilmektedir. Bu nedenle, PX-316, AKT hayatta kalma sinyalini inhibe eden yeni bir potansiyel teröpatik sınıfının öncü bileşiği olarak tanımlandığı ifade edilmektedir.

Heerding *et al.* (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, bir aminofurazan türevi, ATP rekabetçi AKT inhibitörü olan GSK690693'ün, AKT kinaz aktivitesinin hücre içi inhibisyonu ile tutarlı aktiviteye sahip tümör hücresi proliferasyonunu inhibe ederek apoptozu indüklediği belirtilmektedir. Ayrıca klinik öncesi çalışmalarda, GSK690693'ün çeşitli hematolojik neoplazinin proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmektedir.

Levy *et al.* (2009), farklı hematolojik neoplaziyi temsil eden 112 hücre hattının proliferasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Buna göre, test edilen hücre hatlarının yüzde elli beşinin, AKT inhibitörüne duyarlı olduğunu ve akut lenfoblastik lösemi (ALL) hücre hatlarının GSK690693 inhibitörüne en duyarlı hücre olduğunu belirtmişlerdir. AKT'nin hücre hayatta kalmasındaki rolü ile tutarlı olarak GSK690693'ün, hassas ALL hücre hatlarında apoptozu da indüklediği sonucuna varmışlardır.

Chautard *et al.* (2010), malign glioma hücre hattı SF763 hücrelerinde AKT inhibitörü-IV'ün, AKT aktivasyonunu önemli ölçüde düşürdüğü sonucuna varmışlardır.

Li *et al.* (2010), AKT inhibitörü olan perifosin ile *in vitro* olarak tedavi edilen AS, NGP, BE2, KCNR insan nöroblastoma hücre hatlarının tamamında AKT fosforilasyonun azaldığını ve apoptozisin arttığını bildirmişlerdir. Perifosin kaynaklı hücre ölümünün kaspaz bağımlı

apoptotik yolla ilişkili olup olmadığını Kaspaz-3/-7 aktivite deneyi ile belirlemişler ve tüm insan nöroblastoma hücrelerinin Kaspaz-3/-7 aktivitesinde bir artış tesbit etmişlerdir.

Greenwood *et al.* (2011) tarafından yapılan araştırmada, Faz-I klinik denemelerinde kullanılan ATP-rekabetçi inhibitörlerden olan, AZD5363'ün meme ve prostat kanseri hücre hatlarında PRAS40, GSK-3p ve downstream markörü P70S6K dâhil olmak üzere bir dizi AKT substratının fosforilasyonunun inhibisyonuna yol açtığını göstermişlerdir. AZD5363'ün, meme ve prostat hücre hatlarında bir anti-proliferatif ve bazı durumlarda sitotoksikite ile sonuçlanan bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Hirai *et al.* (2010) yaptıkları çalışma ile, allosterik AKT inhibitörü MK-2206'nın birkaç antikanser ajan ile kombinasyon halinde etkisini değerlendirmişlerdir. MK-2206'nın, insan kanser hücre hatlarında, erlotinib (bir epidermal büyüme faktörü reseptörü inhibitörü) veya lapatinib (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 inhibitörü) gibi moleküler hedefli ajanlarla kombinasyon halinde sinerjik olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği sonucuna varmışlardır.

Tan *et al.* (2011), solid tümörleri tedavi etmek için geliştirilmekte olan allosterik AKT inhibitörü MK-2206'nın fare adiposit hücre hattında (3T3-L12) glukoz metabolizması üzerine etkilerini araştırmışlardır. Buna göre, MK-2206'nın T308AKT ve S473AKT fosforilasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Yap *et al.* (2011), *in vitro* ve *in vivo* AKT aktivitesini bloke eden bir ATP-rekabetçi AKT inhibitörü olan CCT128930'un, AKT inhibisyonu ile tutarlı olarak, belirgin antiproliferatif aktivite sergilediğini ve *in vitro* çoklu tümör hücre hatlarında bir dizi AKT substratının fosforilasyonunu inhibe ettiğini bildirmekle beraber, PI3K/AKT yolağının diğer bildirilen spesifik AKT inhibitörleri ile tutarlı olarak U87MG insan glioblastoma hücrelerinde baskın bir şekilde hücre döngüsünün G₁/G₀ evresinde tutuklamasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Cheng *et al.* (2012), yeni allosterik AKT inhibitörü MK-2206'nın, otofajiden apoptoza geçişi teşvik ederek malign gliomayı inhibe etmede gefitinib ile sinerji oluşturabildiğini ve bu kombine tedavinin kötü huylu glioma veya diğer kanser türlerinin tedavisinde daha yararlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Li *et al.* (2019), allosterik AKT inhibitörü MK-2206 ve Glut1 inhibitörü WZB117 kombinasyonunun, hem ER (+) MCF-7 hem de üçlü negatif MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde AKT inhibisyonu ve ROS indüksiyonu yoluyla sinerjik bir sitotoksik etki

gösterdiğini, bu durumda DNA hasarına neden olabileceğini ayrıca bu kombinasyonunu nihayetinde meme kanseri hücrelerinde apoptozise yol açabileceğini bildirmişlerdir.

Yamaji *et al.* (2017), ATP rekabetçi AKT inhibitörü olan Afuresertib'in altı farklı insan malign plevral mezotelyoma (MPM) (ACC-MESO-4, Y-MESO-8A, MSTO-211H, NCI-H28, NCI-H290 ve NCI-H2052) hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Buna göre afuresertibin, ACC-MESO-4 ve MSTO-211H hücrelerinde Kaspaz-3 ve Kaspaz-7 aktiviteleri ile birlikte apoptotik hücre sayısını önemli ölçüde artırdığını, ayrıca G₁ fazında hücre döngüsünü güçlü bir şekilde inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.



MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Cihazları

Tablo 2. Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Cihazları

Cihaz	Marka ve Model
Biyogüvenlik kabini	Bilser-BLF 2000
Karbondioksitli inkübatör	Thermo-3131
İnverted mikroskop	Optech
Nanodrop	MaestroNano
Mikroplaka okuyucu	Thermo Scientific-MultiSkan Go
Su banyosu	WiseBath-WB11
Otoklav	DAIHAN-MaXterile-80
Ultra saf su cihazı	Thermo Scientific-Smart2Pure
Vakum pompası	Rocker 300
Termal cyclers	Bio-Rad-T100
Real Time PCR	Bio-Rad-CFX600
Santrifüj	Thermo Scientific-Medifuge
Soğutmalı santrifüj	Thermo Scientific-SL 8R
Masaüstü spin santrifüj	Wisd-CF10
Buzdolabı	Arçelik-4263
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik-4263
Derin dondurucu (-86°C)	Thermo Scientific-88400v
Sıvı azot tankı	Arpege
Hassas terazi	Shimadzu-AUW220D
Terazi	Kern-PFB2000-2
Blok ısıtıcı	Stuart-SBH130
Mikropipet seti	Thermo Fischer
Otomatik pipetler	Gilson
Spin vortex	Scilogex-MX-S

Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Kimyasal	Marka
AKT inhibitörü-IV (5-(2-Benzotiazolil)-3-etil-2-[2-(metilfenilamino)etenil]-1-fenil-1H-benzimidazolyum iyodür	Sigma
Tamoksifen	Sigma
DMEM	EuroClone
MEM	Biological Industries
Penisilin/Streptomisin	HyClone
FBS	PANBiotech
PBS	Biological Industries
Tripsin-EDTA	Biowest
Tripan blue	Sigma
DMSO	MilliporeSigma
Etanol	Sigma
PCR primerleri	Sentegen
5, 10 ve 25 mL'lik serolojik pipetler	Nest
Cam pastör pipeti	Hirschmann
15 ve 50 mL'lik falkon tüpler	Nest
15 ve 50 mL'lik ependorf tüpler	Isolab
Mikrosantrifüj tüpleri	Isolab
PCR tüpleri	Isolab
75 cm ² hücre kültür flaskı	Nest
Kryotüp	Tarsons
6 ve 96 kuyucuklu mikrolakalar	Corning

Çalışmada Kullanılan Kitler

Tablo 4. Çalışma Kapsamında Kullanılan Kitler

Kit	Marka
MTT	ThermoFischer
Cell Death Detection ELISA Kit	Roche
RNA İzolasyon Kiti	HibriGen
cDNA Sentez Kiti	Bio-Rad
2 x qPCR BIO SyGreen Mix Lo-ROX Kit	PCR Biosystems

Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Tablo 5. Çalışma Kapsamında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Çözelti	Hazırlanışı
DMEM besiyeri	500 mL'lik yüksek glukoz içeren DMEM medyum içerisine 50 mL FBS ve 5 mL penisilin/streptomisin ilave edildi ve kullanımı için +4°C'ye kaldırıldı.
Hücre dondurma medyumu	100 mL için, 95 mL DMEM medyum ve 5 mL DMSO karıştırıldı, 10 mL'lik alikuatlara ayrıldı ve kullanımı için -20°C'ye kaldırıldı.

Hücre Hattı

Deneysel çalışmalarda MCF-7 insan meme kanser hücre hattı kullanıldı. Kullanılan MCF-7 hücre hattının özellikleri Tablo 6'da belirtildi.

Tablo 6. Çalışma Kapsamında Kullanılan MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattının Özellikleri

Organizma	İnsan
Doku	Meme
Morfoloji	Epitel
Hastalık	Adenokarsinom
Kültür Özelliği	Adherent
Yaş	69
Cinsiyet	Kadın
Etnik köken	Kafkas

Metod

Hücre Kültürü

Hücre pasajlama ve saklama

MCF-7 meme kanseri hücreleri, 75 cm² kültür flasklarında içerisine %10 FBS, 100 U/mL penisilin ve 0,1 mg/mL streptomisin ilave edilerek hazırlanan DMEM besiyerinde 37°C'de, %95 nem ve %5 CO₂'li inkübatörde kültür ortamında çoğaltıldı. Hücreler her gün kontrol edildi ve besiyerleri tazelendi. İnvirt mikroskop altında incelenen hücreler konfluent olduğu zaman (%80-85 yoğunluğa ulaştıklarında) pasajlama yapıldı. İlk olarak hücre kültür flasklarında bulunan besiyeri aspire edildi ve flasklar 5 mL PBS ile yıkandı. Daha sonra 6 mL Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek flasklar 5 dakika inkübatörde inkübe edildi ve hücrelerin

flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. İnkübasyonu takiben laminar flow kabini içerisine alınan hücre kültür flasklarına eklenen tripsin miktarı kadar DMEM besiyeri eklendi. Flasklarda bulunan hücre süspansiyonu steril pipetler ile flasklardan çekilerek 15 mL'lik steril falkon tüplere alındı. Bu tüpler 2000 rpm'de 4 dakika santrifüjlendi ve süpernatant kısmı vakum pompası ile aspire edildi. Pelet üzerine 6 mL besiyeri eklenerek birkaç kez pipetleme yapıldı ve içerisinde 20 mL besiyeri bulunan hücre kültür flasklarına 1 mL hücre süspansiyonu eklendi. Stok olarak saklamak için, Tripsin-EDTA muamelesinden sonra 15 mL'lik falkon tüpleri içerisinde bulunan santrifüj edilen ve süpernatantı uzaklaştırılan hücre pelletlerinden bazılarının üzerine 1 mL dondurma medyumunu (%95 medyum, %5 DMSO) eklenerek birkaç kez pipetleme yapıldı. Pipetlemeden sonra falkon tüpteki karışım pipetle çekilerek dondurma tüplerine (cryotüp) alındı. Dondurma tüplerinde bulunan karışım ilk olarak bir gece -86°C' de tutuldu ve sonrasında sıvı azot tankına (-196°C) bırakıldı.

Hücre kültürü deneylerinde, MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine, AKT inhibitörü-IV ve tamoksifen (referans kanser ilacı) uygulaması 24 saat süre ile uygulandı.

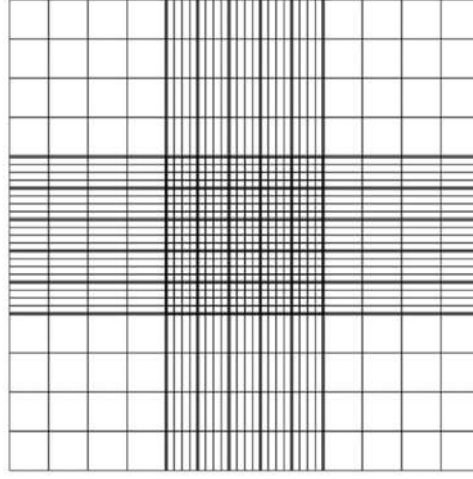
Hücre sayımı

Pasajı yapılan hücrelerin ekiminin yapılabilmesi için mililitrede bulunan hücre sayısının belirlenmesi, hücre kültürü ve sitotoksosite çalışmaları için önem arz etmektedir.

Bu amaçla hücre sayımı için aşağıdaki yöntem uygulandı.

1. Süspansiyon hale getirilmiş hücrelerden 10 µL alındı ve 10 µL Tyrpan blue boyası eklenerek karıştırıldı (Tyrpan blue membran bütünlüğü bozulmuş olan ölü hücrelerin içerisine girerek hücreleri mavi renge boyarken, canlı hücreler bu boya ile boyanmazlar).
2. Neubauer lamının üzerinde yer alan her iki bölme de hazırlanan karışımdan 10'ar µL lamın yüzeyini kaplayacak şekilde pipetlenerek inverted mikroskop altında hücrelerin sayımı yapıldı.
3. Neubauer lamının dört köşesinde ve ortasında bulunan büyük karelerin içerisinde yer alan canlı hücreler sayıldı.
4. Toplam hücre sayısı 5'e bölünerek her bir karede bulunan ortalama canlı hücre sayısı hesaplandı.
5. Toplam hacim hücre süspansiyonun hacmine oranlanarak ($20/10=2$) dilüsyon katsayısı belirlendi ve son olarak aşağıdaki formül kullanılarak canlı hücre sayısı hesaplandı.

$$\text{Canlı hücre sayısı/mL} = \text{Ortalama canlı hücre sayısı} \times \text{Dilüsyon katsayısı} \times 10.000$$



Şekil 16. Neubauer lamının üzerinde yer alan kareler

Mikroplakalara hücrelerin ekilmesi

Flasklarda bulunan hücre süspansiyonu steril pipetler ile flasklardan çekilerek 15 mL'lik steril falkon tüplere alındı. Bu tüpler 2000 rpm'de 4 dakika santrüfjüldü ve süpernatant kısmı vakum pompası ile aspire edildi. Falkon tüpte pellet halde bulunan hücrelerin üzerine 1 mL DMEM besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı. Daha sonra hücre süspansiyonu pipet ile çekilerek 50 mL'lik steril falkon tüpe aktarıldı ve üzerine 19 mL DMEM besiyeri eklenerek vortekslendi. 96 kuyucuklu mikroplakaların her bir kuyucuğuna 1×10^4 hücre/mL yoğunluk olacak şekilde hücre ekimi yapıldı ve mikroplaka bir gece boyu 37°C'de, %95 nemli ve %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

Hücrelerin test bileşikleri ile muamelesi

Çalışma kapsamında MCF-7 meme kanseri hücre serileri üzerine uygulaması yapılan test bileşiği olan AKT inhibitörü-IV'ün 0,1, 1, 1,5, 2,5 ve 5 µM'lık konsantrasyonları ile tamoksifenin 5, 10, 25 ve 50 µM'lık konsantrasyonları hazırlandı ve mikroplakara 200 µL ekildi. Aynı miktarda çözücü (DMSO) ve kontrol grubu (DMEM besiyeri) hücrelerin ekimi yapılan mikroplaka kuyucuklarına Şekil 17'de gösterilen düzende eklendi. 24 saat %5 CO₂'li inkübatörde 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda uygulanan AKT inhibitörü-IV'ün ve tamoksifenin hücre canlılığına olan muhtemel etkileri 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi ile belirlendi.

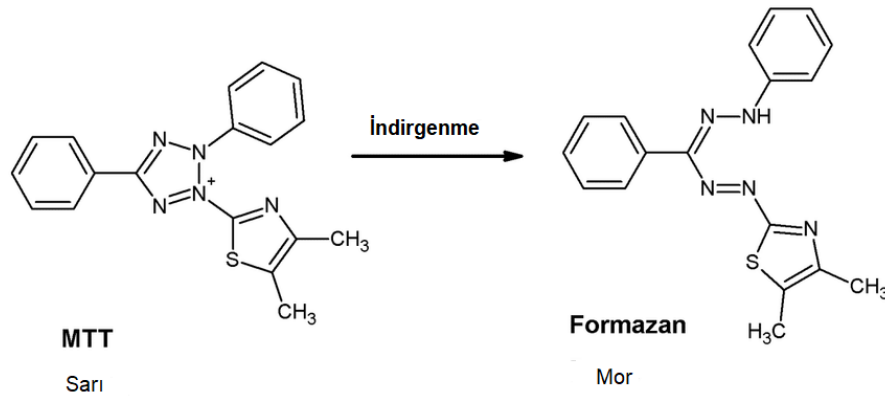
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	Kontrol	DMSO										
E												
F												
G												
H												

Şekil 17. 96'lık mikrolaka düzeni

Hücre Canlılığının ve *In Vitro* Sitotoksitenin Belirlenmesi

Test bileşiklerinin hücreler üzerine sitotoksik etkisi, sitotoksitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan ve bir enzimatik yöntem olan MTT yöntemi ile belirlendi.

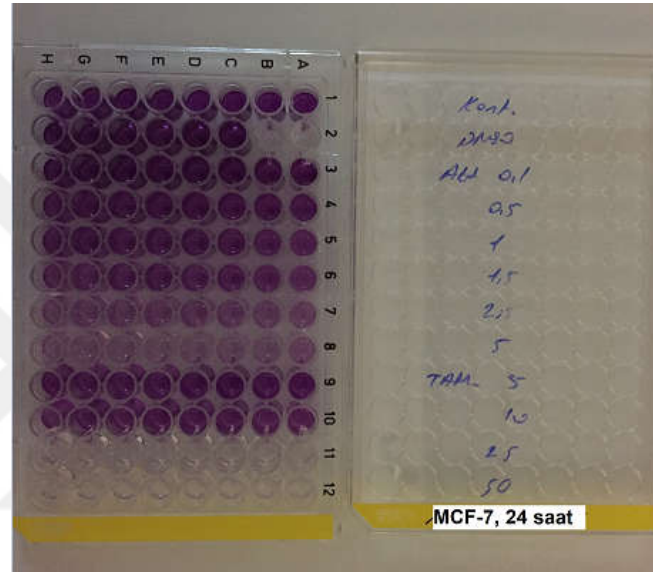
Bu yöntem MTT bileşiğinin tetrazolium halkasını parçalayabilmesi özelliğine dayanır. Bileşik (MTT) canlı hücrelere absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir (Denizot and Lang 1986; Horáková *et al.* 2001). Bu reaksiyon yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu hücrelerde gerçekleşir. Buda hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilir ve oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülerek yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir.



Şekil 18. MTT ve formazan ürünün kimyasal yapısı

İlk olarak MTT çözeltisi 0,5 mg/mL konsantrasyonda steril fosfat tamponu içerisinde hazırlandı. Test bileşikleri ile hücrelerin muamelesini takiben, mikrolakadaki her bir kuyucukta bulunan medyum aspire edildi ve her bir kuyucuğa hazırlanan MTT solüsyonundan 100 µL ilave edilerek 3 saat süreyle %5 CO₂'li inkübatörde 37°C sıcaklıkta inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki MTT solüsyonu aspire edildi ve her bir kuyucuğa 50 µL dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edildi. Kuyucuklarda bulunan hücrelerin optik dansisiteri (OD) ELISA mikroparka okuyucuda (Thermo MultiskanGo, ABD) 570 nm dalga boyunda ölçüldü (Mosmann 1983). Kontrol kuyucukları (sadece medyum bulunan kuyucuklar) okutularak, elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edildi. Tamoksifen ve AKT inhibitörü-IV uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri, kontrol absorbans değerine oranlandı ve yüzde canlılık değerleri hesaplandı (Tekin vd 2015; Koran vd 2017). Bu deneyler birbirinden bağımsız olarak, farklı günlerde en az 10 kez tekrarlandı.



Şekil 19. AKT inhibitörü-IV ve tamoksifen uygulanmış MCF-7 hücrelerine ait MTT uygulanmış 96'lık mikroparka düzeni

Etkin dozun (IC₅₀) belirlenmesi

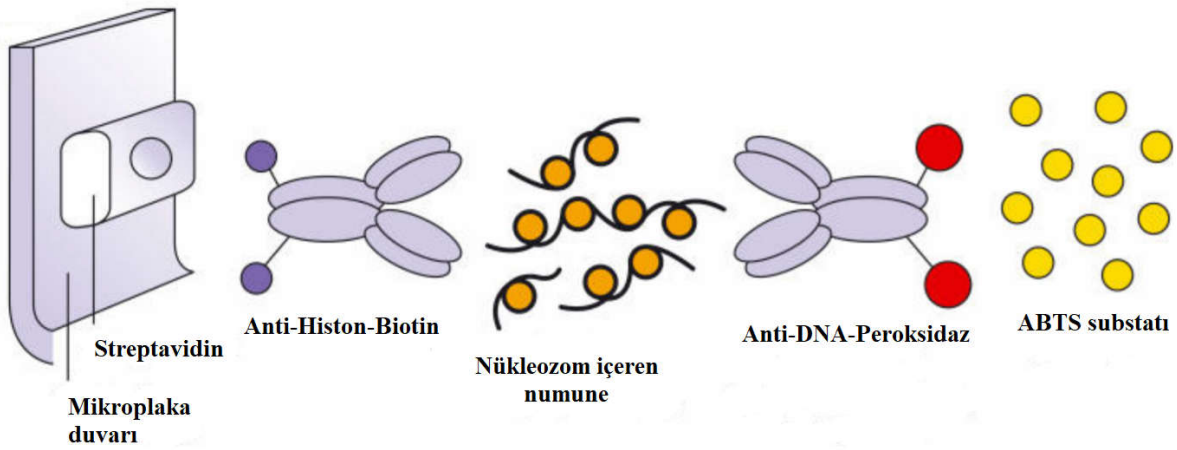
Yapılan MTT analizi verilerine göre AKT inhibitörü-IV'ün ve tamoksifenin yüksek düzeyde etkisinin hangi dozda gerçekleştiği belirlendi. Bileşiklerin uygulanan farklı konsantrasyonlarındaki etkileri Graphpad Prism 6 programı aracılığıyla değerlendirilerek test bileşiklerinin hücreler üzerine inhibe edici konsantrasyon 50 (IC₅₀) değerleri hesaplandı. Bu basamaktan sonra gerçekleştirilecek olan çalışmalarda hücrelere test bileşiklerinin belirlenen etkin dozlarının uygulamaları yapıldı.

Apoptozun Kolorimetrik Olarak Belirlenmesi (CDDE)

Yöntemin prensibi

CDDE (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}) kiti apoptozun *in vitro* olarak değerlendirilmesini sağlar. Yöntemin esası, hücre ölümü ile artan DNA fragmentasyonu sonucunda açığa çıkan sitoplazmik histonların belirlenmesine dayanır. Apoptoziste görülen

endonükleaz aktivitesi ile DNA'nın yapısında internüklozomal kırıklar meydana gelir. Bu kırıklar mono- ve oligo-nükleozomların oluşmasına yol açar. Kit içerisinde bulunan Anti-Histon-Biyotin antikoru histon proteinleri ile etkileşerek apoptoz esnasında oluşan, sitoplazmadaki kırık DNA fragmentlerine ve streptavidin ile kaplı olan plağa tutunur. Bu sayede mono- ve oligo-nükleozomlar plak yüzeyine tutunmuş olur. Anti-DNA-Peroksidaz antikoru ise streptavidin kaplı plağa bağlanır. Kit içerisindeki ABTS substratı vasıtasıyla Anti-DNA-Peroksidaz aktivitesi tesbit edilir. Böylece her bir örneğe ait mono- ve oligo-nükleozom miktarı kolorimetrik olarak belirlenebilir.



Şekil 20. Apoptozisin kolorimetrik olarak belirlenmesi (CDDE) prensibinin şematik gösterimi

Kit içeriği

- Anti-Histon-Biotin, 1 mL saf su ile sulandırıldı ve 10 dk vortekslendi.
- Anti-DNA-POD, 1 mL saf su ile sulandırıldı ve 10 dk vortekslendi.
- Coating solution'dan 1 mL alınıp üzerine 9 mL saf su eklendi ve karıştırıldı. Kullanımından hemen önce 1 mL Anti-Histon-Biotin antikoru ile 9 mL coating buffer karıştırıldı.
- Washing buffer 15-25°C arasında ısıtıldı ve 40 mL alınarak üzerine 360 mL saf su eklenerek karıştırıldı.
- Incubation buffer'dan 225 µL alındı ve 25 µL su ile seyreltildi.
- Conjugate solution için 1 mL Anti-DNA-POD ile 9 mL incubation buffer karıştırıldı Bu karışım kullanımından hemen önce hazırlandı.
- Test edilecek örnek sayısına göre 1, 2 veya 3 adet ABTS substrat tableti 5, 10 veya 15 mL substrat buffer içerisinde çözüldü ve kullanılmadan hemen önce sıcaklığı 15-25°C'ye gelecek şekilde ayarlandı. Bu çözelti substrat solution olarak kullanıldı.

Örneklerin hazırlanması

1. MCF-7 hücrelerinin DMEM medyumunu ile konsantrasyonu 1×10^5 hücre/mL olarak ayarlandı ve eppendorf tüplere $500 \mu\text{L}/\text{tüp} = 5 \times 10^4$ hücre/tüp olacak şekilde aktarıldı.
2. Uygulanacak maddelerinin (AKT inhibitörü-IV ve tamoksifen) etken dozları tüplere eklendi.
3. Tüplerin kapakları gaz geçirgenliğinin olması amacıyla gevşek bırakıldı ve 37°C , %5 CO_2 'li karbondioksit inkübatörde 4 saat inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrasında tüpler inkübatörden alınarak $200 \text{ g}'de$ 5 dk santrifüj edildi.
5. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 1 mL DMEM medyum eklendi.
6. Tüpler $1500 \text{ g}'de$ 5 dk santrifüj edildi.
7. Hücre peleti üzerine $500 \mu\text{L}$ incubation buffer ilave edilerek karışması sağlandı.
8. Hücrelerin lizis olması için $15-25^\circ\text{C}'de$, 30 dk inkübe edildi.
9. Hücre lizati $20000 \text{ g}'de$ 10 dk santrifüj edildi.
10. Santrifüj sonrası süpernatanttan $400 \mu\text{L}$ alındı. Hücrenin çekirdeği yüksek moleküler ağırlığa sahip unfragment DNA içerdiğinden, bu kısımda peletin çalkalanmamasına dikkat edildi.
11. Süpernatant 1:10 hacimde olacak şekilde incubation buffer ile seyreltildi (1×10^4 hücre ekivalenti/mL) (örnek solüsyonu).

CDDE protokolü

1. $100 \mu\text{L}$ coating solution 96 kuyucuklu mikrolakanın her bir kuyucuğuna pipetlendi ve mikrolaka yapışkan kaplayıcı sıkıca ile kapatıldı.
2. $15-25^\circ\text{C}'de$, 1 saat inkübe edildi.
3. İnkübasyonun ardından coating solution uzaklaştırıldı.
4. Her bir kuyucuğa $200 \mu\text{L}$ incubation buffer eklendi ve mikrolaka yapışkan kaplayıcı ile kapatıldı.
5. $15-25^\circ\text{C}'de$, 30 dk inkübe edildi.
6. İnkübasyonun ardından incubation buffer uzaklaştırıldı ve kuyucuklar $250-300 \mu\text{L}$ washing solution ile üç defa yıkandı. Ardından washing solution kuyucuklardan uzaklaştırıldı.
7. Her bir kuyucuğa $100 \mu\text{L}$ örnek eklendi. İki kuyucuğa kontrol amaçlı olarak örnek yerine $100'er \mu\text{L}$ incubation buffer eklendi ve mikrolaka yapışkan kaplayıcı ile sıkıca kapatıldı. Negatif kontrol olarak bir kuyucuğa madde uygulanmamış hücre içeren örnek solüsyonu eklendi.

8. 15-25°C'de, 90 dk inkübe edildi.
9. İnkübasyonun ardından karışım uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 250-300 µL washing solution ile üç defa yıkandı. Ardından washing solution kuyucuklardan uzaklaştırıldı.
10. Kör kuyucuklar dışındaki her bir kuyucuğa 100 µL conjugate solution eklendi ve mikrolaka yapışkan kaplayıcı ile sıkıca kapatıldı.
11. 15-25°C'de, 90 dk inkübe edildi.
12. İnkübasyonun ardından karışım uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 250-300 µL washing solution ile üç defa yıkandı. Ardından washing solution kuyucuklardan uzaklaştırıldı.
13. 100 µL substrat solution mikrolakanın her bir kuyucuğuna eklendi.
14. 250 rpm'de mikrolaka çalkalayıcı üzerinde renk değişimi fotometrik analiz için yeterli olana kadar (10-20 dk) inkübe edildi.
15. Mikrolaka kenarına özenli bir şekilde vurularak kuyucuklardaki içerik homojenize edildi. Substrat solution körüne karşı 405 ve 490 nm dalga boylarında absorbanslar okutuldu.
16. Deney birbirinden bağımsız olarak üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Her bir örneğe ve negatif kontrole ait ortalama absorbans değerleri belirlendi. Örneklerin ortalama absorbans değerleri sırayla negatif kontrolün ortalama absorbans değerine oranlanarak, her bir örnek için zenginleştirme faktörü hesaplandı.

$$\text{Zenginleştirme Faktörü} = (\text{Örnek})_{\text{abs}} / (\text{Kontrol})_{\text{abs}}$$

Apoptotik Gen Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

MCF-7 meme kanseri hücrelerine uygulanan AKT inhibitörü-IV ve tamoksifenin apoptotik gen ekspresyon seviyesine yaptığı etkinin gözlenmesi için kantitatif gen analizi yapıldı. Bu amaçla hedef dizilere spesifik primer setleri dizayn edildi. Nispi ekspresyon değişiminin değerlendirilebilmesi için housekeeping gen olarak bilinen β -actin referans olarak alındı. Ekspresyondaki değişim düzeyi C_T değerleri arasındaki karşılaştırma ile hesaplandı.

Hücre kültüründen total RNA izolasyonu

RNA later solüsyonunda saklanan hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı ve izole edilen RNA'ların kalitesi ve miktarı ölçüldü. Hemen ardından DNaz uygulaması yapılarak cDNA eldesi yapıldı.

Amacımıza yönelik olarak AKT inhibitörü-IV'ün etkin dozu, tamoksifenin etkin dozu ve kontrol grubu için ayrı ayrı hazırlanan 75 cm²'lik flasklar 24 saat süre boyunca 37°C'de, %95

nem ve %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda flasklardaki medyum aspire edildi. Flaskların tabanında bulunan hücreler kazınarak toplandı ve 15 mL'lik falkon tüplere alındı. Toplanan hücrelerin üzerine 10 mL soğuk PBS eklendi ve 3000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı aspire edilerek tekrar 10 mL soğuk PBS eklendi ve 3000 rpm'de santrifüj edilerek sıvı faz uzaklaştırıldı.

Elde edilen hücrelerden cDNA kütüphanesi hazırlamak için total RNA izolasyonu, kit (MG-RNA-01) yardımıyla HibriGen şirketinin önerdiği prosedüre göre gerçekleştirildi.

HibriGen şirketinin RNA izolasyon prosedürü basamakları şu şekildedir.

1. Hücrelerin üzerine lizis tamponu eklendi ve hücreler 15 saniye vorteks yapılarak parçalandı.
2. Nükleoprotein kompleksinin tamamen parçalanması için buz üzerinde 5 dakika inkübasyon yapıldı.
3. İnkübasyonu takiben 4°C'de 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant, yeni bir RNaz bulundurmeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Bu aşama protein, yağ ve polisakkaritlerden kurtulmayı sağladı.
4. Tüpe 200 µl kloroform eklendi, 15 saniye vorteks ile homojen hale gelene kadar karıştırıldı ve buz üzerinde 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyonun ardından 4°C'de 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve en üstteki renksiz faz yeni RNaz bulundurmeyen boş tüpe aktarıldı.
6. Alınan renksiz fazın hacmine göre üzerine ½ oranında önceden soğutulmuş %96'luk etanol eklendi ve karışım vortekslendi.
7. Karışım spin kolon tüpe aktarıldı. 4°C'de 12000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi ve altta kalan sıvı kısım atıldı.
8. 500 µl yıkama tamponu RPI eklendi ve 4°C'de 12000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilerek altta kalan sıvı kısım atıldı.
9. 500 µl yıkama tamponu RW eklendi, 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 4°C'de 12000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilerek altta kalan sıvı kısım atıldı. Bu basamak bir kere daha tekrarlandı.
10. Spin kolon tüp 12000 rpm'de 2 dakika kuruması için santrifüj edildi.
11. Spin kolon 1,5 ml'lik yeni mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi.
12. Direk olarak spin kolon membranının üzerine 25 µl DEPC su eklendi ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
13. 12000 rpm'de 2 dakika toplama için santrifüj edildi.

14. Saflaştırılmış olan RNA kısa süreli saklama için -20°C’de, uzun süreli saklama -86°C’de saklandı.

cDNA kütüphanelerinin hazırlanmasında Bio-Rad şirketinden satın alınan iScript™ cDNA sentez kiti kullanıldı ve cDNA sentezi şirket tarafından önerilen protokole göre aşağıdaki şekilde yapıldı.

Sırasıyla bir mikrosantrifüj tüpüne;

- 8-9 µL dH₂O,
- 1 µL DNaz I,
- 1 µL 10X Buffer,
- 1 µg RNA örneği eklendi,

37°C’de 30 dakika bekletildikten sonra üzerine aşağıda belirtilen miktarlarda hazırlanan mix eklendi.

- Nuclease-free water 5 µL
- iScript Revers Transcriptase 1 µL
- 5X iScript Reaction Mix 4 µL

Toplam reaksiyon hacmi 20’şer µL olan tüpler termal cycler cihazına (T100 Thermal Cyclers for PCR, Bio-Rad) yerleştirilerek aşağıdaki tabloda verilen program uygulandı. Program bitiminde cDNA içeren tüpler kullanılmak üzere -20°C’ye kaldırıldı.

Tablo 7. cDNA Sentezi İçin Termal Cycler Cihazı Programı

Sıcaklık/Süre	1. Döngü	2. Döngü	3. Döngü	4.Döngü
Sıcaklık (°C)	95	46	95	4
Süre (dk)	5	20	1	∞

Primer dizaynı

Primer tasarımında NCBI web sitesinden (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) insana (*Homo sapiens*) özgü BCL-2, BAX, AKT, Kaspaz-3 ve β-actin genlerine ait mRNA dizilerinden yararlanıldı. Seçilen prim erler özgül olmayan bağlanmayı engelleyecek şekilde seçildi. Belirtilen genlere ait tasarlanan forward ve reverse primer dizilimleri aşağıda yer almaktadır.

Tablo 8. Çalışmalarda Ekspresyon Düzeyi Araştırılan Genlere Ait Primer Bilgileri

Primer	Sekans (5' - 3')	Uzunluk (bp)
β -actin İleri	CACCCCAGCCATGTACGTTGC	21
β -actin Geri	CCGGAGTCCATCACGATGCCA	21
BAX İleri	CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG	21
BAX Geri	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT	21
BCL-2 İleri	GAGGGGCTACGAGTGGGATGC	21
BCL-2 Geri	GGAGGAGAAGATGCCCGGTGC	21
AKT İleri	CACACCACCTGACCAAGATG	20
AKT Geri	CTGGCCGAGTAGGAGAACTG	20
Kaspaz-3 İleri	GCGAATCAATGGACTCTGGAA	21
Kaspaz-3 Geri	GTCAACAGGTCCATTTGTTCC	21

Real-Time PCR

Çalışma kapsamında cDNA'lar, Maxima SYBR Green qPCR Master karışımı ve BCL-2, BAX, AKT, Kaspaz-3 ve β -actin genlerine özgü primerler kullanılarak Real-Time PCR tekniği ile Tablo 9'da verilen parametreler uygulanarak çoğaltıldı. Real-Time PCR reaksiyonları hazırlanırken, standart eğrilerin çizilebilmesi amacıyla kontrol grubundan elde edilen cDNA örneğinden elde edilen ölçümlerle β -aktin arasındaki ölçümlerin değerlendirilmesi aşamasında analiz programı ile standart eğriler çizildi. Deneysel tüm cDNA örnekleri ve standart örnekler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde deneysel hataları ve farkları azaltmak amacıyla üçer örnek olarak analiz edildi. Seçilen zaman noktalarında eksprese olan BCL-2, BAX, AKT, Kaspaz-3 ve β -actin gen ekspresyon miktarları ile hücrelerden elde edilen cDNA ile gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubu arasındaki ilişki incelendi.

Tablo 9. Ekspresyon Düzeyi Araştırılacak Genlere Ait Amplifikasyonu İçin PCR Reaksiyon Karışımı

PCR Bileşeni	Kullanılan Miktar (μ L)	Son Konsantrasyon
SybrGreen 2X	10,0	1X
Primer R	0,8	400 nM
Primer F	0,8	400 nM
cDNA	5,0	-
dH ₂ O	3,4	-
Toplam Hacim	20 μl	

Tablo 10. Real-Time PCR İşlemi Parametreleri

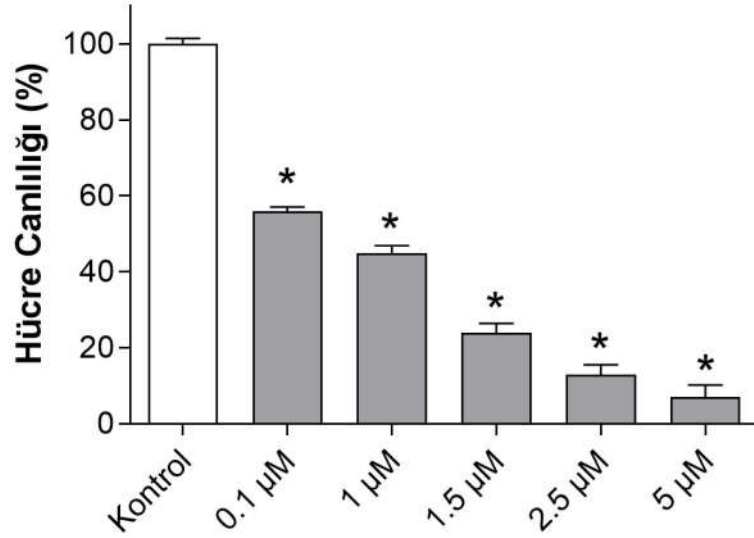
Basamaklar	Sıcaklık-Süre-Döngü
Ön Denatürasyon	95°C-2 dk-1
Denatürasyon	95°C-5 sn
Bağlanma	66°C-45 sn
Uzama	74°C-2 dk
Son Uzama	74°C-5 dk-1
Bekleme	+4°C-∞-1



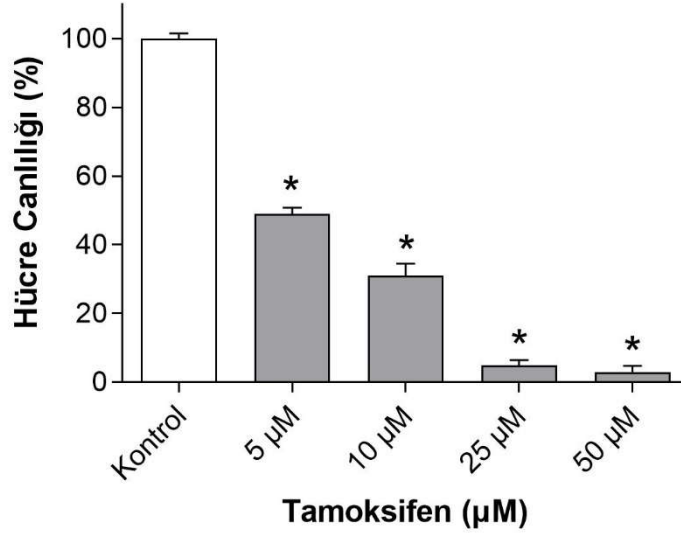
ARAŞTIRMA BULGULARI

MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Çalışmamızda, insan MCF-7 meme kanseri hücrelerine 0,1, 1, 1,5, 2,5 ve 5 μM 'lık AKT inhibitörü-IV ve tamoksifenin 5, 10, 25 ve 50 μM 'lık konsantrasyonları 24 saat süreyle ayrı ayrı uygulandı. 24 saat sonunda MTT testi ile bileşiklerin % canlılık değerleri belirlendi. Hücre canlılığının, uygulanan tedavilerde hücre canlılığın azaldığı belirlendi. Bu azalışın AKT inhibitörü-IV ve tamoksifen uygulanan hücre gruplarının her ikisinde de doza bağımlı olduğu görüldü.



Şekil 21. AKT inhibitörü IV'ün MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine uygulanan farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi



Şekil 22. Tamoksifenin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine uygulanan farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi

IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

AKT inhibitörü-IV ve tamoksifen için hücre çoğalmasında %50 azalmaya neden olan konsantrasyonlarının yani IC₅₀ dozlarının sayısal değeri belirlendi. MTT analizi verilerine göre elde edilen konsantrasyona bağlı % canlılık değerleri kullanılarak uygulanan maddelerin IC₅₀ değerleri hesaplandı (Tablo 11).

Tamoksifen için IC₅₀ değeri 5,2±0.13 µM olarak hesaplandı. AKT inhibitörü-IV için ise IC₅₀ değeri 1,1±0.29 µM olarak bulundu.

Çalışmanın bundan sonraki basamakları için, AKT inhibitörü-IV ve tamoksifen bileşiklerinin IC₅₀ değerlerine karşılık gelen dozları kullanıldı.

Tablo 11. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerine Uygulanan Maddelerin IC₅₀ Değerleri (Ortalama değerler ± standart sapma)

Örnek	IC ₅₀ (µM)
AKT inhibitörü-IV	1,1±0,29
Tamoksifen	5,2±0,13

RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

MCF-7 meme kanseri hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan AKT inhibitörü-IV'ün 1,1 µM'lık, tamoksifenin 5,2 µM'lık konsantrasyonları ile kontrol grubundan izole edilen RNA'ların konsantrasyonları Tablo 12'de verildi.

Tablo 12. Kontrol Grubu, AKT İnhibitörü-IV ve Tamoksifen Uygulanan MCF-7 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların Safılık Dereceleri ve Konsantrasyonları

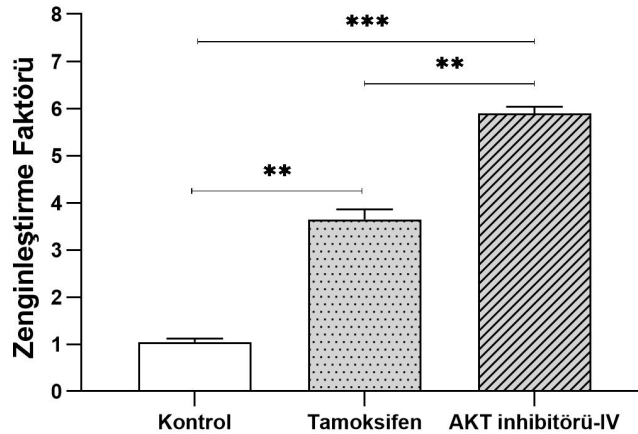
Örnek	RNA Safılık (A260/A280)	RNA Konsantrasyon (ng/μL)
Kontrol	1,9	1620,92
AKT inhibitörü-IV	1,9	1530,54
Tamoksifen	2,1	1231,91

Apoptozisin Kolorimetrik Değerlendirmesine Ait Bulgular

Apoptozisin kolorimetrik olarak değerlendirilmesinde, apoptozis meydana gelen hücrelerin DNA'larının yapılarında internükleozomal kırıklar oluşur ve bu kırıklar sonucunda oluşan mono ve oligonükleozom oranındaki artış zenginleştirme faktörü olarak belirtilir. Zenginleştirme faktörü kontrol grubu için 1,0 olarak kabul edildi ve MCF-7 hücreleri üzerine uygulanan bileşiklerin hücrelerdeki apoptoz artışı belirlendi.

1,1 μM AKT inhibitörü-IV ve 5,2 tamoksifen ile 24 saatlik bir tedavi uygulanan MCF-7 hücrelerinde sırasıyla zenginleştirme faktörü 5,9 ve 3,6 olarak hesaplandı. Bu değerler AKT inhibitörü-IV ve tamoksifen ile muamele edilen MCF-7 hücrelerindeki mono ve oligonükleozom miktarının kontrol grubuna göre oranını ifade etmektedir.

Bu durumda, AKT inhibitörü-IV uygulanan MCF-7 hücrelerinin kontrole kıyasla apoptozun 5,9 kat, tamoksifen uygulanan MCF-7 hücrelerinin ise 3,6 kat tetiklendiği, tamoksifen uygulanan hücelere kıyasla AKT inhibitörü-IV uygulanan hücrelerde apoptozun 1,6 kat arttığı ifade edilebilir. Gruplar arasında meydana gelen apoptoz artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$, $p<0,0001$) (Şekil 23).



Şekil 23. Tamoksifen ve AKT inhibitörü-IV'ün MCF-7 meme kanser hücrelerindeki apoptotik etkisi ($p<0,001$ ** , $p<0,0001$ ***)

Gen Ekspresyonlarına Ait Bulgular

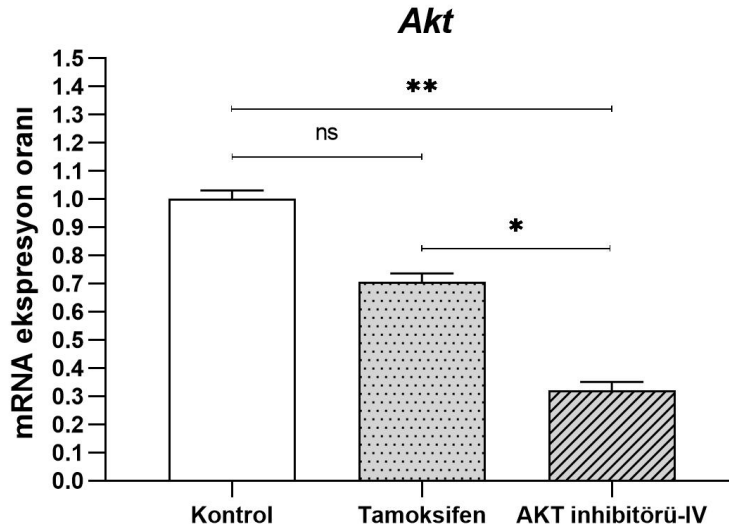
MCF-7 meme kanseri hücrelerine uygulanan AKT inhibitörü-IV'ün ve tamoksifenin AKT, BCL-2, BAX, Kaspaz-3 genlerine ait mRNA ekspresyon düzeyi belirlendi. Genlere ait mRNA ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile hesaplandı (Livak and Schmittgen 2001). Sonuçlar β -aktin referans genine ait mRNA ekspresyon düzeyi kullanılarak normalize edildi.

AKT, BAX, BCL-2, Kaspaz-3 genlerine ait mRNA ekspresyon oranları belirlendi. Tüm genlere ait mRNA ekspresyon seviyeleri kontrol grubu için 1,0 olarak değerlendirildi ve sonuçlar kontrol grubuna göre kat ifade eden değerler olarak verildi.

AKT, BCL-2, BAX ve Kaspaz-3 genlerine ait mRNA ekspresyonlarının kontrol gruplarına göre artış ve azalış oranları Tablo 13'te verildi.

Tablo 13. AKT, BCL-2, BAX ve Kaspaz-3 Genlerine Ait mRNA Ekspresyonu Oranları (Ortalama değerler \pm standart sapma)

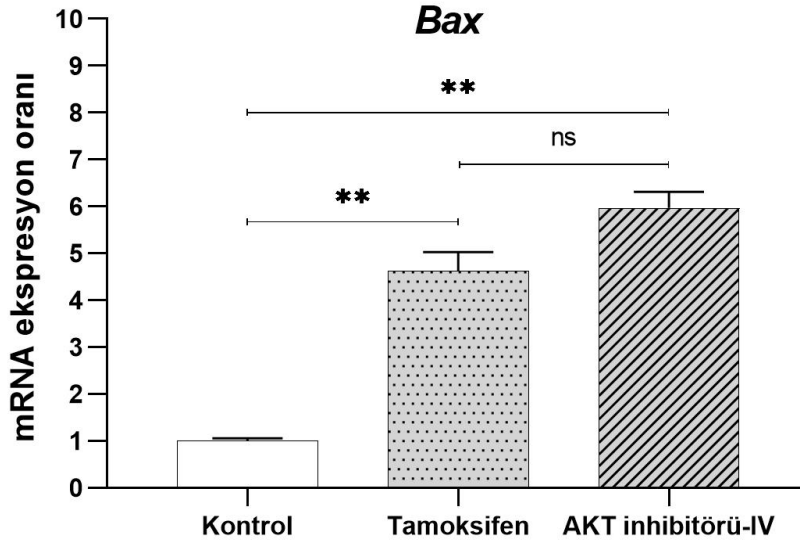
Örnek	AKT	BCL-2	BAX	Kaspaz-3
Kontrol	1,00 \pm 0,03	1,00 \pm 0,06	1,00 \pm 0,06	1,00 \pm 0,03
AKT inhibitörü-IV	0,32 \pm 0,03	0,55 \pm 0,03	5,97 \pm 0,34	6,43 \pm 0,08
Tamoksifen	0,706 \pm 0,03	0,66 \pm 0,02	4,63 \pm 0,4	5,42 \pm 0,04



Şekil 24. AKT geninin β -actin'e bağlı ait ekspresyon seviyeleri ($p > 0,05 = ns$, $p < 0,01 = *$, $p < 0,001 = **$)

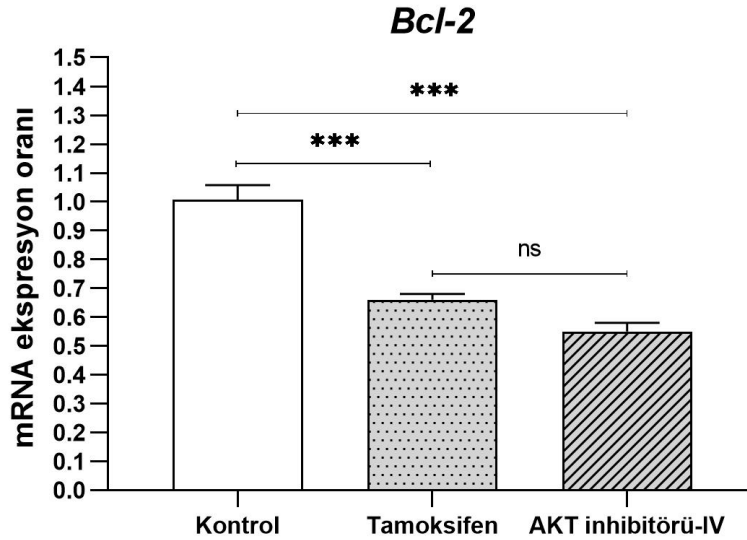
AKT mRNA seviyelerinde, kontrol grubuna göre kıyasla AKT inhibitörü-IV uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış belirlenirken ($p < 0,001$), tamoksifen uygulamasındaki azalışta istatistiksel olarak anlam tespit edilemedi ($p > 0,05$). Tamoksifen

uygulama grubuna göre AKT inhibitörü-IV uygulama grubunda ise AKT mRNA seviyesindeki azalış, istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,01$).



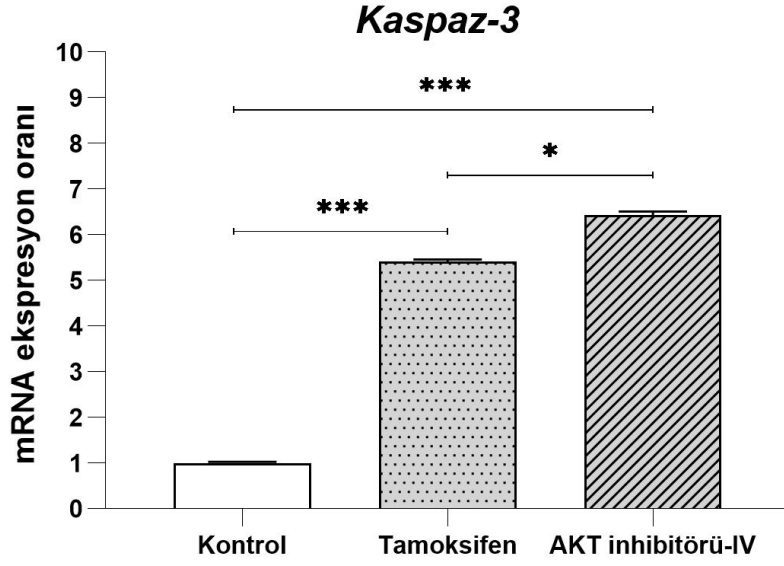
Şekil 25. BAX geninin β -actin'e bağlı ait ekspresyon seviyeleri ($p>0,05=ns$, $p<0,001=**$)

BAX mRNA seviyelerinde, kontrol grubuna göre kıyasla tamoksifen ve AKT inhibitörü-IV uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi ($p<0,001$). Tamoksifen uygulama grubuna göre AKT inhibitörü-IV uygulama grubunda ise AKT mRNA seviyesindeki artışta, istatistiksel olarak anlam tesbit edilmedi ($p>0,05$).



Şekil 26. BCL-2 geninin β -actin'e bağlı ait ekspresyon seviyeleri ($p>0,05=ns$, $p<0,0001=***$)

BCL-2 mRNA seviyelerinde, kontrol grubuna göre kıyasla tamoksifen ve AKT inhibitörü-IV uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış belirlendi ($p<0,0001$). Tamoksifen uygulama grubuna göre AKT inhibitörü-IV uygulama grubunda BCL-2 mRNA seviyesindeki azalışında, istatistiksel olarak anlam tesbit edilemedi ($p>0,05$).



Şekil 27. Kaspaz-3 geninin β -actin'e bağlı ait ekspresyon seviyeleri ($p < 0,01 = *$, $p < 0,0001 = ***$)

Kaspaz-3 mRNA seviyelerinde, kontrol grubuna göre kıyasla tamoksifen ve AKT inhibitörü-IV uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi ($p < 0,01$, $p < 0,0001$). Tamoksifen uygulama grubuna göre AKT inhibitörü-IV uygulama grubunda Kaspaz-3 mRNA seviyesindeki artışında, istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,01$).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme ve yumurtalık kanserleri kadınlarda en sık görülen iki malignitedir; meme kanseri kadınlarda kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada bulunmaktadır (DeSantis *et al.* 2011, Stewart *et al.* 2017). Hormonal tedavi ve kemoterapi meme kanseri tedavisinde etkili olmasına rağmen, bazı tümörlerin standart tedavilere içsel veya edinilmiş direnci vardır (Monk *et al.* 2009, Fan *et al.* 2015). Kapsamlı araştırmalar, terapötik direncin altında yatan epigenetik, genomik değişim ve DNA onarımı gibi birçok potansiyel hücrenel süreci ortaya çıkarmıştır (Osborne and Schiff 2011; van Zyl *et al.* 2018).

Meme kanseri hastalarının genel sağkalım oranı son on yılda önemli ölçüde artış göstermektedir, bu durum tümörün erken tesbit edilmesinden kaynaklanmaktadır. Ne yazık ki, hâlihazırda mevcut olan tedavi yöntemleriyle ilerlemiş meme kanserinin iyileşme oranı hala kabul edilemez derecede düşüktür. Umut verici tedavilerden birisi de, tümör hücrelerinin ölümünü indükleyebilen kemoterapötik ajanların ve bunların kombinasyonlarının uygulanmasıdır (Faivre *et al.* 2006). Bu tür terapilerin genel hasta sağkalımını iyileştirdiği gösterilmiş olmasına rağmen, bunlar genellikle tedaviye bağlı toksisite ve kullanılan ilaçlara karşı çapraz direnç geliştirme potansiyeli ile ilişkilidir (Abrams *et al.* 1994). Bu nedenle, normal hücreler üzerinde minimum yan etkilerle tümör hücrelerini etkili bir şekilde öldüren bileşiklerin keşfi ve geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Östrojen reseptörü pozitif meme kanseri kemoterapisinde yaygın olarak kullanılan tamoksifen, hücre proliferasyonunu inhibe eder ve östrojen reseptörüne bağlı gen ekspresyon modülasyonu ile meme kanseri hücrelerinin apoptozunu indükler. Tamoksifenin hücre ölümünün uyarılmasındaki etkilerine örnek olarak, apoptozda yer alan BCL-2 protein ailesinin üyelerinin ekspresyonunun transkripsiyonel düzenlenmesi verilebilir (Kallio *et al.* 2005).

Hedeflenen kanser tedavileri, spesifik moleküler hedeflere müdahale ederek tümörün büyümesini, ilerlemesini ve metastazını inhibe etmek için kullanılır ve şu anda antikanser ilaç geliştirmenin odak noktasıdır. AKT, hücre sağkalımı ve çoğalmasında anahtar bir faktör olarak işlev görür ve akciğer, meme, yumurtalık, mide ve pankreas karsinomları dâhil olmak üzere çeşitli insan kanserlerinde mutasyonla aşırı eksprese edilir. Çok sayıda çalışma, AKT'nin hücrenel proliferasyonun bir aracı olarak ve ilaç geliştirmede etkili bir hedef olarak önemini göstermiştir. Bununla birlikte, doğrudan AKT ve AKT sinyal yolunun diğer ana bileşenlerini

hedef olarak ortaya çıkan terapötiklerin araştırılması kanser tedavisi için önemlidir ve gereklidir (Urak *et al.* 2017).

Literatürde çok çeşitli AKT inhibitörleri mevcut olup bu inhibitörlerin sitotoksik etkilerine ait çalışmalar bulunmasına rağmen, AKT inhibitörü-IV hakkında yapılmış yeteri kadar çalışma bulunmamaktadır. Meme kanseri tedavisine katkıda bulunabilecek bir potansiyele sahip AKT inhibitörü-IV'ün insan meme kanser hücre hattında *in vitro* etkinliğinin belirlenmesi ve apoptotik etkilerinin aydınlatılması, yapılabilecek ileri çalışmalar ile klinikte kullanımı için önemli sonuçlar doğurabilecektir. Bu amaçla yapılan bu çalışmada AKT inhibitörü-IV'ün insan meme kanseri hücreleri (MCF-7) üzerindeki sitotoksik etkisi ile apoptoz üzerindeki rolünü meme kanseri tedavisinde kullanılan ilaçlardan olan tamoksifen ile kıyaslayarak ortaya koymaya çalıştık.

AKT inhibitörü-IV'ün, K562 ve U937 insan lösemi hücreleri üzerine uygulanan 0, 0,5, 1, 5, 10, 25 μM 'lık dozlarının *in vitro* hücre canlılığını doza bağlı olarak azalttığı belirtilmektedir. Ayrıca, *Embelia ribes* bitkisinden izole edilen bir kinon türeviden olan Embelin ile AKT inhibitörü-IV'ün K562 ve U937 hücrelerinde sinerjik etki göstererek hücre canlılığını AKT inhibitörü-IV'e kıyasla daha fazla azaltmaktadır (Prabhu *et al.* 2017).

Allosterik AKT inhibitörü MK-2206 ve Glut1 inhibitörü WZB117 kombinasyonunun, hem ER (+) MCF-7 hem de üçlü negatif MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde AKT inhibisyonu ve ROS indüksiyonu yoluyla sinerjik bir sitotoksik etki gösterdiğini, bu durumda DNA hasarına neden olabileceğini ayrıca bu kombinasyonunu nihayetinde meme kanseri hücrelerinde apoptozise yol açabileceğini bildirmişlerdir (Li *et al.* 2019).

Faz-I klinik denemelerinde kullanılan AZD5363'ün meme ve prostat kanseri hücre hatlarında PRAS40, GSK-3 β ve downstream markörü P70S6K dâhil olmak üzere bir dizi AKT substratının fosforilasyonunun inhibisyonuna yol açmaktadır. AZD5363'ün, meme ve prostat hücre hatlarında bir anti-proliferatif ve bazı durumlarda sitotoksikite ile sonuçlanan bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir (Greenwood *et al.* 2011).

Su *et al.* (2012) Yaptıkları çalışmada, MCF-7 meme kanseri hücrelerine 48 saat boyunca bir AKT inhibitörü olan perifosin uygulaması sonucu, perifosinin PI3K/AKT sinyali üzerindeki moleküler etkisini AKT, mTOR ve HIF-1 α 'nın inhibisyonunu ile belirtmişlerdir (Su *et al.* 2012).

Çalışmamızda ilk olarak, AKT inhibitörü-IV'ün ve tamoksifenin MCF-7 hücrelerinde sitotoksik etkisini belirledik. Buna göre; AKT inhibitörü-IV için ise IC₅₀ değeri 1,1 μM olarak hesaplanırken, tamoksifen için IC₅₀ değeri 5,2 μM olarak hesaplandı. Bu durumda, AKT

inhibitörü-IV'ün, tamoksifene göre daha düşük dozda MCF-7 hücreleri üzerinde göstermiş olduğu sitotoksik etki ile daha güçlü bir sitotoksik ajan olduğu söylenebilir.

Çalışma kapsamında tamoksifen ve AKT inhibitörü-IV uygulanan tedaviler apoptoz oranını önemli oranda artırmıştır. Apoptoz sırasında oluşan mono ve oligonükleozomların kolorimetrik değerlendirmesi sonucunda, AKT inhibitörü-IV ve tamoksifen tedavilerinde apoptozda kontrole göre önemli artışlar görüldü. Apoptozun AKT inhibitörü-IV uygulanan grupta kontrole göre 5,9 kat, tamoksifen uygulamasında ise 3,6 kat arttığı belirlendi. Böylece, MCF-7 hücrelerinde AKT inhibitörü-IV'ün, tamoksifene kıyasla apoptoz üzerinde daha güçlü etkiye sahip olduğu söylenebilir.

AKT mRNA seviyelerinde, kontrol grubuna kıyasla tamoksifen ve AKT inhibitörü-IV uygulamasında önemli bir azalış belirlendi. AKT mRNA seviyesinde, kontrole göre AKT inhibitörü-IV uygulamasında 3,12 kat, tamoksifen uygulamasında ise 1,41 kat azalış görülürken, AKT inhibitörü-IV uygulamasında bağlı AKT mRNA seviyesinin ise tamoksifen uygulamasına kıyasla 2,21 kat azaldığı görüldü.

BAX mRNA seviyelerinde, kontrole göre AKT inhibitörü-IV ve tamoksifen uygulamasında anlamlı bir artış görüldü. BAX mRNA seviyesi, kontrole göre AKT inhibitörü-IV uygulamasında 5,97 kat, tamoksifen uygulamasında ise 4,63 kat arttı. AKT inhibitörü-IV uygulamasına bağlı BAX mRNA seviyesinde ise tamoksifen uygulamasına kıyasla 1,28 kat artış belirlendi.

BCL-2 mRNA seviyelerinde, kontrole göre AKT inhibitörü-IV ve tamoksifen uygulamasında anlamlı bir azalış tesbit edildi. BCL-2 mRNA seviyesinde, kontrole kıyasla AKT inhibitörü-IV uygulamasında 1,81 kat, tamoksifen uygulamasında ise 1,51 kat azalış görülürken, AKT inhibitörü-IV uygulamasına bağlı BAX mRNA seviyesinde ise tamoksifen uygulamasına kıyasla 1,2 kat azalış belirlendi.

Kaspaz-3 mRNA seviyelerinde, kontrol grubuna kıyasla AKT inhibitörü-IV ve tamoksifen uygulamasında anlamlı bir artış belirlendi. Kaspaz-3 mRNA seviyesinde, kontrole kıyasla AKT inhibitörü-IV uygulamasında 6,43 kat, tamoksifen uygulamasında ise 5,42 kat artış görülürken, AKT inhibitörü-IV uygulamasına bağlı Kaspaz-3 mRNA seviyesinde, tamoksifen uygulamasına kıyasla 1,18 kat artış görüldü.

Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, AKT fosforilasyonunu/aktivasyonunu inhibe eden hücre geçirgen bir benzimidazol bileşiği olan AKT inhibitörü-IV'ün, meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoksifene göre MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerine daha güçlü bir sitotoksik etki gösterdiği, yine tamoksifene kıyasla daha güçlü apoptotik etkiye sahip

olduğu ve tamoksifen ile kontrol grubuna göre apoptotik yollarda görev alan BCL-2 ve AKT genlerinin ifadesini nispeten daha azaltarak, BAX ve Kaspaz-3 gen ifadesini nispeten daha fazla artırarak hücreleri apoptoza yönlendirdiği söylenbilir. Bu alışma ile elde edilen sonuçların yapılacak daha ileri çalışmalar (*in vivo* ve klinik çalışmalar) için bir basamak teşkil edeceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abdulrahman, G.O. and Rahman, G.A., 2012. Epidemiology of breast cancer in Europe and Africa. *Journal of Cancer Epidemiology*, 2012, 1-5.
- Abrams, J.S., Moore, T.D., Friedman, M., 1994. New chemotherapeutic agents for breast cancer. *Cancer*, 74 (3), 1164-1176.
- Alam, G. And Jones, B.C., 2014. Toxicogenetics: in search of host susceptibility to environmental toxicants. *Frontiers in Genetics*, 5, 1-5.
- Albain, K.S., Unger, J.M., Crowley, J.J., Coltman, C.A., Hershman, D.L., 2009. Racial disparities in cancer survival among randomized clinical trials patients of the Southwest Oncology Group. *Journal of the National Cancer Institute*, 101 (14), 984–992.
- Alberti, K.G., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.C., James, W.P., Loria, C.M., Smith, S.C., 2009. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; american heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. *Circulation*, 120 (16), 1640–1645.
- Allen, N.E., Beral, V., Casabonne, D., Kan, S. W., Reeves, G.K., Brown, A., Green, J., 2009. Moderate alcohol intake and cancer incidence in women. *Journal of the National Cancer Institute*, 101 (5), 296-305.
- Anonymus, 2010. What is cancer? *Thyroid Cancer Survivor*, <https://thyroidcancersurvivor.wordpress.com/2010/10/13/what-is-cancer/> (04.03.2021).
- Anonymus, 2012. The history of cancer. Institut Jules Bordet, www.bordet.be/en/presentation/history/cancer_e/cancer1.html (19.12.2020).
- Anonymus, 2017. Breast tissue anatomy & physiology. Jackie Bell Natural Health, <https://www.jackiebellnaturalhealth.com/breast-tissue.html> (01.02.2021).
- Anonymus, 2018. Stages of breast cancer. Diary Store, <https://www.diarystore.com/health-and-beauty/diseases/316/stages-breast-cancer-breast-cancer-subtypetreatment> (04.04.2021).
- Anonymus, 2021. Stages of breast cancer. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq> (18.04.2021).
- Arslan, E., Özçelik, F., Demirbaş, Ş., 2013. Obezite ile ilişkili kanser türleri. *Anatolian Journal of Clinical Investigation*, 7(3), 176-184.
- Arteaga, C.L. and Osborne, C.K., 1991. Growth factors as mediators of estrogen/antiestrogen action in human breast cancer cells. *Regulatory Mechanisms in Breast Cancer: Advances in Cellular and Molecular Biology of Breast Cancer*. Ed: Lippman, M.E. and Dickson, R.B. Kluwer Academic, Boston, 289-304.
- Baguley, B.C. and Leung, E., 2011. Heterogeneity of phenotype in breast cancer cell lines. *Breast Cancer - Carcinogenesis, Cell Growth And Signalling Pathways*. Ed: Gunduz, M. Intech Open, Rijeka, 245-256.
- Bai, L. and Zhu, W.G., 2006. p53: structure, function and therapeutic applications. *Journal of Molecular Cancer*, 2 (4), 141-153.

- Barabutis, N., Tsellou, E., Schally, A.V., Kouloheri, S., Kalofoutis, A., Kiaris, H., 2007. Stimulation of proliferation of MCF-7 breast cancer cells by a transfected splice variant of growth hormonereleasing hormone receptor. *PNAS*, 104, 5575–5579.
- Başoğlu, M., 2010. Memenin anatomisi, embriyolojisi, histoloji ve fizyolojisi. *Türkiye Klinikleri Radiology - Special Topics*, 3 (3), 1-7.
- Bayrak, Ö.F., 2010. İnsan kordomalarında ekspresyon farkı olan mikrona'ların ve ilgili transkriptlerin incelenmesi ve bunların kordomaların patogeneziindeki öneminin belirlenmesi. *Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya*.
- Berretta, R. and Moscato, P., 2010. Cancer biomarker discovery: the entropic hallmark. *Plos One*, 5 (8), 12262.
- Bozkurt, A., 2005. Toksikokinetik ve Toksikogenomik. *Disiplinlerarası Toksikoloji Kongresi, Ankara*.
- Brandsma, L.L., 2005. Physician and patient attitudes toward obesity. *Journal of Eating Disorders*, 13, 201–211.
- Brasseur, K., Nicolas, G., Eric, A., 2017. Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers. *Oncotarget*, 8 (3), 4008.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A Cancer Journal for Clinicians*, 68 (6), 394-424.
- Brown, J.S., Banerji, U., 2017. Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments. *Pharmacology and Therapeutics*, 172, 101-115.
- Burdall, S., Hanby, A., Lansdown, M.R., Speirs, V., 2003. Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Research*, 5, 89-95.
- Byrd, T.L., Wilson, K.M., Smith J.L., Heckert, A., Orians, C.E., Vernon, S.W., Fernandez-Esquer, M.E., Fernandez, M.E., 2012. Using intervention mapping as a participatory strategy: development of a cervical cancer screening intervention for Hispanic women. *Health Education & Behavior*, 39, 603–611.
- Campbell, R.A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N.M., Constantinidou, D., Ali, S., Nakshatri, H., 2001. Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor α A new model for anti-estrogen resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (13), 9817-9824.
- Chao, D.T. and Korsmeyer, S.J., 1998. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology*, 16, 395-419.
- Chautard, E., Loubeau, G., Tchirkov, A., Chassagne, J., Vermot-Desroches, C., Morel, L., Verrelle, P., 2010. Akt signaling pathway: a target for radiosensitizing human malignant glioma. *Neuro-oncology*, 12 (5), 434-443.
- Cheng, Y., Zhang, Y., Zhang, L., Ren, X., Huber-Keener, K.J., Liu, X., Zhou, L., Liao, J., Keihack, H., Yan, L., Rubin, E., Yang, J.M., 2012. MK-2206, a novel allosteric inhibitor of Akt, synergizes with gefitinib against malignant glioma via modulating both autophagy and apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11 (1), 154-164.
- Chia, S.K., Speers, C.H., D'yachkova, Y., Kang, A., Malfair-Taylor, S., Barnett, J., Coldman, A., Gelmon, K.A., O'reilly, S.E., Olivotto, I.A., The impact of new chemotherapeutic and hormonal agents on the survival of women with metastatic breast cancer. *Cancer*, 110 (5), 973-979.

- Chlebowski, R.T., Chen, Z., Anderson, G.L., Rohan, T., Aragaki, A., Lane, D., Dolan, N.C., Paskett, E.D., McTiernan, A., Hubbell, F.A., Adams-Campbell, L.L., Prentice, R., 2005. Ethnicity and breast cancer: factors influencing differences in incidence and outcome. *Journal of the National Cancer Institute*, 97 (6), 439–448.
- Chodosh, L.A., 1998. Ekspresyon of BRCA1 and BRCA2 in normal and neoplastic cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 3, 389-402.
- Christofori, G. and Semb, H., 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sciences*, 24 (2), 73-6.
- Colditz, G.A., Feskanich, D., Chen, W.Y., Hunter, D.J., Willett, W.C., 2003. Physical activity and risk of breast cancer in premenopausal women. *British Journal of Cancer*. 89 (5), 847-851.
- Cory, S. and Adams, J.M., 2002. The BCL-2 family: regulators of the cellular life or death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2 (9), 647-656.
- Coughlin, S.S., 2019. Epidemiology of breast cancer in women. *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance*. Ed: Ahmad, A. Springer, Switzerland, 9-29.
- Coughlin, S.S., Uhler, R.J., Richards, T., Wilson, K.M., 2003. Breast and cervical cancer screening practices among Hispanic and non-Hispanic women residing near the United States- Mexico border, 1999–2000. *Journal of Family & Community Health*, 26 (2),130–139.
- Crouthamel, M.C., Kahana, J.A., Korenchuk, S., Zhang, S.Y., Sundaresan, G., Eberwein, D.J., Kumar, R., 2009. Mechanism and management of AKT inhibitor-induced hyperglycemia. *Clinical Cancer Research*, 15 (1), 217-225.
- Çapanoğlu, G. ve Bakar, E., 2018. Meme kanseri ve meme kanseri metastazında rol oynayan moleküler prognostik faktörler. *Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3 (2), 40-44.
- Daniel, N.N. and Korsmeyer, S.J., 2004. Cell death: critical control points. *Cell*, 116 (2), 205-219.
- De Grujil, F.R., 1999. Skin cancer and solar UV radiation. *European Journal of Cancer*, 35 (14), 2003-2009.
- De Martel, C. and Franceschi, S., 2009. Infections and cancer: established associations and new hypotheses. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 70 (3), 183-194.
- De, P., Carlson, J.H., Leyland-Jones, B., Dey, N., 2016. PI3K-AKT-mTOR pathway cooperates with the dna damage repair pathway:carcinogenesis in triple-negative breast cancers and beyond. *PI3K-mTOR in cancer and cancer therapy*, Ed: Nandini, D., Pradip, De., Brian L.J. Humana Press, Cham, Switzerland, 65-108.
- Denizot, F. and Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89 (2), 271-277.
- DeSantis, C., Siegel, R., Bandi, P., Jemal, A., 2011. Breast cancer statistics, 2011. *A Cancer Journal for Clinicians*, 61 (6), 409-418.
- DeSantis, C.E., Fedewa, S.A., Goding Sauer, A., Kramer, J.L., Smith, R.A., Jemal, A., 2016. Breast cancer statistics, 2015: convergence of incidence rates between black and white women. *Cancer Journal for Clinicians*, 66 (1), 31–42.
- DeVita, V.T. and Chu, E., 2008. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research*, 68 (21), 8643-8653.

- Dewson, G. and Kluc, R.M., 2010. BCL-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton*, 2, 9-22.
- Done, S.J., 2011. Preface. *Breast Cancer-Recent Advances in Biology, Imaging and Therapeutics*. Ed: Burdall, S., Hanby, A., Lansdown, M.R., Speirs, V. Rijeka, Intech Open, Rijeka, 9.
- Duggan, C., Coronado, G., Martinez, J., Byrd, T.L., Carosso, E., Lopez, C., Benavides, M., Thompson, B., 2012. Cervical cancer screening and adherence to followup among Hispanic women study protocol: a randomized controlled trial to increase the uptake of cervical cancer screening in Hispanic women. *BMC Cancer*, 12 (1), 170.
- Ellis, P.A., Saccani-Jotti, G., Clarke, R., Johnston, S.R., Anderson, E., Howell, A., A'Hern, R., Salter, J., Detre, S., Nicholson, R., Robertson, J., Smith, I.E., Dowsett, M., 1997. Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *International Journal of Cancer*, 72, 608-613.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- El-Sabban, M.E., Abi-Mosleh, L.F., Talhouk, R.S., 2003. Developmental regulation of gap junctions and their role in mammary epithelial cell differentiation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 8, 463–473.
- Engelman, J.A., 2009. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature Reviews. Cancer*, 9 (8), 550–562.
- Engelman, J.A., Luo, J., Cantley, L.C., 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews. Genetics*, 7 (8), 606–619.
- Escribà-Agüir, V., Rodríguez-Go´mez, M., Ruiz-Pe´rez, I., 2016. Effectiveness of patient-targeted interventions to promote cancer screening among ethnic minorities: a systematic review. *Cancer Epidemiology*, 44, 22–39.
- Faivre, S., Djelloul, S., Raymond, E., 2006. New paradigms in anticancer therapy: targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors. In *Seminars in Oncology* 33 (4), 407-420.
- Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J., 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37 (11), 719-727.
- Fan, W.M., Chang, J.J., Fu, P.F., 2015. Endocrine therapy resistance in breast cancer: current status, possible mechanisms and overcoming strategies. *Future Medicinal Chemistry*, 7 (12), 1511-1519.
- Feng, Z., 2010. p53 regulation of the IGF-1/AKT/mTOR pathways and the endosomal compartment. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(2), a001057.
- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., Parkin, D.M., 2004. *Globocan 2002 v2.0, Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide IARC Cancer base No: 5*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F., McCormack, V.A., Boffetta, P., 2019. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: Globocon sources and methods. *International Journal of Cancer*, 144 (8), 1941-1953.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2013. *Globocan 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No: 11*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

- Fink, S.L. and Cookson, B.T., 2005 Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 73 (4), 1907-1916.
- Franco-Marina, F., Lo'pez-Carrillo, L., Keating, N.L., Arreola-Ornelas, H., Marie Knaul, F., 2015. Breast cancer age at diagnosis patterns in four Latin American populations: a comparison with North American countries. *Cancer Epidemiology*, 39 (6), 831–837.
- Freudlsperger, C., Burnett, J.R., Friedman, J.A., Kannabiran, V.R., Chen, Z., Van Waes, C., 2011. EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling in head and neck squamous cell carcinomas: attractive targets for molecular-oriented therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15 (1), 63–74.
- Fulda, S., 2015. Targeting extrinsic apoptosis in cancer: Challenges and opportunities. In *Seminars In Cell & Developmental Biology*, 39, 20-25.
- Fumarola, C., Bonelli, M.A., Petronini, P.G., Alfieri, R.R., 2014. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochemical Pharmacology*, 90 (3), 197-207.
- Futreal, P.A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J.C., Wooster, R., Stratton, M., 2001. Cancer and genomics. *Nature*, 6822, 850-852.
- Gao, T., Furnari, F., Newton, A.C., 2005. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Molecular Cell*, 18 (1), 13-24.
- Gedik, M.E. ve Doğan, A.L., 2018. Kanser Hücresinin Sağlıklı Hücrelerden Temel Farklılıkları. Ed: Baran, Y. *Kanser Moleküler Biyolojisi*. Kısayol Yayıncılık, Ankara, 239-254.
- Gest, C., Joimel, U., Huang, L., Pritchard, L.L., Petit, A., Dulong, C., Buquet, C., Hu, C.Q., Mirshahi, P., Lauren, M., Fauvel-Lafève, F., Cazin, L., Vannier, J.P., Lu, H., Soria, J., Li, H., Varin, R., Soria, C., 2013. Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC Cancer*, 13, 63.
- Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A., 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy, *A Cancer Journal for Clinicians*, 55, 178-194.
- Globocon 2018: Breast cancer, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Goel, M.S. and O'Conor, R., 2016. Increasing screening mammography among predominantly Spanish speakers at a federally qualified health center using a brief previsit video. *Patient Education and Counseling*, 99 (3), 408–413.
- Green, D.R. and Guido, K., 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, 458 (7242), 1127-1130.
- Greenwood, H., Crafter, C., Davies, B., Cosulich, S., 2011. *In vitro* mechanism of action of AZD5363, a novel AKT inhibitor, in breast and prostate cancer cell lines. *Cancer Research*, 71 (8), 1052.
- Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J., 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, 13, 1899-1911.
- Guelstein, V.I., Tchypysheva, T.A., Ermilova, V.D., Ljubimov, A.V., 1993. Myoepithelial and basement membrane antigens in benign and malignant human breast tumors. *International Journal of Cancer*, 53, 269–77.
- Gulbins, E., Jekle, A., Ferlinz, K., Grassme, H., Lang, F., 2000. Physiology of apoptosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 279, 605-615.
- Häcker, G., 2000. The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research*, 301 (1), 5-17.

- Hahn, W.C. and Weinberg, R.A., 2002. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2 (5), 331-41.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer, *Cell*, 100 (1), 57-70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144 (5), 646-674.
- Harrington, K. J., 2016. The biology of cancer. *Medicine*, 44 (1), 1-5.
- Harris, J.R., Morrow, M., Banadonna, G., 1993. Cancer of the breast. *Cancer, principles and practice of oncology*. 4th ed., Ed: De Vita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1264-74.
- Hassen, S., Ali, N., Chowdhury, P., 2012. Molecular signaling mechanisms of apoptosis in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 3, 71-79.
- Haunstetter, A. and Izumo, S., 1998. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circulation Research*, 82, 1111-1129.
- He, C., Kraft, P., Chasman, D.I., Buring, J.E., Chen, C., Hankinson, S.E., Paré, G., Chanock, S., Ridker, P.M., Hunter, D.J.A. 2010. A large-scale candidate gene association study of age at menarche and age at natural menopause. *Human Genetics*, 128, 515–527.
- Heerding, D.A., Rhodes, N., Leber, J.D., Clark, T.J., Keenan, R.M., Lafrance, L.V., Li, M., Safonov, I.G., Takata, D.T., Venslavsky, J.W., Yamashita, D.S., Choudhry, A.E., Copeland, R.A., Lai, Z., Schaber, M.D., Tummino, P.J., Strum, S.L., Wood, E.R., Duckett, D.R., Eberwein, D., Knick, V.B., Lansing, T.J., McConnell, R.T., Zhang, S., Minthorn, E.A., Concha, N.O., Warren, G.L., Kumar, R., 2008. Identification of 4-(2-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-1-ethyl-7-[[[(3S)-3-piperidinylmethyl]oxy]-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-4-yl)-2-methyl-3-butyn-2-ol (GSK690693), a novel inhibitor of AKT kinase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51 (18), 5663-5679.
- Heflin, M., Oddone, E., Pieper, C., Burchett, B., Cohen, H., 2002. The effect of comorbid illness on receipt of cancer screening by older people. *Journal of the American Geriatrics Society*, 50, 1651–1658.
- Hengartner, M.O., 2000. Apoptosis: corralling the corpses. *Cell*, 104, 325-328.
- Hennighausen, L. and Robinson, G.W., 2005. Information networks in the mammary gland. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 715–725.
- Hers, I., Vincent, E.E., Tavaré, J.M., 2011. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal*, 23 (10), 1515-1527.
- Heynick, L.N., Johnston, S.A., Mason, P.A., 2003. Radio frequency electromagnetic fields: cancer, mutagenesis, and genotoxicity, *Bioelectromagnetics* 6, 74-100.
- Hirai, H., Sootome, H., Nakatsuru, Y., Miyama, K., Taguchi, S., Tsujioka, K., Ueno, Y., Hatch, H., Majumder, P.K., Pan, B.S., Kotani, H., 2010. MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9 (7), 1956-1967.
- Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., Korsmeyer, S.J., 1990. BCL-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348, 334-336.
- Horáková, K., Šovčíková, A., Seemannová, Z., Syrová, D., Bušányová, K., Drobná, Z., Ferenčík, M., 2001. Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 30 (6), 650-664.

- Horvitz, H.R., 1999. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Research*, 59, 1701-1706.
- Howlander, N.N.A., Krapcho, M., Miller, D., Bishop, K., Altekruse, S.F., Kosary, C.L., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, D.R., Chen, H.S., Feuer, E.J., Cronin, K.A., 2016. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013. National Cancer Institute, Bethesda.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Zhang, Y., 2010. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention, *Nutrition and Cancer*, 62 (1), 1-20.
- Hunter, A.M., LaCasse, E.C., Korneluk, R.G., 2007. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*, 12 (9), 1543-1568.
- Igney, F.H. and Krammer, P.H., 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 2, 277-288.
- Iqbal, J., Ginsburg, O., Rochon, P.A., Sun, P., Narod, S.A., 2015. Differences in breast cancer stage at diagnosis and cancer-specific survival by race and ethnicity in the United States. *JAMA*, 313 (2), 165-173.
- Jackson, A.L. and Loeb, L.A., 2001. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 477 (1-2), 7-21.
- Janssen, O., Qian, J., Linkermann, A., Kabelitz, D., 2003. CD95 ligand--death factor and costimulatory molecule? *Cell Death and Differentiation*, 10, 1215-1225.
- Jin, Z. and El-Deiry, W.S., 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 4, 139-163.
- Jordan, V.C., 1994. The development of tamoxifen for breast cancer therapy. Long-term Tamoxifen Treatment for Breast Cancer. Ed: Jordan, V.C. University of Wisconsin Press, Madison, 3-26.
- Kallio, A., Zheng, A., Dahllund, J., Heiskanen, K.M., Härkönen, P., 2005. Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis*, 10 (6), 1395-1410.
- Kalyanaraman, B., 2017. Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *Redox Biology*, 12, 833-842.
- Karp, G., 2008. *Cell and molecular biology: Concepts and Experiments*. 5th edition. Wiley, 864 p, New Jersey.
- Karpozilos, A. and Pavlidis, N., 2004. The treatment of cancer in Greek antiquity. *European Journal of Cancer*, 40 (14), 2033-2040.
- Kennedy, S.G., Kandel, E.S., Cross, T.K., Hay, N., 1999. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Molecular and Cellular Biology*, 19 (8), 5800-5810.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal Of Cancer*, 26 (4), 239-257.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239-57.
- Key, T.J., 1995. Hormones and cancer in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 333 (1-2), 59-67.

- Kısaçam, M.A. ve Temizer Ozan, P.S., 2017. Kanser hücrelerinin metabolik ihtiyaçları ve bağımlılıkları. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 31 (1), 67-72.
- Koçak, S., Çelik, L., Özbaş, S., Sak, S.D., Tükün, A., Yalçın, B., 2011. Meme kanserinde risk faktörleri, riskin değerlendirilmesi ve prevansiyon: İstanbul 2010 Konsensus Raporu. Meme Sağlığı Dergisi, 7 (2), 47-67.
- Koppenol, W.H., Bounds, P.L., Dang, C.V., 2011. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. Nature Reviews Cancer, 11 (5), 325-337.
- Koran, K., Tekin, Ç., Çalışkan, E., Tekin, S., Sandal, S., Görgülü, A.O., 2017. Synthesis, structural and thermal characterizations and *in vitro* cytotoxic activities of new cyclotriphosphazene derivatives. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 192 (9), 1002-1011.
- Korsmeyer, S.J., 1999. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. Cancer Research, 59 (7 Supplement), 1693-1700.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilisation in cell death. Physiological Reviews, 87 (1), 99-163.
- Kroenke, C.H., Rosner, B., Chen, W.Y., Kawachi, I., Colditz, G.A., Holmes, M.D. 2004. Functional impact of breast cancer by age at diagnosis. Journal of Clinical Oncology, 22 (10), 1849-1856.
- LaCasse, E.C., Mahoney, D.J., Cheung, H.H., Plenchette, S., Baird, S., Korneluk, R.G., 2008. IAP-targeted therapies for cancer. Oncogene, 27 (48), 6252-6275.
- Lancellotti, M., Pereira, R.F.C., Cury, G.G., Hollanda, L.M.D., 2009. Pathogenic and opportunistic respiratory bacteria-induced apoptosis. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 13 (3), 226-231.
- Lane, D.P., 1992. p53, guardian of the genome. Nature, 358, 15-16.
- Legler, J., Meissner, H., Coyne, C., Breen, N., Chollette, V., Rimer, B., 2002. The effectiveness of interventions to promote mammography in women with historically lower rates of screening. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 11, 59-71.
- Leong, S.P., Shen, Z.Z., Liu, T.J., Agarwal, G., Tajima, T., Paik, N.S., Sandelin, K., Derossis, A., Cody, H., Foulkes, W.D., 2010. Is breast cancer the same disease in Asian and Western countries? World Journal of Surgery, 34 (10), 2308-2324.
- Levine, A.J., Momand, J., Finlay, C.A., 1991. The p53 tumour suppressor gene. Nature, 351 (6326), 453-456.
- Levy, D.S., Kahana, J.A., Kumar, R., 2009. AKT inhibitor, GSK690693, induces growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cell lines. Blood, 113 (8), 1723-1729.
- Li, Y.L., Weng, H.C., Hsu, J.L., Lin, S.W., Guh, J.H., Hsu, L.C., 2019. The combination of mk-2206 and wzb117 exerts a synergistic cytotoxic effect against breast cancer cells. Frontiers in Pharmacology, 10, 1311.
- Li, Z., Tan, F., Liewehr, D.J., Steinberg, S.M., Thiele, C.J., 2010. *In vitro* and *in vivo* inhibition of neuroblastoma tumor cell growth by AKT inhibitor perifosine. Journal of the National Cancer Institute, 102 (11), 758-770.
- Lien, E.C., Dibble, C.C., Toker, A., 2017. PI3K signaling in cancer: beyond AKT. Current Opinion in Cell Biology, 45, 62-71.
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M., Zhao, J.J., 2009. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. Nature Reviews Drug Discovery, 8 (8), 627-644.

- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. *Methods*, 25 (4), 402-408.
- Lu, S., Li, S., Zhang, J., 2014. Harnessing allosterity: a novel approach to drug discovery. *Medicinal Research Reviews*, 34 (6) 1242-1285.
- Manning, B.D. and Cantley, L.C., 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129 (7), 1261-1274.
- Markman, B., Dienstmann, R., Tabernero, J., 2010. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway—beyond rapalogs. *Oncotarget*, 1 (7), 530.
- Marmot, M., 2005. Social determinants of health inequalities. *Lancet*, 365 (9464), 1099–1104.
- Masi, C., Blackman, D., Peek, M., 2007. Interventions to enhance breast cancer screening, diagnosis, and treatment among racial and ethnic minority women. *Medical Care Research and Review*, 64 (5), 195–242.
- McCormack, V.A. and Boffetta, P., 2011. Today's lifestyles, tomorrow's cancers: trends in lifestyle risk factors for cancer in low- and middle-income countries. *Annals of Oncology*, 22 (11), 2349–2357.
- Mendez, L.E., Mancini, N., Cantuaria, G., Gomez-Marin, O., Penalver, M., Braunschweiger, P., Nadjji, M., 2002. Expression of glucose transporter-1 in cervical cancer and its precursors. *Gynecologic Oncology*, 86 (2), 138–143.
- Meuillet, E.J., Ihle, N., Baker, A.F., Gard, J.M., Stamper, C., Williams, R., Coon, A., Mahadevan, D., George, B.L., Kirkpatrick, L., Powis, G., 2004. *In vivo* molecular pharmacology and antitumor activity of the targeted Akt inhibitor PX-316. *Oncology Research*, 14 (10), 513-527.
- Meuillet, E.J., Mahadevan, D., Vankayalapati, H., Berggren, M., Williams, R., Coon, A., Kozikowski, A.P., Powis, G., 2003. Specific inhibition of the Akt1 pleckstrin homology domain by D-3-deoxy-phosphatidyl-myo-inositol analogues. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2 (4), 389-399.
- Mier, N., Ory, M.G., Zhan, D., Wang, S., Burdine, J.N. Levels and correlates of exercise in a border mexican american population. *American Journal of Health Behavior*, 31 (2), 159–169.
- Minn, A.J., Vélez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M., Thompson, C.B., 1997. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, 385 (6614), 353-357.
- Monk, B.J. and Coleman, R.L., 2009. Changing the Paradigm in the Treatment of Platinum-Sensitive Recurrent Ovarian Cancer From Platinum Doublets to Nonplatinum Doublets and Adding Antiangiogenesis Compounds. *International Journal of Gynecological Cancer*, 19, 63-67.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2), 55-63.
- Nelson, E.C., Evans, C.P., Mack, P.C., Devere-White, R.W., Lara, P.N., 2007. Inhibition of Akt pathways in the treatment of prostate cancer. *Prostate Cancer*, 10 (4), 331-339.
- Nettore, I.C., Colao, A., Macchia, P.E., 2018. Nutritional and environmental factors in thyroid carcinogenesis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15 (8), 1735.

- New, C., Xiao, L., Ma, J., 2013. Acculturation and overweight-related attitudes and behavior among obese Hispanic adults in the United States. *Obesity*, 21 (11), 2396–2404.
- Nichols, S., Koch, E., Lallemand, R., Heald, R.J., Izzard, L., Machin, D., Mullee, M.A., 1986. Randomised trial of compliance with screening for colorectal cancer. *British Medical Journal*, 293, 107–110.
- O'Brien, M.A. and Kirby, R., 2008. Apoptosis: a review of pro-apoptotic and antiapoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18 (6), 572-585.
- Ocana, A., Vera-Badillo, F., Al-Mubarak, M., Templeton, A.J., Corrales-Sanchez, V., Diez-Gonzalez, L., Amir, E., 2014. Activation of the PI3K/mTOR/AKT pathway and survival in solid tumors: systematic review and meta-analysis. *PloS One*, 9 (4), e95219.
- Onat, D., 2009. Meme anatomisi ve fizyolojisi. Temel cerrahi el kitabı. Ed: Sayek, İ. Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara.
- Oren, M. and Rotter, V., 1999. Introduction: p53—the first twenty years. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55, 9-11.
- Ortega, Á. D., Sánchez-Aragó, M., Giner-Sánchez, D., Sánchez-Cenizo, L., Willers, I., Cuezva, J.M., 2009. Glucose avidity of carcinomas. *Cancer Letters*, 18; 276 (2); 125-235.
- Osborne, C.K. and Schiff, R., 2011. Mechanisms of Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Annual Review of Medicine*, 62, 233-247.
- Osborne, C.K., 1998. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 339 (22), 1609-1618.
- Osborne, C.K., Elledge, R.M., Fuqua, S.A.W., 1996. Estrogen receptors in breast cancer therapy. *Science and Medicine*, 3, 32-41,
- Owusu-Brackett, N., Shariati, M., Meric-Bernstam, F., 2019. Role of PI3K/AKT/mTOR in cancer signaling. *Predictive Biomarkers in Oncology*, Ed: Badve, S. and Kumar, G. Springer Nature, Switzerland, 263-270.
- Pal, S.K., Reckamp, K., Yu, H., Figlin, R.A., 2010. Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 19 (11), 1355-1366.
- Pe´rez, A., Reininger, B.M., Aguirre Flores, M.I., Sanderson, M., Roberts, R.E., 2006. Physical activity and overweight among adolescents on the Texas-Mexico border. *La Revista Panamericana de Salud Pública*, 19, 244–252.
- Peters, C. and Brown, S., 2015. Antibody–drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. *Bioscience Reports*, 35 (4), e00225.
- Phin, S., Moore, M.W., Cotter, P.D., 2013. Genomic rearrangements of PTEN in prostate cancer. *Frontiers in Oncology*, 3, 240.
- Pitelka, D.R., 1988. The mammary gland. *Cell and tissue biology: a textbook of histology*. Ed: Weiss, L. Elsevier Biomedical, New York, 880–898.
- Porta, C., Paglino, C., Mosca, A., 2014. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Frontiers in Oncology*, 4, 64.
- Porta, C., Paglino, C., Mosca, A., 2014. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Frontiers in Oncology*, 4, 64.
- Prabhu, K.S., Siveen, K.S., Kuttikrishnan, S., Iskandarani, A., Tsakou, M., Achkar, I.W., Therachiyil, L., Krishnankutty, R., Parray, A., Kulinski, M., Merhi, M., Dermime, S., Mohammad, R.M., Uddin, S., 2017. Targeting of X-linked inhibitor of apoptosis protein

- and PI3-kinase/AKT signaling by embelin suppresses growth of leukemic cells. *PLoS One*, 12 (7), e0180895.
- Pullan, S., Wilson, J., Metcalfe, A., Edwards, G.M., Goberdhan, N., Tilly, J., Hickman, J.A., Dive, C., Streuli, C.H., 1996. Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *Journal of Cell Science*, 109, 631–642.
- Reed, J.C., 1997. BCL-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in haematologic malignancies. *Seminars in Hematology*, 34, 9-19.
- Reed, J.C., 2000. Mechanisms of apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 157 (5), 1415-1430.
- Rogers, S.J., Harrington, K.J., Rhys-Evans, P., O-Charoenrat, P., Eccles, S.A., 2005. Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 24 (1), 47-69.
- Romrell, L.J. and Bland, K.I., 1998. Anatomy of the breast, axilla, chest wall and related metastatic sites. *The breast: comprehensive management of benign and malignant disease*. 2nd ed. Ed: Bland, K.I. and Copeland, E.M. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1998, 19-37.
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J.M., Venkatachalam, M.A., 1999. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *The American Journal of Medicine*, 107 (5), 489-506.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M., 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307 (5712), 1098-1101.
- Schneider, P. and Tschopp, J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 74, 281-286.
- Serda, I.F.B.C., van Roekel, E., Lynch, B.M., 2018. The role of physical activity in managing fatigue in cancer survivors. *Current Nutrition Reports*, 7 (3), 59-69.
- Shirazi, F.H., 2011. Remarks in successful cellular investigations for fighting breast cancer using novel synthetic compounds. *Breast Cancer–Focusing Tumor Microenvironment, Stem Cells And Metastasis*. Ed: Gunduz, M. Intech Open, Rijeka, 85-102.
- Slater, J.S., Ha, C.N., Malone, M.E., McGovern, P., Madigan, S.D., Finnegan, J.R., Casey-Paal, A.L., Margolis, K.L., Lurie, N., 1998. A randomized community trial to increase mammography utilization among low-income women living in public housing. *Preventive Medicine*, 27 (6), 862–870.
- Smith, R.A., Manassaram-Baptiste, D., Brooks, D., Doroshenk, M., Fedewa, S., Saslow, D., Brawley, O.W., Wender, R., 2015. Cancer screening in the United States, 2015: A review of current American cancer society guidelines and current issues in cancer screening. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65 (1), 30-54.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M., 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51, 1409-1416.
- Sternlicht, M.D., 2006. Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Research*, 8, 201.
- Stewart, S.L., Harewood, R., Matz, M., Rim, S.H., Sabatino, S.A., Ward, K.C., Weir, H.K., 2017. Disparities in ovarian cancer survival in the United States (2001-2009): Findings from the CONCORD-2 study. *American Cancer Society Journals*. 123 (Suppl 24), 5138-5159.

- Stocks, T., Lukanova, A., Johansson, M., Rinaldi, S., Palmqvist, R., Hallmans, G., Kaaks, R., Stattin, P., 2008. Components of the metabolic syndrome and colorectal cancer risk; a prospective study. *International Journal of Obesity*, 32 (2), 304–314.
- Stolk, L., Perry, J.R., Chasman, D.I., He, C., Mangino, M., Sulem, P., Barbalic, M., Broer, L., Byrne, E.M., Ernst, F., Esko, T., Franceschini, N., Gudbjartsson, D.F., Hottenga, J.J., Kraft, P., McArdle, P.F., Porcu, E., Shin, S.Y., Smith, A.V., van Wingerden, S., Zhai, G., Zhuang, W.V., Albrecht, E., Alizadeh, B.Z., Aspelund, T., Bandinelli, S., Lauc, L.B., Beckmann, J.S., Boban, M., Boerwinkle, E., Broekmans, F.J., Burri, A., Campbell, H., Chanock, S.J., Chen, C., Cornelis, M.C., Corre, T., Coviello, A.D., d'Adamo, P., Davies, G., de Faire, U., de Geus, E.J., Deary, I.J., Dedoussis, G.V., Deloukas, P., Ebrahim, S., Eiriksdottir, G., Emilsson, V., Eriksson, J.G., Fauser, B.C., Ferreli, L., Ferrucci, L., Fischer, K., Folsom, A.R., Garcia, M.E., Gasparini, P., Gieger, C., Glazer, N., Grobbee, D.E., Hall, P., Haller, T., Hankinson, S.E., Hass, M., Hayward, C., Heath, A.C., Hofman, A., Ingelsson, E., Janssens, A.C., Johnson, A.D., Karasik, D., Kardia, S.L., Keyzer, J., Kiel, D.P., Kolcic, I., Kutalik, Z., Lahti, J., Lai, S., Laisk, T., Laven, J.S., Lawlor, D.A., Liu, J., Lopez, L.M., Louwers, Y.V., Magnusson, P.K., Marongiu, M., Martin, N.G., Klaric, I.M., Masciullo, C., McKnight, B., Medland, S.E., Melzer, D., Mooser, V., Navarro, P., Newman, A.B., Nyholt, D.R., Onland-Moret, N.C., Palotie, A., Paré, G., Parker, A.N., Pedersen, N.L., Peeters, P.H., Pistis, G., Plump, A.S., Polasek, O., Pop, V.J., Psaty, B.M., Rääkkönen, K., Rehnberg, E., Rotter, J.I., Rudan, I., Sala, C., Salumets, A., Scuteri, A., Singleton, A., Smith, J.A., Snieder, H., Soranzo, N., Stacey, S.N., Starr, J.M., Stathopoulou, M.G., Stirrups, K., Stolk, R.P., Styrkarsdottir, U., Sun, Y.V., Tenesa, A., Thorand, B., Toniolo, D., Tryggvadottir, L., Tsui, K., Ulivi, S., van Dam, R.M., van der Schouw, Y.T., van Gils, C.H., van Nierop, P., Vink, J.M., Visscher, P.M., Voorhuis, M., Waeber, G., Wallaschofski, H., Wichmann, H.E., Widen, E., Wijnands-van Gent, C.J., Willemsen, G., Wilson, J.F., Wolffenbuttel, B.H., Wright, A.F., Yerges-Armstrong, L.M., Zemunik, T., Zgaga, L., Zillikens, M.C., Zygmont, M., LifeLines Cohort Study, Arnold, A.M., Boomsma, D.I., Buring, J.E., Crisponi, L., Demerath, E.W., Gudnason, V., Harris, T., Hu, F.B., Hunter, D.J., Launer, L.J., Metspalu, A., Montgomery, G.W., Oostra, B.A., Ridker, P.M., Sanna, S., Schlessinger, D., Spector, T.D., Stefansson, K., Streeten, E.A., Thorsteinsdottir, U., Uda, M., Uitterlinden, A.G., van Duijn, C.M., Völzke, H., Murray, A., Murabito, J.M., Visser, J.A., Lunetta, K.L., 2012. Meta-analyses identify 13 loci associated with age at menopause and highlight DNA repair and immune pathways. *Nature Genetics*, 44, 260–268.
- Stone, J., Dite, G.S., Gunasekara, A., English, D.R., McCredie, M.R., Giles, G.G., Cawson, J.N., Hegele, R.A., Chiarelli, A.M., Yaffe, M.J., Boyd, N.F., Hopper, J.L., 2006. The heritability of mammographically dense and nondense breast tissue. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 15, 612–617.
- Streuli, C., 1999. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Current Opinion in Cell Biology*, 11, 634–640.
- Streuli, C.H. and Bissell, M.J., 1990. Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum. *Journal of Cell Biology*, 110, 1405–1415.
- Su, J.S., Woods, S.M., Ronen, S.M., 2012. Metabolic consequences of treatment with AKT inhibitor perifosine in breast cancer cells. *NMR in Biomedicine*, 25, 379–388.
- Sun, Q., Wu, R., Cai, S., Lin, Y., Sellers, L., Sakamoto, K., He, B., Peterson, B.R., 2011. Synthesis and biological evaluation of analogues of AKT (protein kinase B) inhibitor-IV. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54 (5), 1126–1139.

- Sutherland, R.L., 1999. Molecular basis of carcinogenesis. *Cancer Facts: A Concise Oncology Text*. Ed: Bishop, J.F. London, 196-208.
- Szegezdi, E., Logue, S.E, Gorman, A.M., Samali A., 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Reports*, 7, 880-885.
- Tan, S., Ng, Y., James, D.E., 2011. Next-generation Akt inhibitors provide greater specificity: effects on glucose metabolism in adipocytes. *Biochemical Journal*, 435 (2), 539-544.
- Tao, L., Gomez, S.L., Keegan, T.H., Kurian, A.W., Clarke, C.A., 2015. Breast cancer mortality in african-american and non-hispanic white women by molecular subtype and stage at diagnosis: a population-based study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 24 (7), 1039–1045.
- Tekin, S., Erden, Y., Sandal, S., Yilmaz, B., 2015. Is irisin an anticarcinogenic peptide? *Medicine Science*, 4 (2), 2172-2180.
- Tennant, D.A., Durán, R. V., Boulahbel, H., Gottlieb, E. (2009). Metabolic transformation in cancer. *Carcinogenesis*, 30(8), 1269-1280.
- Thompson, C.B., 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-1462.
- Thorpe, L.M., Yuzugullu, H., Zhao, J.J., 2015. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature Reviews Cancer*, 15 (1), 7-24.
- Thrush, R.S. and Lanese, R.R., 1962. The use of printed material in diabetes education. *Diabetes*, 11, 132–137.
- Tokunaga, E., Kataoka, A., Kimura, Y., Oki, E., Mashino, K., Nishida, K., Ohno, S., 2006. The association between Akt activation and resistance to hormone therapy in metastatic breast cancer. *European Journal of Cancer*, 42 (5), 629-635.
- Tokunaga, E., Oki, E., Egashira, A., Sadanaga, N., Morita, M., Kakeji, Y., Maehara, Y., 2008, Deregulation of the Akt pathway in human cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 8(1), 27-36.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., Croce, C.M., 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 226, 1097-1099.
- Ueno, T., Toi, M., Biven, K., Bando, H., Ogawa, T., Linder, S., 2003. Measurement of an apoptotic product in the sera of breast cancer patients, *European Journal of Cancer*, 39 (6), 769-774.
- Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Olsson, I., 2015. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347, 6220.
- Uhlen, M., Oksvold, P., Fagerberg, L., Lundberg, E., Jonasson, K., Forsberg, M., Wernerus, H., 2010. Towards a knowledge-based human protein atlas. *Nature Biotechnology*, 28 (12), 1248-1250.
- Urak, R., Walter, M., Lim, L., Wong, C.W., Budde, L.E., Thomas, S., Wang, X., 2017. Ex vivo Akt inhibition promotes the generation of potent CD19CAR T cells for adoptive immunotherapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 5(1), 1-13.
- van Zyl, B., Tang, D., Bowden, N.A., 2018. Biomarkers of platinum resistance in ovarian cancer: what can we use to improve treatment. *Endocrine-Related Cancer*, 2018, 25 (5), 303-318.
- Vander H., Matthew G., Cantley, L.C., Thompson, C.B., 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324 (5930), 1029-1033.

- Vara, J.Á.F, Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., González-Barón, M., 2004. PI3K/AKT signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 30 (2), 193-204.
- Veach, E., Xique, I., Johnson, J., Lyle, J., Almodovar, I., Sellers, K.F., Moore, C.T., Jackson, M.C., 2014. Race Matters: Analyzing the relationship between colorectal cancer mortality rates and various factors within respective racial groups. *Frontiers in Public Health*, 2, 239.
- Veeriah, S., 2012. Opposing roles of the oncogene Akt isoforms in tumour progression: is there a dark side to Akt pathway inhibition? *Journal of Chemical Biology*, 5 (3), 115-117.
- Vivanco, I., Sawyers, C.L., 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2 (7), 489-501.
- Vucic, D. and Fairbrother, W.J., 2007. The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer. *Clinical Cancer Research*, 13 (20), 5995-6000.
- Vural, N., 2005. Genetik Toksikoloji. Toksikoloji. Ed: Vural, N. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:73. Ankara, 115- 128.
- Wallace, D., Hunter, J., Papenfuss, M., De Zapien, J.G., Denman, C., Giuliano, A.R., 2007. Pap smear screening among women ≥ 40 years residing at the United States-Mexico border. *Health Care For Women International*, 28 (9), 799–816.
- Wei, Y., Fan, T., Yu, M., 2008. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40 (4), 278-288.
- Welsh, P.L. and King, M.C., 2001. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Human Molecular Genetics*, 10 (7), 705–713.
- WHO, 2018: Cancer prevention, World Health Organization, Geneva-Switzerland.
- WHO, 2018: Latest cancer global data, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Wilson, T.E., Fraser-White, M., Feldman, J., Homel, P., Wright, S., King, G., Coll, B., Banks, S., Davis-King, D., Price, M., Browne, R., 2008. Hair salon stylists as breast cancer prevention lay health advisors for African American and Afro-Caribbean women. *Journal of Health Care for the Poor and Underserved*, 19 (1), 216–226.
- Winters, S., Martin, C., Murphy, D., Shokar, N.K., 2017. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 151, 1-32.
- Wong, R.S., 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30 (1), 1-14.
- Woodward, T.L., Mienaltowski, A.S., Modi, R.R., Bennett, J.M., Haslam, S.Z., 2001. Fibronectin and the alpha(5) beta(1) integrin are under developmental and ovarian steroid regulation in the normal mouse mammary gland. *Endocrinology*, 142, 3214–3222.
- Wright, G.L., Maroulakou, I.G., Eldridge, J., Liby, T.L., Sridharan, V., Tsihchlis, P.N., 2008. VEGF stimulation of mitochondrial biogenesis: requirement of AKT3 kinase. *FASEB Journal*, 22 (9), 3264-3275.
- Yamaji, M., Ota, A., Wahiduzzaman, M., Karnan, S., Hyodo, T., Konishi, H., Tsuzuki, S., Hosokawa, Y., Haniuda, M., 2017. Novel ATP-competitive Akt inhibitor afuresertib suppresses the proliferation of malignant pleural mesothelioma cells. *Cancer Medicine*, 6 (11), 2646-2659.
- Yap, T.A., Walton, M.I., Hunter, L.J., Valenti, M., de Haven Brandon, A., Eve, P.D., Ruddle, R., Heaton, S.P., Henley, A., Pickard, L., Vijayaraghavan, G., Caldwell, J.J., Thompson,

- N.T., Aherne, W., Raynaud, F.I., Eccles, S.A., Workman, P., Collins, I., Garrett, M.D., 2011. Preclinical pharmacology, antitumor activity, and development of pharmacodynamic markers for the novel, potent AKT inhibitor CCT128930. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10 (2), 360–371.
- Yenigün, V.B., 2011. Tamoxifen effect on isolated breast cancer stem cells and MCF-7 breast cancer cells in the aspect of autophagy and apoptosis. MS Thesis, Yeditepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Yokota, J., 2000. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21 (3), 497-503.
- Yokuş, B. ve Çakır, D.Ü., 2002. *In vivo* oksidatif DNA hasarı biyomarkeri; 8- Hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 5, 535- 43.
- Young, R.R., 2002. Genetic Toxicology; Web Resources. *Toxicology*, 173 (1-2), 103-21.
- Yuan, T.L., Cantley, L.C., 2008. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27 (41), 5497-5510.
- Zhou, H., Li, X.M., Meinkoth, J., Pittman, R.N., 2000. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *The Journal of Cell Biology*, 151 (3), 483-494.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	: Ahmet KARAKUŞ
Doğum tarihi	:
Doğum Yeri	:
Uyruğu	:
Adres	:
Tel	:
E-mail	:
Eğitim	
Lisans	: Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü - 2013
Yüksek Lisans	: Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı - 2015
Doktora	: Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı – Devam Ediyor
İş Deneyimi	
Arş. Gör.	: Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü: 2017 – Devam Ediyor
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce	: İyi
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
European Association for Cancer Research Moleküler Kanser Araştırma Derneği	