

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

MEME KANSERİ HÜCRE DİZİSİ ÜZERİNDE
(MDA-MB-231), KURKUMİN VE METOTREKSATIN
ANTİPROLİFERATİF VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

AYÇA AYKAÇ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Aslıhan BÜYÜKÖZTÜRK KARUL

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
..... proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN- 2021

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda planlanmasında, araőtırılmasında, yürütölmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalıőmamı bilimsel temeller ışığında őekillendiren sayın hocam Prof. Dr. Aslıhan BÜYÜKÖZTÜRK KARUL'a, Prof. Dr. Özge ÇEVİK'e, bilgilerini, tecrübelerini ve değerli zamanlarını ayıran Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY'e, Doç Dr. Mustafa YILMAZ'a, Doç Dr. Yusuf KURTULMUŐ'a, Dr. Öğretim Üyesi Ayça TUZCU'ya; ayrıca tezin pratik aşamalarında bana yardımcı olan Araő. Gör. Burçin İrem ABAS'a ve tüm Merkez Araştırma Laboratuvarı alıőanlarına (ADÜ BİLTEM), ayrıca beni hayatta azimle her őeyi başarabileceğime inandıran ve bunun için bana gerekli özgüveni kazandıran her daim sonsuz desteklerini hissettiren aileme teőekkürlerimi sunarım.

Ayça AYKAÇ

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
RESİMLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.1.1. Kanser Epidemiyolojisi	3
2.2. Meme Kanseri	7
2.2.1. Meme Kanseri Yerleşim Yeri ve Histolojik Tipleri	7
2.2.2. Meme Kanseri Tanı Yöntemleri.....	9
2.2.3. Meme Kanseri Evreleri.....	10
2.2.4. Meme Kanseri Risk Faktörleri	12
2.2.5. MDA-MB-231 Hücre Hattı	13
2.3. Kurkumin.....	14
2.3.1. Kurkumin Biyoyararlanımı ve Metabolizması	16
2.3.2. Kurkuminin Antikanser Etkileri	16
2.4. Metotreksatın Antikanser Etkileri	18

2.5. Apoptozis.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Gereç.....	22
3.1.1. Hücre Hattı	22
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	22
3.1.1. Cihazlar.....	23
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Hücrelerin Çözdürülmesi.....	24
3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması	24
3.2.3. Hücre Sayımı ve Canlılık Kontrolü.....	25
3.2.4. Hücrelerinin Dondurulması	25
3.2.5. Kurkumin Dozunun Belirlenmesi.....	25
3.2.6. Metotreksat Dozunun Belirlenmesi	25
3.2.7. Wst-1 Testi (hücre sitotoksite testi).....	26
3.2.8 Annexin V Testi (Apoptoz testi)	26
3.3. İstatistiksel Analizler	27
4. BULGULAR	29
4.1. Hücre Canlılığı Sonuçları Değerlendirme	29
4.1.1. WST-1 Testi Sonuçları	29
4.2. Apoptoz Sonuçları Değerlendirme	32
4.3. Annexin V Testi Sonuçları	33
5. TARTIŞMA.....	36
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR.....	41
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	49
ÖZ GEÇMİŞ.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: yüzde
°C	: Santrigrat Derece
µl	: mikrolitre
µM	: mikromolar
AKT	: Protein kinaz B
BRCA1 ve BRCA2	: Meme kanseri yatkınlık genleri 1 ve 2
Cm	: Santimetre
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CUR	: Kurkumin
DAMPA	: 4-deoksi-4-amino-N-10-metilpteroik asit
DHFR	: Dihidrofolat redüktazı
DMSO	: Dimetil sülfoksosit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPBS	: Dulbecco's Phosphate Buffer Saline
dUMP	: Deoksiüridin monofosfat
EGCG	: Epigallokatesin gallat
ER	: Östrojen reseptörü
FBS	: Fetal Bovine Serum
FH4 / FH5	: Tetrahidrofolat
HER-2	: İnsan epidermal büyüme reseptör-2
İNOS	: İndüklenebilir nitrik asit sentaz
LV	: lökovorin
MI	: mililitre

mTOR	: Rapamisin memeli hedefi
MTX	: Metotreksat
NF-kB	: Nükleer faktörü kappa-B
PR	: Progesteron Reseptörü
RNA	: Ribonükeilasit
SFN	: Sülforafan
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörünü
WST-1	: Water soluble tetrazolium test

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Dünyada 2020’de farklı kanser türlerinin yasa göre standartlaştırılmış insidans oranları, her iki cinsiyet, her yaş	4
Şekil 2. En fazla teşhis konulan kanser tiplerinin bölgesel dağılımları.....	5
Şekil 3. Türkiye’de en sık görülen kanser tiplerinin kadın ve erkeklerde yasa göre standartlaştırılmış insidans oranları.....	6
Şekil 4. Türkiye’de en sık görülen kanser tiplerinin kadın ve erkeklerde yaşa göre standartlaştırılmış ölüm oranları.....	7
Şekil 5. Memenin ve lenf nodlarının anatomisi	8
Şekil 6. Meme kanseri evreleri.....	11
Şekil 7. Kurkuminoidlerin kimyasal yapısı.....	15
Şekil 8. Metotreksatın kimyasal yapısı.....	19
Şekil 9. Apoptoz geçiren bir hücrenin evreleri.	21
Şekil 10. MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan kontrol, CUR 1, 10, 100 µM, MTX 10,100.....	31
Şekil 11. Apoptoz sonuçlarının değerlendirilmesi.	32

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. MDA-MB-231 hücrelerinin invert mikroskopda görünüşü (x40).	13
Resim 2. Zerdeçal kökü ve toz baharat hali.	14
Resim 3. Hücrelerin Muse® cell analyzer cihazında okutulması.	27
Resim 4. 0-24 saat CUR, MTX tekli ve kombine ilaç dozlarına maruz kalmış WST-1 testi görüntüsü.....	29
Resim 5. MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan kontrol, CUR 1, 10, 100 µM, MTX 10,100 µM ve kombine dozları invert mikroskop görüntüleri (5x).....	30
Resim 6. MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan kontrol, CUR 1, 10, 100 µM, MTX 10,100 µM ve kombine dozları invert mikroskop görüntüleri (10x).....	30

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Türkiye kanser istatistikleri, 2020	6
Tablo 2. Çalışmada kullanılan hücre hattı ve özellikleri.	22
Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddelerin ve laboratuvar malzemelerinin listesi.....	22
Tablo 4. Kullanılan cihazların listesi.	23
Tablo 5. 0-24 saat analizi sonuçları Annexin-V boyaması (%) canlılık, apoptoz ve nekroz ortalama± standart sapmaları.	34

ÖZET

MEME KANSERİ HÜCRE DİZİSİ ÜZERİNDE (MDA-MB-231) KURKUMİN VE METOTREKSATIN ANTİPROLİFERATİF VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Aykaç A. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya (Tıp) Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2021

Amaç: Bu çalışmada, meme kanseri hücre dizisinde (MDA-MB-231) kurkumin (CUR) ve metotreksat'ın (MTX) tekli ve kombine dozlarında, antiproliferatif ve apoptotik etkilerini araştırmak, böylelikle kanser hücrelerinin direnç geliştirme olasılığını ve tedavilerin terapötik dozunu ve toksisitesini azaltma yolunda literatüre katkı sağlamak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada CUR ve MTX'in MDA-MB-231 hücreleri üzerine 24 saat inkübasyon sonrası sitotoksik etkisi olup olmadığı WST-1, apoptotik etkisi de Annexin V testleri ile tespit edilmeye çalışılmıştır. WST-1 sitotoksikite testi sonuçlarının istatistiksel analizi normal dağılıma uygunluğuna göre, tek yönlü ANOVA (One-Way ANOVA) ve Kruskal-Wallis yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Verilerin istatistiksel analizi SPSS (for Windows Release 11.5 Standart Version Copyright © Spss Inc. 1989-2001) hazır paket programı kullanılarak yapılmıştır. CUR ve MTX tekli ve kombine tüm dozlarının sitotoksikite ve canlı hücre %'leri ortalama \pm standart sapma tablosu ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Uygulanan tüm dozların doza ve zamana bağlı olarak antikansorejen, antiproliferatif ve apoptotik etkilere sahip olduğu bulunmuş, özellikle CUR 10 μ M + MTX 10 μ M doz kombinasyonunun hücre apoptozuna yol açtığı saptanmıştır. Bu durum geniş çaplı klinik çalışmalarla desteklendiğinde meme kanserinin uzun vadeli tedavisinde daha etkili olacağı öngörülebilir.

Sonuç: Bu çalışmadan elde edilen veriler, kurkumin gibi fitoterapotik ajanlarla, düşük dozda kemoterapi ilaçlarının kombine tedavisi, detaylı klinik araştırmalarla desteklenerek, meme kanserli hastalar için minimum yan etkiler ile iyi bir yaşam kalitesi sunabilir, maksimum terapötik etkinlik sağlanmasına katkıda bulunabilir.

Anahtar Kelimeler: Annexin V, Kurkumin, MDA-MB-231, Metotreksat, WST-1.

ABSTRACT

THE ANTIPROLIFERATIVE AND APOPTOTIC EFFECTS OF CURCUMIN AND METHOTREXATE ON MDA-MB-231 BREAST CANCER CELL LINES

Aykaç A. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Medical Biochemistry Program, Master Thesis, Aydın, 2021

Objective: In this study, antiproliferative and apoptotic effects of curcumin (CUR) and methotrexate (MTX) working with different mechanisms in cancer cell line (MDA-MB-231) were investigated, thus reducing the possibility of cancer cells to develop resistance and reducing the therapeutic dose and toxicity of single treatments is targeted.

Material and Methods: In this study, it was tried to determine whether CUR and MTX had a cytotoxic effect on MDA-MB-231 cells after 24 hours of incubation, with WST-1 and apoptotic effects with Annexin V tests. Statistical analysis of WST-1 cytotoxicity test results was performed using one-way ANOVA (One-Way ANOVA) and Kruskal-Wallis methods, according to normal distribution. Statistical analysis of the data was made using the ready package program SPSS (for Windows Release 11.5 Standard Version Copyright © Spss Inc. 1989-2001). Cytotoxicity and viable cell % of all single and combined doses of CUR and MTX were evaluated with the mean \pm standard deviation table.

Results: All administered doses were found to have anticarcinogenic, antiproliferative and apoptotic effects depending on the dose and time, especially it is predicted that the CUR 10 μ M + MTX 10 μ M dose combination will be more effective for the long-term treatment of breast cancer.

Conclusion: The data obtained from this study, combined treatment of low-dose chemotherapy drugs with phytotherapeutic agents such as curcumin, supported by detailed clinical studies, can provide a good quality of life with minimal side effects for patients with breast cancer and contribute to maximum therapeutic efficacy.

Keywords: Annexin V, Curcumin, MDA-MB-231, Methotrexate, WST-1.

1. GİRİŞ

Meme kanseri, erken tanı tarama yöntemlerindeki tüm gelişmelere rağmen, küresel bir tehdit unsuru olmaya devam etmekte ve kadınlarda teşhis edilen ve etkili tedavi gerektiren, kanserlerin başında yer almaktadır. Günümüzde geliştirilen kombine tedavi yöntemleri, cerrahi, kemoterapi, endokrin tedavisi ve radyoterapi gibi monoterapötik tedavilerin yanı sıra, tümör nüksü ve hastalık ilerlemesinin yüksek insidansı sebebiyle meme kanseri tedavisinde oldukça önemli hale gelmiştir. Bu sebeple tıbbi bitkilerden elde edilen biyoaktif fitokimyasalların bu geleneksel tedavilerle birleştirilmiş halinin, antikanser etkisinin araştırılmasına büyük ilgi duyulmaktadır.

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve gelişimi östrojen seviyesi, beslenme, kalıtsal duyarlılık ve obezite gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (GLOBOCAN, 2020).

Bu faktörler, gen mutasyonlarına, hücre döngüsü anormalliklerine ve epigenetik modifikasyon kontrolünün kaybına neden olarak çeşitli sinyal yollarındaki değişiklikleri de indüklemektedir.

Meme kanseri tanı ve tedavisi son yıllarda oldukça gelişmiştir ancak ileri evre hastalığı olan hastaların prognozu halen istendiği kadar iyi değildir. Hormon kullanımının azaltılması, egzersizin artırılması ve obezitenin gerilemesi gibi önlemlerle gelişmiş ülkelerde meme kanseri insidansı azaldığı görülürken Türkiye’de son 20 yılda 2 kattan daha fazla artmıştır ve kadınların sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle, meme kanserinin tedavisi için güçlü yeni ajanların tanımlanması çok önemlidir.

Doğal ürünler, kanıtlanmış etkinliği ve güvenliği nedeniyle antitümör ilaçların geliştirilmesi için bilim adamlarının dikkatini çekmiştir. Doğal ürünler yeni antitümör ajanların kaynaklarını oluşturabilir. Kurkumin, yüzyıllar boyunca ayurveda tıbbında da kullanılmış doğal bileşiklerden biridir. Antikanser özellikleri ve düşük toksisitesinden ötürü birçok klinik ve prelinik çalışmanın odağında olmuştur (Yao ve diğerleri, 2021; Bahrami ve diğerleri, 2021; Ruiz de Porras ve diğerleri, 2021; Mirzaei ve diğerleri, 2021). Ayrıca kemoterapötik ilaçlara dirençli olsa bile, tümör hücrelerini hedeflenmiş tedavi ajanlarına duyarlı hale getirebilir.

Yapılan bazı çalışmalar, kurkuminin PI3K/AKT, MAPK ve nükleer faktör (NF)-κB dahil olmak üzere çoklu sinyal yollarını düzenleyebileceğini de göstermiştir (Nagaraju ve diğerleri, 2012; Kunnumakkara ve diğerleri, 2017; Tomeh ve diğerleri, 2019).

Meme kanseri hücre dizilerinde, kurkumin apoptotik ve enflamatuar yolaklarda yer alan proteinlerin değişmesi üzerinde tamamlayıcı etkiler gösterir (Quispe-Soto ve diğerleri, 2016). Kurkuminin endotelial büyüme faktörü reseptör yıkımını indüklediği ve akciğer kanseri hücre hatlarında ve ksenograft fare modellerinde antitümör aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir; ilgi çekici bir şekilde, gastrointestinal yan etkileri de azaltmıştır. Ek olarak, kurkuminin meme kanseri hücrelerinin epitelyal-mezenkimal geçişini (EMT) inhibe etkisi de tespit edilmiştir. (Lee ve diğerleri, 2011; Hu ve diğerleri, 2019)

Bu alışma ile, kurkumin gibi fitoterapotik ajanlarla, düşük dozda kemoterapi ilaçlarının kombinasyonel tedavisiyle, gelecekte detaylı bir klinik araştırma sonucu meme kanserli hastalar için iyi bir yaşam kalitesi sunarak minimum yan etkilerle birlikte maksimum terapötik etkinlik sağlamak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, vücuttaki anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve çoğalmasdır. Kanser, vücudun normal kontrol mekanizması çalışmayı bıraktığında gelişir. Eski hücreler ölmez ve bunun yerine kontrolden çıkıp yeni, anormal hücreler oluşturur. Bu hücreler, tümör adı verilen bir doku kütleli oluşturabilir. Ancak lösemi gibi bazı kanser türleri tümör oluşturmaz.

Kanser terimi, Yunan fizikçi Hippocrates (MÖ 460-370) tarafından oluşturulmuştur. Ülser oluşturan tümörler için Hippocrates carcinos, oluşturmayanlar için carcinoma terimlerini kullanmıştır.

Çok hücreli canlılarda kanserin varlığı 200 milyon yıldan fazla bir süredir bilinmektedir. Modern insanın atalarında ise bir milyon yıldan fazla süredir kanserlerin kanıtı saptanmıştır. Bulaşıcı hastalıkların aksine kanser, geçici olarak ortaya çıkmaz.

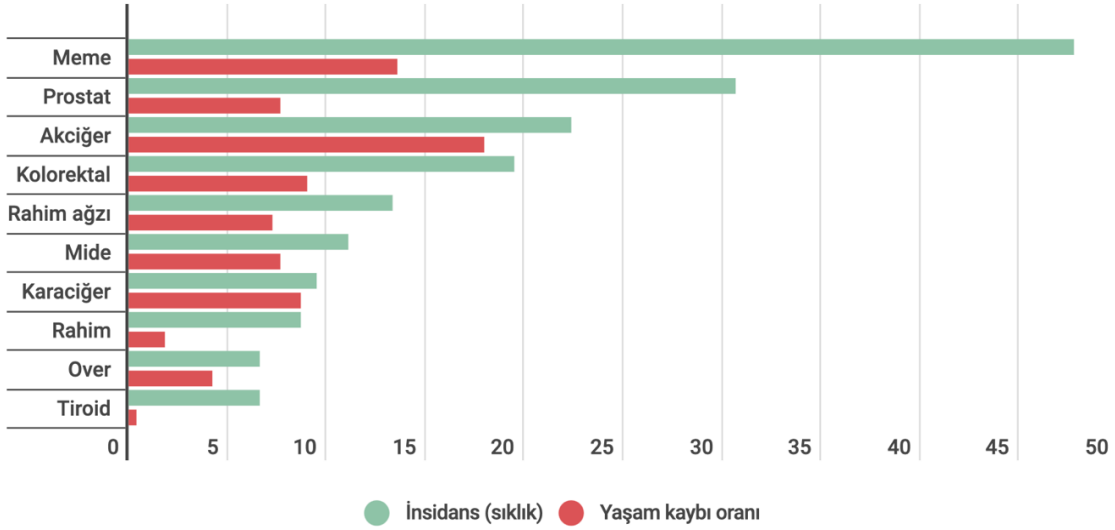
Kanser vücudun herhangi bir bölümünde meydana gelebilir. Kadınlarda ve erkeklerde görülen kanser türleri farklıdır. Erkeklerde prostat kanseri yaygın görülür. Akciğer kanseri ve kolorektal kanser ise hem erkekleri hem de kadınları büyük ölçüde etkilemektedir. Kadınlarda ise en yaygın olarak bilinen kanser meme kanseridir, nadir olarak erkeklerde de görülmektedir.

2.1.1. Kanser Epidemiyolojisi

Son 50 yılda, tüm dünyada kanser insidansı önemli ölçüde artmıştır. Düşük ve orta kaynaklı ülkeler, yüksek kaynaklara sahip ülkelere göre muhtemelen kanserden daha fazla etkileniyor (Donepudi ve diğerleri, 2014).

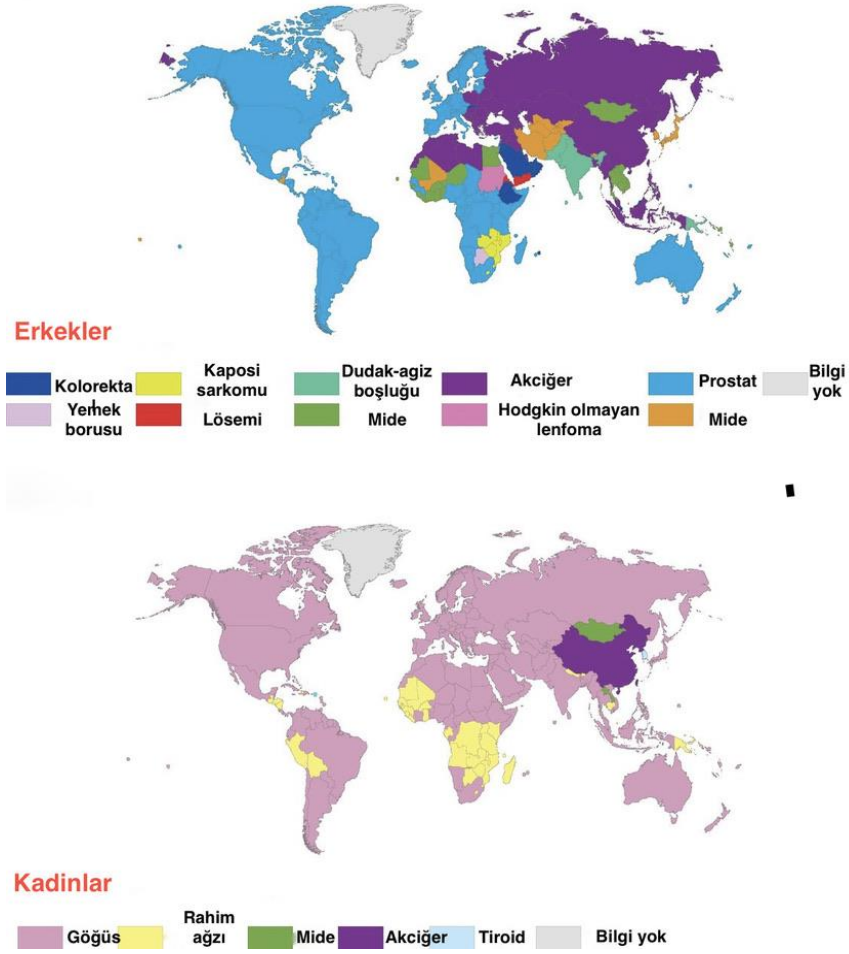
Dünyada 2020 yılında küresel çapta 50,6 milyon kanser hastası yaşadığı, yeni vaka sayısının (insidans) ise 19,3 milyon olduğu ve kanser nedeniyle 10 milyon kişinin hayatını kaybettiği bildirilmiştir (GLOBOCAN, 2020). Ayrıca her 5 kişiden birine yaşamının bir döneminde kanser tanısı konulmuş her 8 erkekten ve her 11 kadından 1'i kansere bağlı olarak yaşamını kaybetmiştir (GLOBOCAN, 2020). Nüfusun artmasıyla birlikte küresel kanser yükü

zamanla artma eğilimindedir. Yaşlanma, gelecekteki kanser yükü için en önemli sorunu oluşturmaktadır. Son 50 yıla ait verilere göre, kanser insidans oranının yıldan yıla sürekli olarak arttığını görülmektedir. 2040 yılına kadar insidans oranının 30,2 milyon olması ve bir yılda 16,3 milyon kanser ölümünün gerçekleşmesi beklenebilir (GLOBOCAN, 2020).



Her 100 bin kişi başına yıllık yeni etkilenen kişi sayısı ("yeşil" vaka, "kırmızı" yaşam kaybı oranı)

Şekil 1. Dünyada 2020’de farklı kanser türlerinin yasa göre standartlaştırılmış insidans oranları, her iki cinsiyet, her yas (GLOBOCAN, 2020 verilerine göre uyarlanmıştır.).



Şekil 2. En fazla teşhis konulan kanser tiplerinin bölgesel dağılımları (GLOBOCAN, 2020 verilerine göre uyarlanmıştır.).

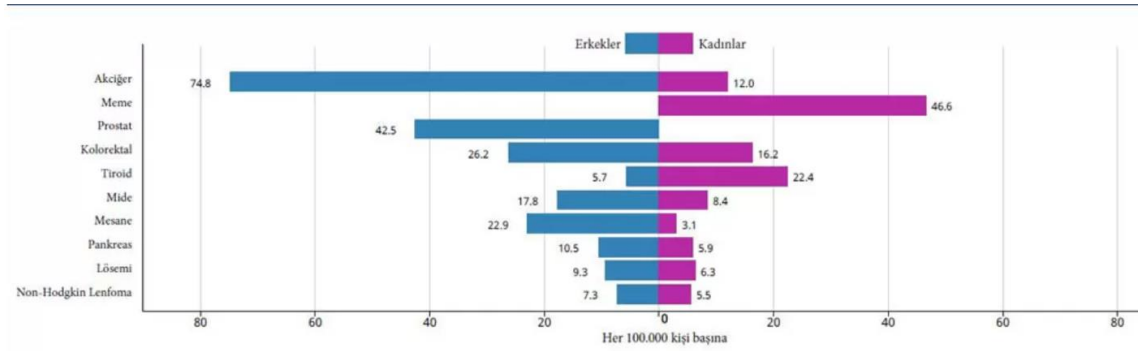
Farklı kanser türleri arasında meme kanseri, heterojen ve hormona bağımlı bir kanserdir ve gelişmekte olan ülkelerdeki kadınlarda teşhis edilen en yaygın kanser türüdür. Yaklaşık sekiz kadından biri, her 1000 erkekten biri yaşamları boyunca invaziv meme kanseri geliştirecektir (Gukalp ve diğerleri, 2019).

Erkek meme kanseri nadirdir, erkeklerde meydana gelen kanserlerin yaklaşık olarak %1'ini ve dünya çapındaki tüm göğüs kanserlerin yaklaşık %1'ini temsil eder. Erkeklerde kansere bağlı ölümlerin %0,2'den azı erkek göğüs kanserine atfedilebilir (Gukalp ve diğerleri, 2019).

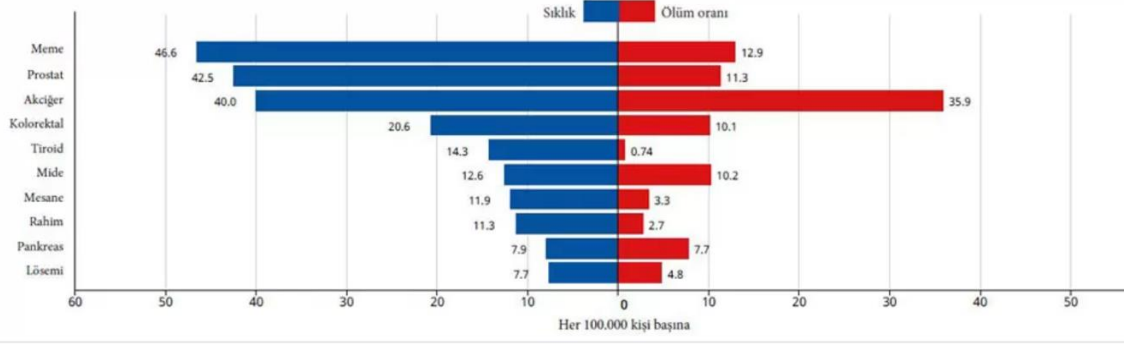
Tablo 1. Türkiye kanser istatistikleri, 2020 (GLOBOCAN, 2020 verilerine göre uyarlanmıştır.).

	Erkekler	Kadınlar	Her iki cinsiyet
Toplum	41 636 125	42 702 942	84 339 067
Yeni vaka sayısı	132 816	101 018	233 834
Yaşa göre standardize edilmiş her 100 bin kişide yeni vaka sayısı	291.5	188.0	231.5
75 yaşından önce kanser geliştirme riski (%)	29.2	18.4	23.3
Kansere bağlı yaşam kayıplarının sayısı	78 949	47 386	126 335
Yaşa göre standardize er 100 bin kişide yeni yıllık yeni kanser ölümü sayısı	171.6	81.4	120.4
75 yaşından önce kansere bağlı yaşam kaybı riski (%)	18.2	8.6	13.0
5-yıllık aktif vaka sayısı	300 071	281 565	581 636
Melanom dışı cilt kanseri hariç en sık görülen 5 kanser (vakalara göre sıralanmıştır)	Akciğer	Meme	Akciğer
	Prostat	Tiroid	Meme
	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal
	Mesane	Akciğer	Prostat
	Mide	Rahim	Tiroid

Türkiye’de ise tablo 1’deki grafikte de görüldüğü gibi erkeklerde en yaygın görülen kanser tipi akciğer, kadınlarda ise dünya genelinde de olduğu gibi meme kanseridir.



Şekil 3. Türkiye’de en sık görülen kanser tiplerinin kadın ve erkeklerde yaşa göre standartlaştırılmış insidans oranları (GLOBOCAN, 2020 verilerine göre uyarlanmıştır.)



Şekil 4. Türkiye’de en sık görülen kanser tiplerinin kadın ve erkeklerde yaşa göre standartlaştırılmış ölüm oranları (GLOBOCAN, 2020 verilerine göre uyarlanmıştır).

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, metastatik bir kanser türüdür ve genellikle kemik, karaciğer, akciğer, beyin gibi uzak organlara metastaz yapabilir, tam olarak tedavi edilememesi buna neden olmaktadır. Hastalığın erken teşhisi, iyi bir prognoz ve yüksek bir hayatta kalma oranı sağlayabilir (Sun ve diğerleri, 2017).

Meme kanseri kadınlarda en sık teşhis edilen kanserdir ve kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenleri arasında birinci sırada yer almaktadır. Literatürdeki kanıtlar, geçmişte ve devam etmekte olan araştırmaların meme kanserinde klinik sonucu iyileştirmede muazzam bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu, meme kanseri yönetiminde yer alan tarama, tanı ve terapötik stratejiler alanında kaydedilen ilerlemeye bağlanmıştır. Buna karşın az gelişmiş ülkelerde yetersiz veya yanlış tanı ve ilaç direncinin artmasına paralel meme kanserine bağlı ölümlerde artış devam etmektedir (Fahad ve diğerleri, 2019).

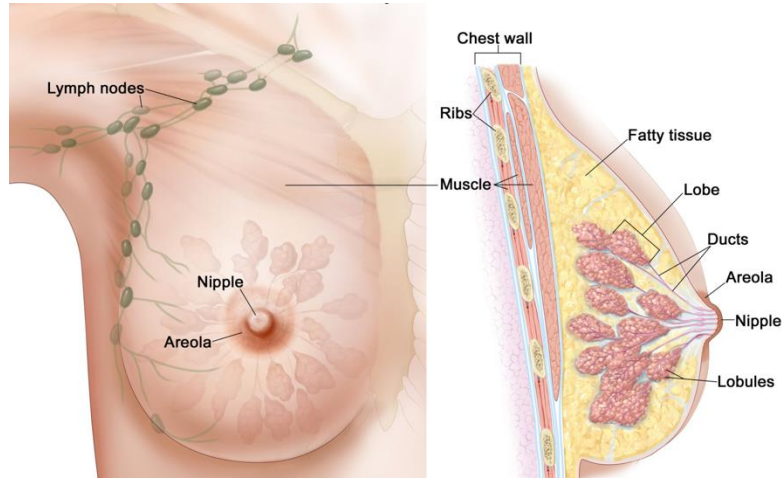
2.2.1. Meme Kanseri Yerleşim Yeri ve Histolojik Tipleri

Meme kanserinde tümörün lokasyonunu belirlemek, tümör yerleşim yerinin lenf nodu metastazının ortaya çıkma şeklini etkilediği için oldukça önem taşımaktadır (Crum ve diğerleri, 2003).

Hem erkeklerin hem de kadınların göğüsleri vardır (Torre ve diğerleri, 2016). Meme, yağ dokusundan oluşur (Aronson ve diğerleri, 2000). Dişilerin göğüsleri genellikle

erkeklerinkinden daha fazla glandüler doku içerir (Stark ve diğerleri, 1992). Kadın göğüsleri, daha küçük lobüllere ayrılan 12-20 lob içerir (Tanis ve diğerleri, 2001). Bu loblar ve lobüller süt kanalları ile birbirine bağlanır. Memenin yağ dokusu, sinirler, kan damarları, lenf damarları, lenf düğümleri ağı tarafından sağlanır ve ayrıca fibröz bağ dokusu ve bağlardan oluşur (Thomsen ve diğerleri, 1998).

Meme kanseri sol memede sağ memeye göre biraz daha sık görülür. Genelde meme kanseri hastalarının %4'ünde iki taraflı birincil tümörler tespit edilir ya da sonradan ikinci bir tümör gelişir. Meme kanserlerinin yaklaşık olarak %50'si üst dış kadranda oluşur. Diğer kadrantların her birinde ise %10 oranında görülür.



Şekil 5. Memenin ve lenf nodlarının anatomisi (National Cancer Institute, 2021).

En yaygın meme kanseri türleri:

1. İnvaziv duktal karsinom: Kanser hücreleri kanalların dışında meme dokusunun diğer kısımlarına doğru büyür. İstilacı kanser hücreleri ayrıca vücudun diğer bölgelerine yayılabilir veya metastaz yapabilir. Diğer meme kanseri türlerinden daha sık her iki memede bulunur.

2. İnvaziv lobüler karsinom: Kanser hücreleri lobüllerden yakındaki meme dokularına yayılır. Bu istilacı kanser hücreleri vücudun diğer bölgelerine de yayılabilir. Ayrıca, Paget hastalığı, dış ikon medüller, müsinöz ve inflamatuvar meme kanseri gibi daha az yaygın olan birkaç meme kanseri türü de bulunmaktadır.

Duktal karsinoma in situ (DCIS), hücrelerin kanser hücresine dönüştüğü, ancak mukoza tabakasının içinde sınırlı kaldığı, henüz hiçbir yere yayılmadığı durumu tanımlamaktadır.

2.2.2. Meme Kanseri Tanı Yöntemleri

1. Kendi kendine muayene: Kadınların memelerinin normalde nasıl görüldüğünü ve nasıl hissettiğini bilmeleri göğüs sağlığının önemli bir parçasıdır.

2. Görüntüleme yöntemleri: Ultrasonografi, Mammografi ve MR. Meme kanserinde düzenli tarama, mamografi incelemesinin 40 yaşından itibaren her yıl yaptırılmasıyla olur. Hiçbir şikâyeti olmayan kadınlara 40 yaşından itibaren her yıl yapılan mamografiye tarama mamografisi denir.

Ancak, mamografi her meme kanserini bulamayabilir. Bu nedenle kadınların kendi kendilerini düzenli aralıklarla muayene etmeleri oldukça önemlidir.

Meme kanserlerinin tanısında klinik, görüntüleme ve patolojik yaklaşımların birlikte değerlendirilmesi meme kanserinin erken teşhisi açısından çok önemlidir (Harris ve diğerleri, 1992).

Meme kanserindeki klinik bulgular:

Meme kanserinin en sık görülen semptomu yeni bir yumru veya kitledir. Düzensiz kenarları olan ağrısız, sert bir kitlenin kanser olma olasılığı daha yüksektir, ancak meme kanserleri hassas, yumuşak veya yuvarlak olabilir. Hatta acı verici olabilirler. Bu nedenle, herhangi bir yeni meme kitlesi, yumru veya meme değişikliğinin deneyimli bir sağlık uzmanı tarafından kontrol edilmesi önemlidir (Morrow, 2014; Henry, 2020).

Meme kanserinin diğer olası belirtileri şunlardır:

Bir memenin tamamının veya bir kısmının şişmesi (hiçbir yumru hissedilmeseye bile görülebilir)

Ciltte çukurlaşma (bazen portakal kabuğu gibi görünmektedir)

Meme veya meme başı ağrısı

Meme ucunun geri çekilmesi (içe dönme)

Kırmızı, kuru, pullanan veya kalınlaşmış meme ucu veya meme derisi

Meme başı akıntısı (anne sütü dışında)

Şişmiş lenf düğümleri (Bazen bir meme kanseri, kol altındaki veya köprücük kemiği çevresindeki lenf bezlerine yayılabilir ve memedeki orijinal tümör hissedilecek kadar büyük

olmadan önce bile orada bir yumru veya şişmeye neden olabilir (National Cancer Institute, 2021)

Görüntüleme:

Tarama testleri, herhangi bir semptom ortaya çıkmadan önce meme kanserini erken tespit etmeye yardımcı olabilir. Meme kanserinin erken teşhisi başarılı bir tedavi şansını da beraberinde getirebilir. Bu yüzden memenin mamografi ile taranması meme kanseri tanısında oldukça önemlidir. Tanıda mamografinin yanında diğer bir görüntüleme yöntemi olan ultrasonografiden de yararlanır. Bazı merkezlerde ek olarak manyetik rezonans görüntüleme yöntemine de (MR) başvurulmaktadır (Harris ve diğerleri, 1992).

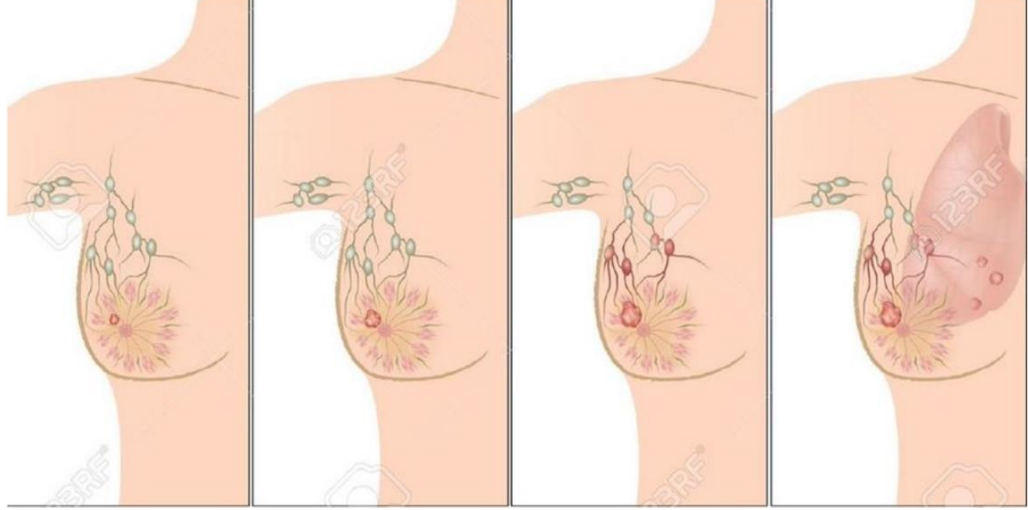
Biyopsi (Patoloji):

Bir doku örneğinin mikroskopik incelenmesi meme kitlesinin değerlendirilmesinde kesin sonuç verir (Harris ve diğerleri, 1992).

2.2.3. Meme Kanseri Evreleri

Evreleme sistemlerinin, hasta gruplarını farklı prognostik kategorilere ayırarak hasta gruplarının, klinik araştırma sonuçlarının ve terapötik sonuçların daha kesin bir şekilde karşılaştırılmasına olanak tanıdığı bilinmektedir.

Malign hastalıkların klinik ilerleyişini modüle eden biyolojik faktörlerin yaygınlaşan anlayışı, biyolojik belirteçlerin evreleme sınıflandırmalarına kademeli olarak entegrasyonuna yol açmıştır (Hortobagyi ve diğerleri, 2018).



Şekil 6. Meme kanseri evreleri. (Siddique, 2017) Resimler soldan sağa sırasıyla 1, 2, 3 ve 4. kanser evrelerini tasvir eder.

Göğüs kanseri.org raporuna göre meme kanserinin evreleri, tümörün boyutuna ve tipine ve tümör hücrelerinin meme dokularına ne kadar nüfuz ettiğine bağlıdır (Heim ve diğerleri, 1997) invaziv olmayanı tanımlar ve evre 4, invaziv tümör türünü tanımlar. Bu tümör evrelerinin açıklamaları şunlardır:

Evre 0; bu hem kanserli hem de kanserli olmayan hücrelerin, tümörün büyümeye başladığı meme bölümünün sınırları içinde olduğunu ve o bölümü çevreleyen dokularda istilalarına dair hiçbir kanıt bulunmadığını gösteren tümörün invazif olmayan aşamasıdır. Bu tümör evresinin örneği duktal hücreli karsinoma in situ'dur (DCIS) (Bednarek ve diğerleri, 1997).

Evre I; Bu aşama invaziv meme karsinomu olarak tanımlanır ve bu aşamada mikroskobik invazyon mümkündür. IA ve IB aşaması olmak üzere iki kategorisi vardır. Kategori IA, 2 cm'ye kadar olan tümörü tanımlar ve hiçbir lenf nodu dahil değildir; Evre IB, lenf nodunda 0,2 mm'den daha büyük olan küçük bir kanser hücresi grubunu tanımlar (Segal ve diğerleri, 2001).

Evre II; IIA ve IIB olmak üzere iki kategoriye sahiptir. Evre IIA, tümörün lenf düğümlerinde bulunduğunu ancak memede tümör bulunmadığını açıklar. Tümör 2 cm'den küçük veya büyük olabilir, ancak 5 cm'den fazla olamaz. Ancak evre IIB, tümörün 5 cm'den büyük olabileceğini ancak lenf düğümlerine ulaşamayacağını açıklar (Moran ve diğerleri, 2014).

Evre III; IIIA, IIIB ve IIIC olmak üzere üç alt kategoriye ayrılmıştır. Evre IIIA, memede tümör bulunmadığını ancak lenf düğümlerinde bulunabileceğini tanımlarken, evre IIIB tümörün herhangi bir boyutta olabileceğini ancak ciltte şişme veya ülser nedeniyle olduğunu tanımlar. Evre IIIB, memenin kırmızı, sıcak ve şiş derisini içeren inflamatuvar meme kanseri olarak kabul edilebilir. Ancak evre IIIC, tümörün lenf noduna yayılmasını tanımlar (Jacquillat ve diğerleri, 1990).

Evre IV; meme kanseri, kanserin memenin ötesine, akciğerler, karaciğer, beyin ve kemikler gibi vücudun diğer bölgelerine yayıldığını gösterir (uzak metastaz). Bu, Meme Kanserinin en gelişmiş şeklidir (Neuman ve diğerleri, 2015).

2.2.4. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Kadınlarda meme kanserinin genel risk faktörleri yaş, kısırlık, ilk gebeliğin yaşı, menopoz yaşı, BRCA1 / BRCA2 meme kanseri geninde kalıtsal bir mutasyon ve menopoz sonrası dönemde hormonların (östrojen ve / veya progesteron) kullanımınıdır (Donepudi ve diğerleri, 2014).

En önemli risk faktörleri; genetik yatkınlık, östrojenlere maruz kalma [uzun süreli hormon replasman tedavisi (HRT) dahil endojen ve eksojen], iyonlaştırıcı radyasyon, düşük parite, yüksek meme yoğunluğu ve atipik hiperplazi öyküsü olarak bildirilmiştir. Batı tarzı diyet, obezite ve alkol tüketimi de meme kanseri insidansının artmasına katkıda bulunmaktadır (McTiernan, 2003).

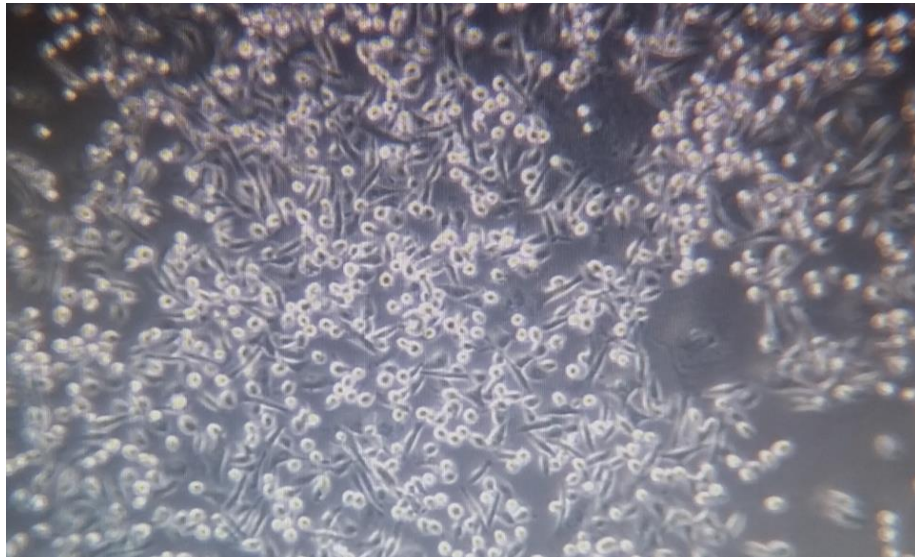
Hücre döngüsü kontrolündeki genler, kansere neden olan genetik değişikliklere maruz kalanlar içinde öneme sahiptir (Donepudi ve diğerleri, 2014). Kanseri gelişimi veya karsinogenez mekanizması, hücre sayısındaki artışla yakından ilişkilidir, hücre çoğalmasını düzenleyen mekanizmalardaki değişiklikler, kanser mekanizmalarının sadece bir yönüdür. Azalmış hücre ölümü veya apoptoz oranı da belirli kanser türlerine katkıda bulunur. Kanseri, çevresindeki dokuları istila etme yeteneği nedeniyle tümör oluşturan diğer süreçlerden farklıdır. Tümör oluşumu, çok adımlı bir süreçtir. Hücre büyümesini kontrol eden, programlanmış hücre ölümüne duyarlılığı düzenleyen ve genetik stabiliteyi koruyan genlerin aktivitelerini düzensizleştiren genetik mutasyonlar tümör oluşumuna yol açabilir.

2.2.5. MDA-MB-231 Hücre Hattı

MDA-MB-231 hücreleri ilk kez metastatik meme kanseri olan 51 yaşında beyaz etnik kökene sahip bir kadının plevral efüzyonlu metastatik bölgesinden türetilmiştir. Hücre hattı anöloid dışıdır (modal sayı = 64, aralık = 52-68), kromozom sayıları triploide yakın aralıktadır; normal kromozomlar N8 ve N15 yoktur. Epitelyal morfolojiye sahip uçlu negatif meme kanseri türüdür.

Polifenoller (örneğin kurkumin, resveratrol), epigallocatechin gallate [EGCG]) veya izotiyosiyanat (örneğin sülforafan [SFN]) gibi diyetle alınan biyoaktif bileşiklerin, histon asetilasyonunu düzenleyebileceği bildirilmiştir (Gianfredi ve diğerleri, 2017).

Bu hücre hattında yapılan araştırmalarda (az veya ihmal edilebilir yan etkilerle) diyet biyoaktif bileşiklerinin, özellikle düşük dozlarda ve fizyolojik konsantrasyonlarda, detoksifikasyon enzimlerini baskılayarak ve hücre döngüsü durmasını kolaylaştırarak, apoptozu indükleyerek ayrıca hücre proliferasyonu inhibe ederek kemopreventif etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Gianfredi ve diğerleri, 2017; Mohammed ve diğerleri, 2020)



Resim 1. MDA-MB-231 hücrelerinin invert mikroskopda görünüşü (x40).

2.3. Kurkumin

Diferuloilmetan olarak da adlandırılan kurkumin [1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion], *Curcuma longa*'nın (zerdeçal) diğer *Curcuma* spp.'lerin köksapında bulunan temel doğal bir polifenoldür (Pulido ve diğerleri, 2016). Zerdeçal koku ve toz baharat hali Resim 2 de gösterilmektedir.



Resim 2. Zerdeçal kökü ve toz baharat hali.

Zerdeçal, antioksidan, antiinflamatuvar, antimitojenik, antimikrobiyal, antimalaryal, nöroprotektif ve antikanser özellikleri nedeniyle Asya ülkelerinde geleneksel olarak, Ayurveda tıbbında, çeşitli patolojiler için tıbbi bir bitki olarak kullanılmıştır (Pulido ve diğerleri, 2016; Ruiz de Porras ve diğerleri, 2021). Bu özelliklerinden ötürü son yirmi yıldır birçok prelinik ve klinik çalışmanın odağında olmuştur. (Aravind, ve diğerleri, 2021; Bahrami ve diğerleri, 2021; Cai ve diğerleri, 2021; Hardwick ve diğerleri, 2021; Mahmoudi ve diğerleri, 2021; Mirzaei ve diğerleri, 2021; Pandya ve diğerleri, 2021; Yao ve diğerleri, 2021)

Kimyasal olarak kurkumin, karakteristik yoğun sarı renkten sorumlu doğal kökenli fenoller olan kurkuminoidler grubuna ait bir diarilheptanoiddir. Kurkumin, bağ oluşumu nedeniyle polar olmayan çözücülerde çözüldüğünde enol formunda bulunan totomerik bir bileşiktir. Molekül içi hidrojen ve polar çözücülerde çözüldüğünde keto formunda bulunur (Manolova ve diğerleri, 2014).

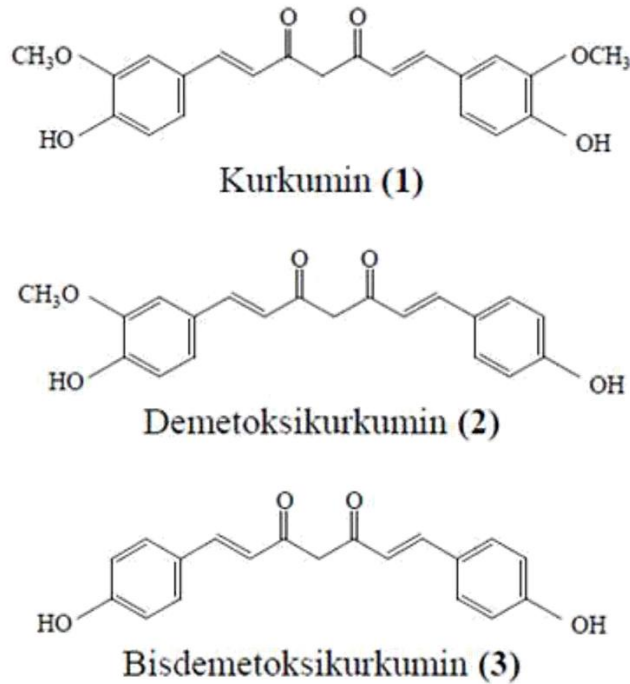
Son 50 yılda, zerdeçalın etkilerinin çoğunun esas olarak kurkuminden kaynaklandığı ve diyabet, alerji, artrit, Alzheimer hastalığı ve diğer kronik hastalıklara karşı potansiyel etkileri olduğu kanıtlanmıştır (Pulido ve diğerleri, 2016).

Zerdeçalın içeriğinde kurkuminin yansira demetoksikurkumin ve bisdemetoksikurkumin bileşiklerinden oluşan kurkuminoidler grubunu barındırır.

Kurkumin, kurkuminoidler grubunun en bol bulunanıdır (toplam ağırlığın %77'si) ve bu grup, zerdeçalın toplam bileşeninin yaklaşık %5'ini oluşturur.

Yapılan bazı çalışmalara göre kurkuminin fenil halkalarında bulunan metoksi gruplarının varlığı, sağlık etkilerini en önemli kılmaktadır (Pulido ve diğerleri, 2016).

Kurkuminoidlerin kimyasal formülleri aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 7. Kurkuminoidlerin kimyasal yapısı.

2.3.1. Kurkumin Biyoyararlanımı ve Metabolizması

Kurkumin kan dolaşımınıza zayıf bir şekilde emilir. Kurkuminin tüm etkilerini deneyimlemek için biyoyararlanımının iyileştirilmesi gerekir (He ve diğerleri, 2015)

İçinde piperin bulunan karabiber ile tüketilmesi, kurkumin emilimini %2.000 oranında arttırdığı tespit edilmiştir (Shoba ve diğerleri, 1998).

Sıçanlarla yapılan bazı çalışmalar, kurkuminin oral biyoyararlanımının %1 civarında olduğunu göstermiştir (Yang ve diğerleri, 2007), bu nedenle herhangi bir yararlı sonuç elde etmek için çok yüksek dozlarda kurkumin (3600 ila 12.000 ml) gereklidir.

Bazı çalışmalar, kurkuminin, bağırsaktan tetrahidrokurkumin ve heksahidrokurkumin türevlerinin glukuronidlerine emilim sırasında bir biyotransformasyona uğradığını göstermiştir.

Kurkumin metabolitlerinin doğasını belirlemek için karaciğerde başka bir çalışma yapılmış ve sonuç olarak kurkuminin redüktazlar tarafından önce dihidrokurkumin ve tetrahidrokurkumin'e dönüştürüldüğünü ve daha sonra β -glukuronidaz tarafından dihidrokurkumin-glukuronid ve tetrahidrokurkumin-glukuronid olarak monoglukuronid konjugatlarına dönüştürüldüğünü tespit edilmiştir (Pulido ve diğerleri, 2016).

2.3.2. Kurkuminin Antikanser Etkileri

Kurkuminin anti-tümör özellikleri ile ilgili, hayvanlarda ve hücre hatlarında birçok çalışma yapılmıştır (Tomeh ve ark, 2019). İnsan lösemi hücre tipleri (Aggarwal ve diğerleri, 2007) ve kanser hastalarında yapılan klinik çalışmalar da bulunmaktadır. Bunlardan sadece birkaçı kurkuminin anti-kanser potansiyelini tanımlamıştır ve birçoğu kurkuminin anti-tümör tedavisinde bir adjuvan olarak kapasitesini veya tedaviyle ilişkili yan etkilerin azaltılmasını araştırmıştır (Garcea ve diğerleri, 2005).

Kurkuminin bazı anti-kanser özelliklerinin, antioksidan aktivitelerinden kaynaklandığı da bildirilmiştir. Ayrıca kurkuminin Bcl-2, VCAM-1, Cyclin D1, Bax, NF- κ B, VEGF veya COX-2 gibi farklı gen ve proteinlerdeki etkileri, tümörün gelişimini engeller (Cheng ve diğerleri, 2001).

Kurkuminin mutajenez, hücre döngüsü regülasyonu, apoptoz ve onkogen ekspresyonu üzerindeki çoklu eylemler yoluyla anti-kanser etkilerini tanımlanmıştır (Hosseini ve Ghorbani, 2015). Bununla birlikte, kurkumin ayrıca anjiyogenez, istila, tümör büyümesi veya metastaz ile ilgili farklı yolları modüle edebilir ve p53, kaspaz ekspresyonu ve hücre döngüsü durmasını indükleyerek apoptozu teşvik edebilir (Pulido ve diğerleri, 2016).

Kurkuminin, PGP proteininin kemo ilacını hücre dışına itmesini ve ekspresyon aracısını (NF κ B adı verilen bir transkripsiyon faktörü) inhibe ederek kanser hücrelerinde PGP ekspresyon seviyelerini düşürmesini engellediği gösterilmiştir (Anuchapreeda ve diğerleri, 2002; Bentires-Alj ve diğerleri, 2003; Singh ve diğerleri, 1995). Kurkumin ile ilgili çelişkili yayınlar da bulunmaktadır. Kurkumin, oksidatif stresi ve tümörü beslemek için yeni kan akışının filizlenmesini engelleyerek kanser hücrelerinin hayatta kalması için mikro ortamın daha düşmanca olmasına yardımcı olabilir. Esasen, çok çeşitli kanser hücre dizilerinde ve hayvan tümör modellerinde kurkuminin spesifik kemoterapötik ilaçlarla kombinasyonunun etkinliği üzerine yapılan bir çalışmada, araştırmacılar kurkuminin kemoterapinin sitotoksik etkilerini, vücudun tüm aşamalarını hedef alan çoklu moleküler mekanizmalar yoluyla arttırdığını bulmuşlardır (Tan ve diğerleri, 2019).

Birkaç epidemiyolojik çalışma, inflamasyonun karsinogenez ile ilişkili en önemli risk faktörlerinden biri olduğunu belirlemiştir. Daha önce açıklandığı gibi, kurkumin, her iki moleküle ilgili farklı yolları etkileyebilir, ardından COX-2, lipoksijenaz 2 (LOX-2), iNOS ve bunlarla ilişkili sitokinler gibi farklı inflamatuvar mediatörlerin oluşumunu azaltabilir, dolayısıyla çeşitli kanser türlerinde karsinogenez sürecini önleyebilir (Aggarwal ve diğerleri, 2007).

Ek olarak, kurkumin JAK-STAT yolunu ve telomeraz aktivitesini inhibe ederek, sonunda tümör hücrelerinde hücre döngüsü ve apoptozun durdurulmasına neden olmaktadır (Pulido ve diğerleri, 2016).

Meme kanseri ile ilgili olarak, kurkumin, COX-1, COX-2, Bax ekspresyonu, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve telomeraz aktivitesinin inhibisyonu ile benzer sonuçlar göstermiştir. Kurkumin ayrıca NF- κ B'nin inhibisyonu yoluyla inflamatuvar sitokinler CXCL1 ve CXCL2'yi de aşağı regüle eder (Bachmeier ve diğerleri, 2008). Ayrıca birçok hücrel sinyal yollarını baskılayarak apoptozu indüklediği ve proliferasyonu baskıladığı gösterilmiştir (Tomeh ve diğerleri, 2019).

Kurkumin derivelerinin birçok kanser türünde etkili olduğuna dair klinik ve preklinik birçok çalışma yayınlanmıştır (Tomeh ve diğerleri, 2019).

2.4. Metotreksatın Antikanser Etkileri

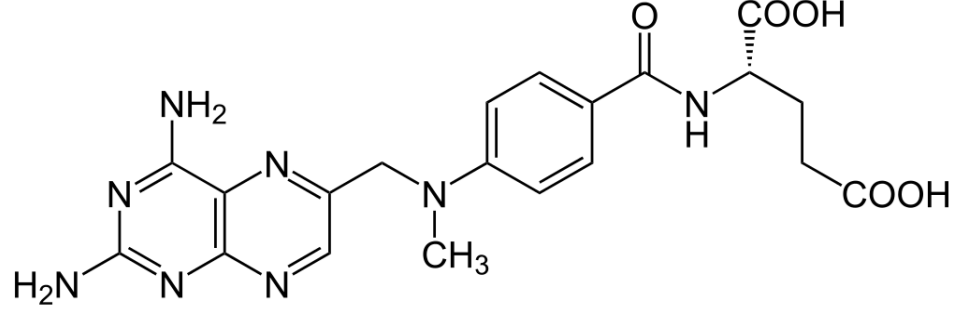
Metotreksat ilk olarak 1947 de, orijinal olarak kemoterapi için tek başına veya diğer ajanlarla kombinasyon halinde kullanılması amacıyla geliştirilmiştir ve hala günümüzde kullanılmaya devam edilmektedir. Daha sonra ilk kez 1956'da metastatik bir kanserin ilk tedavilerini sağlamıştır.

Bir sağlık sisteminde ihtiyaç duyulan en güvenli ve en etkili ilaçlar olan Dünya Sağlık Örgütü'nün Temel İlaçlar Listesi'nde de yer almaktadır.

Eskiden ametopterin olarak bilinen metotreksat (MTX), bir kemoterapi ajanı ve bağışıklık sistemi baskılayıcı olduğu bilinmektedir.

MTX, Kanser, otoimmün hastalıklar ve dış gebelik tedavisinde ve tıbbi düşüklerde kullanılmaktadır. Kullanıldığı kanser türleri arasında meme kanseri, lösemi, akciğer kanseri, lenfoma, mesane, gestasyonel trofoblastik hastalık ve osteosarkom bulunmaktadır. Hastalara ağız yoluyla veya enjeksiyon yoluyla verilebilir.

Başlangıçta mevcut tedavilerden daha az toksik olduğu için kanser tedavisinde kullanılmıştır ancak uzun süreli kullanımlarda birçok yan etkisi olduğu bildirilmiştir. Yaygın yan etkiler arasında mide bulantısı, yorgunluk hissi, ateş, enfeksiyon riskinde artış, düşük beyaz kan hücresi sayısı ve ağız içindeki derinin parçalanması yer almaktadır. Diğer yan etkiler arasında karaciğer hastalığı, akciğer hastalığı, lenfoma ve ciddi deri döküntüleri sayılabilir. Ayrıca emzirme dönemindeki kadınlar için güvenli olmadığı tespit edilmiştir. Özellikle böbrek sorunu olan hastalarda daha düşük dozlar gerekebileceği bildirilmiştir. Vücudun folik asit kullanımını bloke ederek etki eder (The American Society of Health-System Pharmacist, 2016).



Şekil 8. Metotreksatın kimyasal yapısı.

Sitotoksik ilaçlar sadece kanser hücrelerine karşı değil, sağlıklı bütün hücreleri de etkilediği için toksik etkiler içerdiği bilinmektedir.

Metotreksat, folik asit metabolizmasına müdahale eden bir antimetabolittir. Hücreye girdikten sonra metotreksat poliglutamatlanır, dihidrofolat redüktaza (DHFR) folatunkinden 1000 kat daha fazla afinite ile bağlanır ve dihidrofolatın tetrahidrofolata dönüşümünü yarışmalı olarak inhibe eder. Tetrahidrofolat, DNA sentezi için gerekli olan timidin ve pürinlerin biyosentezi için gereklidir (Howard ve diğerleri, 2016).

Metotreksat tarafından tetrahidrofolat sentezinin bloke edilmesi, hücrelerin bölünememesine ve protein üretememesine yol açar (Howard ve diğerleri, 2016).

MTX hücrelere RFC yoluyla girdikten sonra poliglutamatlanır, daha sonra DHFR'nin aktivitesini rekabetçi ve geri dönüşümlü olarak inhibe eder, böylece FH2'den FH4 oluşumunu önler (Howard ve diğerleri, 2016).

FH4 eksikliği DNA, RNA ve protein sentezini inhibe eder. LV, hücrelere RFC yoluyla girer ve MTX'in varlığına rağmen FH4 oluşumuna izin verir, bu da hücreleri etkin bir şekilde kurtarır. Bununla birlikte, MTX eliminasyonu bozulduğunda ve çok yüksek konsantrasyonlarda mevcut olduğunda, hücreleri MTX toksisitesinden kurtarmak için yeterli miktarda girişe izin vermek için çok yüksek dozlarda LV gereklidir. Glukarpidaz, hücre dışı MTX'i toksik olmayan DAMPA'ya dönüştürerek ortadan kaldırır ve bu nedenle, glukarpidaz hücre içi MTX'in hücre dışı bölmeden uzaklaştırarak daha fazla birikmesini engellese bile, hücre içi kurtarma sağlamak için her zaman LV ile verilmelidir (Howard ve diğerleri, 2016).

2.5. Apoptozis

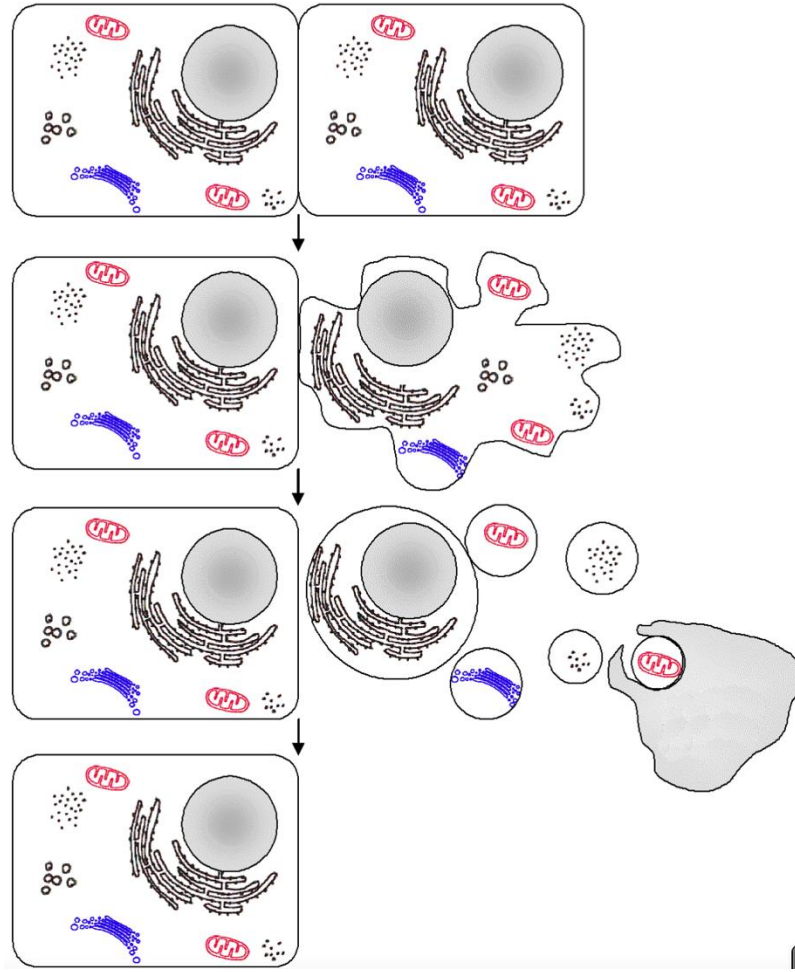
“Apoptoz” terimi, programlanmış hücre ölümü ile eşanlamli olarak uzun süredir kullanılmaktadır (Kerr ve diğçerleri, 1972). Apoptoz veya tip 1 hücre ölümü, çok hücreli organizmaların hücreleri için önemli bir terminal yoldur ve enfekte olmuş hücreleri uzaklaştırmak için koruyucu bir strateji olarak çoğalma/homeostaz, farklılaşma, gelişme ve zararlı hücrelerin yok edilmesi gibi çeşitli biyolojik olaylara neden olur (Elmore, 2007).

Apoptoz, insidansı, morfolojisi ve biyokimyasına dayalı olarak diğçer hücre ölümü türlerinden temel olarak farklıdır. Bu tip, hücrenel zarar sonucu olan hücre ölümü tipi nekrozdan farklı olarak apoptoz belirli bir moleküler işlemler serisinin (sırasının) sonunda hücrenin ölümünü sağlar ve aynı zamanda organizmanın yaşam döngüsü için gerekli ve yararlıdır. Embrionik gelişim evresinde parmakların farklılaşması, parmaklar arasındaki hücrelerin apoptoz başlatması ile sağlanır. Nekrozdan farklı olarak, apoptozu uğrayan bir hücre küçölerek ölür. Evrimsel açıdan insandan nematoda kadar tüm canlılarda korunmuş bir programlanmış hücre ölüm mekanizmasından, yani apoptozdan söz etmek mümkündür.

Apoptotik hücrelerin özel morfolojik değışiklikleri arasında nükleer yoğunlaşma ve parçalanma, hücre büzölmesi, dinamik membran kabarması ve hücre dışı matrislere veya komşulara yapışma kaybı yer alır. Biyokimyasal değışiklikler, kromozomal DNA'nın internükleozomal parçalara bölünmesi, fosfatidilserin dışsallaşması ve kaspazlar olarak tanınan bir proteaz ailesinin aktivasyonundan oluşur (Ouyang ve diğçerleri, 2012).

Apoptoz sinyali alan bir hücrenin kromatini yoğunlaşmaya başlar. Benzer bir şekilde sitoplazma da yoğunlaşır ve hücrenin boyutları küçölmeye başlar, hücre zarı bozulmaz. Bir süre sonra hücre apoptotik cisimcik olarak adlandırılan daha küçük parçalara bölünür. Bu parçalara apoptotik cisimcikler de denilir. Apoptotik cisimcikler; yüzeylerinde yeni sinyal verici yapıları ortaya çıkarır ve bu sinyalin uyarısı ile yakınlarındaki hücre tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır.

Küçük parçalara ayrılan ve hızla fagosite edilen ölü hücre çevre dokularda nekrozdan farklı olarak yangısal tepkiye neden olmaz. Nekrozda hücre membranı bozulur, hücre dışına çıkan maddeler yangısal tepki uyandırır ve nekrotik hücreler fagositlerin ürettiğı enzimlerle eritilirler (Wyllie ve diğçerleri, 1980). Aşağıdaki Şekil 9'de apoptoz geçiren bir hücre evreleri yer almaktadır.



Şekil 9. Apoptoz geçiren bir hücrenin evreleri.

Apoptozun küçük bir işlev bozukluğu, insanlarda kanser gibi çeşitli patolojik bozukluklarla sonuçlanır (Sun ve Peng, 2009). Apoptoz, farklı yürütücü ve düzenleyici molekül grupları tarafından düzenlenen hücresel bir süreçtir ve bunların anormal işlevi, tümörlerin büyümesi ve antikanser ilaç direncinin gelişimi açısından önemlidir.

Apoptozun fizyolojik mekanizmalarındaki kusurlar, kanser gibi farklı insan hastalıklarına katkıda bulunabilir. Apoptoz mekanizmalarının ve efektör proteinlerinin yanı sıra apoptozdan sorumlu genlerin tanımlanması, kanser hücrelerinin apoptoza girme duyarlılığını artırabilen veya apoptotik eşiklerini sıfırlayabilen yeni ajanları keşfetmek ve geliştirmek için yeni bir fırsat sağlamıştır. Bu yeni hedefli terapiler, anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerini, p53'ü, dış yolu, FLICE-inhibitör proteini (c-FLIP), apoptoz inhibitörü (IAP) proteinlerini ve kaspazları hedefleyenleri içerdiği düşünülmektedir (Goldar ve diğerleri, 2015)

Bu nedenlerle apoptoz, günümüzde özellikle kanser gibi hastalıklara yönelik ilaç keşfi ve geliştirilmesi için başlıca moleküler hedeflerden biri haline gelmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hücre Hattı

Deneyde kullanılan MDA-MB-231 hücre hatları ADÜ Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarında bulunan hücre stoklarından temin edilmiştir. Ticari olarak üretilmiş hücre hatları olduğundan dolayı herhangi bir etik kurul onayı gerekmemektedir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan hücre hattı ve özellikleri.

Özellikleri	
Hücre Adı	MDA-MB-231
ATCC® Kodu	HTB 26™
Büyüme Özelliği	Adherent (Yapışkan)
Organizma	Homo sapiens (İnsan)
Morfolojisi	Epitelyal
Doku	Meme Salgı Bezi
Hastalık	Adeno karsinoma
Hormon	(ER-, PR-, HER2-)

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddelerin ve laboratuvar malzemelerinin listesi.

Ürün	Firma
Fetal Bovine Serum, 100ml	Capricorn
DSMO for cell culture reagent, 100ml	Santacruz
L-glutamine, 200mM, 100ml	Capricorn
Trypsin-EDTA (%0,25), IX, 100ml	Multicell
Tyrpan Blue Solution 100ml for cell culture	Neofroxx
DMEM High Glucose, 500ml	Capricorn
Dulbecco's Phosphate Bufer Saline(DPBS) 500ml	GIBCO
Penisilin Streptomycin, 100ml	SIGMA
MDA-MB-231 Hücre Dizisi	Adü-Biltem
Steril 96 kuyucuklu mikroplate	SPL Life Science
Steril 6 kuyucuklu mikroplate	SPL Life Science

Ürün	Firma
Serolojik pipet 5ml, tek kullanımlık	Costar
Seroloji pipet 10ml, tek kullanımlık	Costar
T75 Hücre Kültür Flaskı (75cm ²)	SPL Life Science
15 ml'lik steril falkon	Ceen Follower
50 ml 'lik steril falkon	Ceen Follower
1,5 ml Eppendorf steril tüp kapaklı	Isolab
Petri disk, PP, 100 mm çap	NEST
Petri disk PP, 60mm çap	NEST
Pipet Ucu 1-200 µL	AHN Biotechnologie
Pipet Ucu 100-1000 µL	AHN Biotechnologie
WST-1 Cell Proliferation Kiti	Intronbio
Muse® Annexin V and Dead Cell Kit	Millipore
Methotrexate 25mg	Sigma
Curcumin 5gr	Sigma
Cell Scraper	Costar
Dört yönlü çalışma rack (1,5-5-15-50 ml) tüp sporu	Vwr
Cryogenic Vial	NEST
Serolojik Pipet Tabancası	Capp
25'lik steril flask	Corning Flask

3.1.1. Cihazlar

Tablo 4. Kullanılan cihazların listesi.

Ürün	Firma
Biyogüvenlik Kabini (2. seviye),	Biobase, BSC-130011AZ-X, Shondong, Çin
İnkübatör.	NUVE (EC160, Ankara, Türkiye)
İnvert Mikroskop	Olympus (IX51, Tokyo, Japonya)
Mikroplate Shaker (ısıtmalı)	Eksper (HT, İzmir, Türkiye)
Mikroplate Yıkayıcı	Eksper (İzmir, Türkiye)
Soğutmalı Santrifüj	NUVE (NF800, Ankara, Türkiye)
Soğutmalı Santrifüj (ependorf için)	Hettich (Micro 200 R, Kirchlengern, Almanya) UV-Visible Multiskan Spektrofotometre, BioTek Epoch (ABD)
-80 °C Dondurucu	Unifreez (U400, Kore)
-20 °C Dondurucu	Vestel (Türkiye)
pH Metre	Mettler Toledo (Seven compact, ABD)
Hassas Terazı	SHIMADZU (ATX224, Tokyo, Japonya)
Muse™ Cell analyzer and analyses software	(Merck Millipore, Darmstadt, Almanya)
Invert Mikroskop (kameralı)	ZEISS (AXIO, Oberkochen, Almanya)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücrelerin Çözdürülmesi

Bütün deneysel çalışmalar laminar-hava akışlı kabin içerisinde öncesinde ve sonrasında gerekli tüm sterilizasyon işlemleri uygulanarak yapılmıştır. Daha önceden dondurulmuş olan MDA-MB-231 hücre hattı sıvı azottan çıkarıldıktan sonra hızlı bir şekilde çözdürülüp üzerine taze besiyeri eklenerek 5 dakika 1100 rpm’de (200g) santrifüj edilmiştir (Russo ve ark, 1977). Santrifüj sonrası süpernatant atılmış, çöken hücre pelleti üzerine ise 1 ml yeni ortam besiyeri eklenmiştir. Hücreler pipetaj yapılarak süspansiyon edilip 25 cm² lik flasklara ekilerek 37 °C’de %5’lik CO₂ inkübatörüne kaldırılarak 24 saat sonra invert mikroskop altında hücrelerin tutunup tutunmadığı kontrol edilmiştir. Hücrenin ortam besiyeri 2 günde bir yenilenerek hücre yoğunluğunun %90’a gelene kadar takibi yapılmış olup daha sonra pasajlanarak plakalara ekim yapılmıştır.

3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler %90 yoğunluğa ulaştığında eski mediumları çekilmiş ve üzerlerine %0,25’lik tripsin-EDTA solüsyonundan 800 µl eklenmiş ardından 37°C’de inkübatörde 1 dakika bekletilip hücrelerin şekillerinin oval hale gelip kendilerini bırakmaları beklenmiştir. Mikroskopta bakıldığında hücrelerin kaymaya başladığı gözlemlendiği anda üzerlerine 5 kat yani 800 µl tripsin için en az 4 ml medium eklenip, tripsin etkisiz hale getirilmiştir. Hücre kültür flasklarındaki kalkan hücrelerin bulunduğu tripsinli medium falkon santrifüj tüpüne aktararak +4 °C ‘de 1100 rpm (200g)’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp pellet 4 ml hücre mediumu ile süspansiyon edilip, bu süspansiyondan 1’er ml; 10’ar ml taze besiyeri içeren 75 cm²’lik hücre kültür flasklarına eklenmiştir. Son olarak hücreler invert mikroskopta homojen dağılım gösterip göstermediği kontrol edilerek; pasaj sayısı ve tarih, hücre kültür flaskları üzerine yazılarak, %5 CO₂’li, 37°C ‘de inkübasyona konulmuştur.

3.2.3. Hücre Sayımı ve Canlılık Kontrolü

Hücre sayımı ve canlılık kontrolü tripan mavisi kullanılarak yapılmıştır. Canlı ve ölü hücre miktarını belirlemek için hücre süspansiyonuna 1:1 oranında tripan mavisi eklenerek toma lamında canlı hücrelerin (beyaz) ölü hücrelerden (mavi) ayırt edilerek hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

Sayılan hücrelerin ortalaması x dilüsyon faktörü x 10^4 işlemi yapılarak 1 ml'deki canlı hücre sayısı tespit edilmiştir.

3.2.4. Hücrelerinin Dondurulması

Pasajlama işleminde çöktürülen hücreler dondurma besiyerinde (DMSO içeren %20 FBS'li DMEM) çözülerek kademeli şekilde dondurma işlemine tabii tutulmuştur. Önce -20°C , daha sonra -80°C en sonunda da sıvı azota (-196°C) kaldırılarak stoklanmıştır.

3.2.5. Kurkumin Dozunun Belirlenmesi

Kurkumin (Sigma C1386-5G), DMSO ile çözülerek $5000\ \mu\text{M}$ 'lik ana stok çözeltisinden uygun dilüsyonlar yapılarak 0.1, 1, 10, 100, $1000\ \mu\text{M}$ konsantrasyonlarda kurkumin dozları hazırlanmış olup %90 yoğunluğa ulaşan 96 kuyucuklu plakalara eklenerek 24 saatlik inkübasyonu sonucu (WST-1) analiz yöntemi ile sitotoksosite durumu değerlendirilmiştir.

3.2.6. Metotreksat Dozunun Belirlenmesi

Metotreksat (Sigma A6770-25MG), DMSO ile çözülerek $5000\ \mu\text{M}$ 'lik ana stok çözeltisinden uygun dilüsyonlar yapılarak 0.1, 1, 10, 100, $1000\ \mu\text{M}$ konsantrasyonlarda hazırlanmış olup %90 yoğunluğa ulaşan 96 kuyucuklu plakalara eklenerek 24 saatlik inkübasyonu sonucu (WST-1) analiz yöntemi ile sitotoksosite durumu değerlendirilmiştir.

3.2.7. Wst-1 Testi (hücre sitotoksite testi)

WST-1 testi hücrelerde sitotoksitenin ölçülmesi amacıyla kullanılan canlı hücrelerden tetrazolium tuzlarının ayrıştırılması sonucu kolorimetrik renk değişimini ölçen bir testtir.

Bu çalışmada kurkumin ve metotreksatın birlikte kullanılarak hücrelerde sitotoksik etki araştırılmıştır. Hücrelerin %50 canlılık oranlarının belirlenmesinde IC50 değerleri bulundu ve hücre canlılıkları kontrol grubuna göre karşılaştırıldı. Bu çalışmada hücre sitotoksitesi WST-1 kiti ile üretici firmanın (İntronbio) belirlediği protokole göre ölçülmüştür.

Pasajlama işlemlerinden sonra kaldırılan MDA-MB-231 hücreleri 96 well plakaları kuyu başına 10000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin 24 saatlik inkübe edilerek plate e yapışmaları sağlandı. Hücreler %90 yoğunluğa ulaştığında kuyucuklara kurkumin ve metotreksat konsantrasyonları eklenmiş ve 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her bir 96'lık kuyucuktaki hücreler üzerine WST-1 kit (intron) prosedürüne göre 10 µl WST-1 reaktifi ilave edilmiştir hücreler 1 saat inkübe edilip, 450 nm dalga boyunda 3'er tekrarlı olacak şekilde okuma yapılmıştır.

3.2.8 Annexin V Testi (Apoptoz testi)

Annexin V testi, apoptoza uğrayan hücrenin dış yüzeyine geçiş yapan fosfatidilserinin floresan bir madde ile işaretlenip saptanmasında kullanılır.

MDA-MB-231 hücreleri %90 yoğunluğa ulaştığında 6 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 40000 hücre olacak şekilde ekilmiştir ve tutunup çoğalmaları için 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda kurkumin (CUR) için 1, 10, 100 µM, metotreksat (MTX) için 10,100 µM, kombinasyonlar için CUR 1 µM + MTX 10 µM, CUR 1 µM + MTX 100 µM, CUR 10 µM + MTX 10 µM, CUR 10 µM + MTX 100 µM, CUR 100 µM + MTX 10 dozlar olacak şekilde ilaçlar eklenmiştir. 24 saatlik inkübasyona bırakıldıktan sonra mediumları eppendorflara toplanmıştır. Boşalan plakaların üzerine yapışan hücrelerin kalkması için de 100 µl tripsin eklenip ardından 1 dakika etüve konulmuştur. Daha sonra plakaların üzerine 500 µl taze besiyeri eklenip son olarak plakaların üzerindeki 1'er ml besiyeri ve hücre karışımı da aynı eppendorf tüplerinin üzerine ilave edilmiştir. Eppendorf 1100 rpm 'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası çöken hücre pelleti üzerine 500 µl taze besiyeri eklenerek

hücreler resuspense edilmiştir. Daha sonra bu hücre süspansiyonundan 100 µl alınıp yeni bir eppendorfa aktarılmıştır. Üzerine 100 µl Muse™ Annexin V (MCH100105) Hücre Reaktifi (Part No.4700-1485, 100 tests/ bottle) solüsyonu kit prosedürüne uygun olarak eklenip 30 dk. 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyonu sonucunda Annexin V (MCH100105) kiti prosedürüyle Muse cihazında yüzde oran (%) olarak ölçümleri yapılmıştır.



Resim 3. Hücrelerin Muse® cell analyzer cihazında okutulması.

3.3. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel analizi SPSS (for Windows Release 11.5 Standart Version Copyright © Spss Inc. 1989-2001) hazır paket programı kullanılarak yapılmıştır. CUR ve MTX tekli ve kombine tüm dozlarının sitotoksite ve canlı hücre %'leri ortalama ± standart sapma tablosu ile değerlendirilmiştir.

MDA-MB-231 hücrelerine CUR ve MTX tekli ve kombine dozları uygulanarak 24 saat inkübasyon sonucu WST-1 sitotoksiste testi sonuçlarının istatistiksel analizi normal dağılıma

uygunluğuna gore, tek yonlu ANOVA (One-Way ANOVA) ve Kruskal-Wallis yonlemleri kullanılarak yapılmıştır.

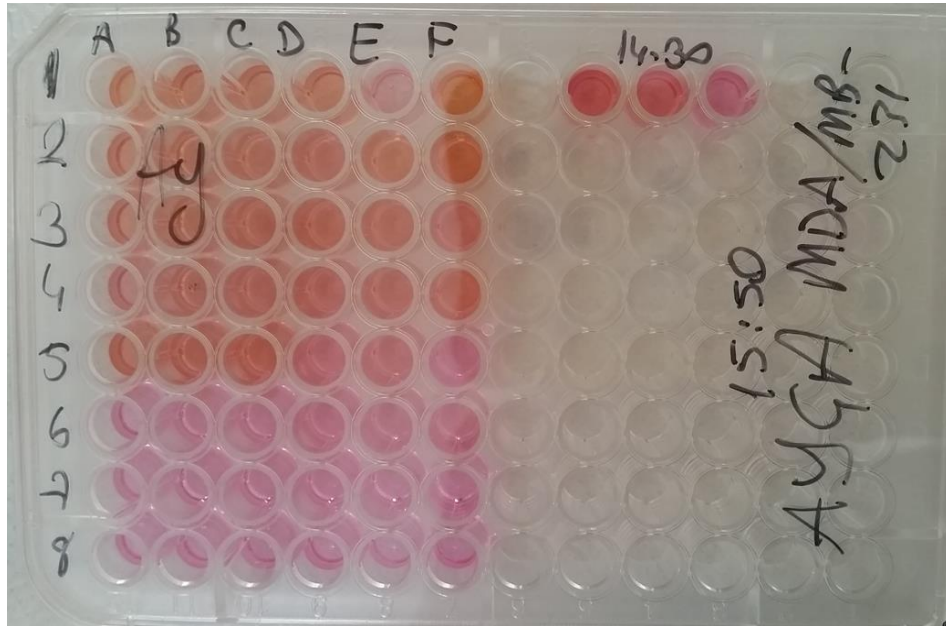
4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı Sonuçları Değerlendirme

4.1.1. WST-1 Testi Sonuçları

WST-1 testi ile kurkumin ve metotreksat sitotoksitesi absorbans değerleri ve mikroskopik gözlem sonuçlarına göre değerlendirilmiştir.

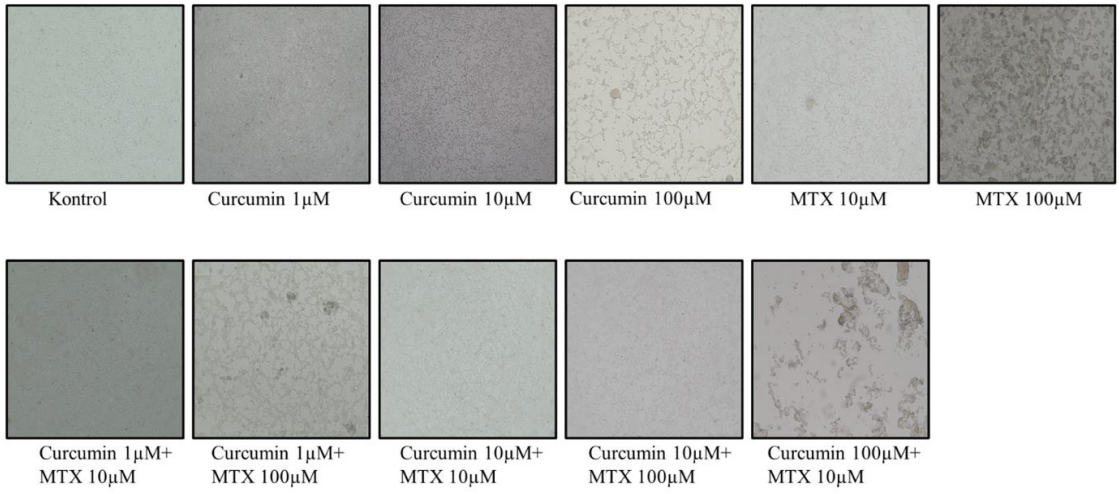
WST-1 testi 24 saat sonra ölçüm yapıldıktan sonraki 96'lık mikroplate görüntüleri aşağıdaki resimlerde gösterilmiştir.



Resim 4. 0-24 saat CUR, MTX tekli ve kombine ilaç dozlarına maruz kalmış WST-1 testi görüntüsü.

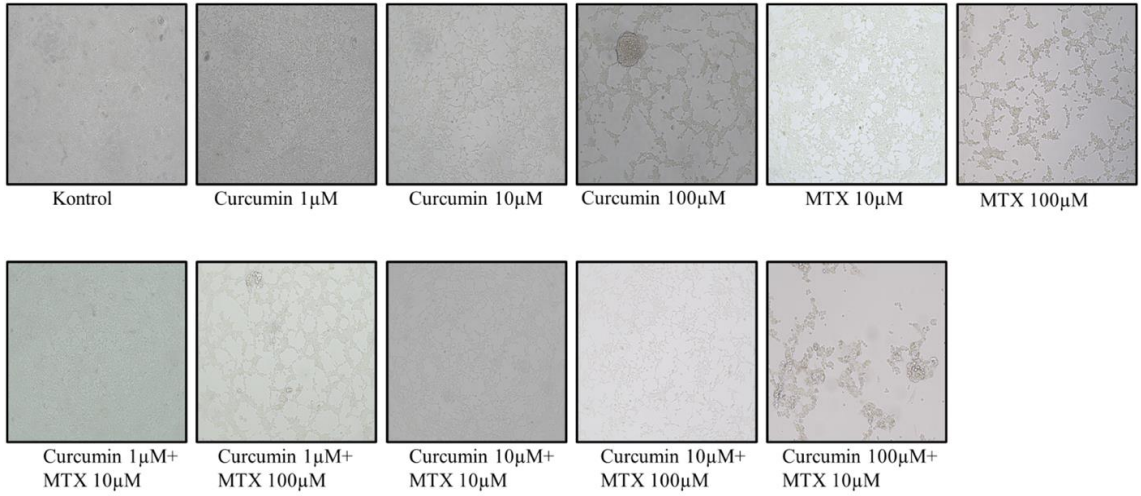
MDA-MB-231 hücrelerine sitotoksik metotreksat ve kurkumin tekli ve kombine dozlarının uygulanmasından 0-24 saat inkübasyon süresinin sonunda invert mikroskopta görüntüsü aşağıdaki resim 5'te ve resim 6'da gösterilmektedir.

5X Hücre Görüntüleri



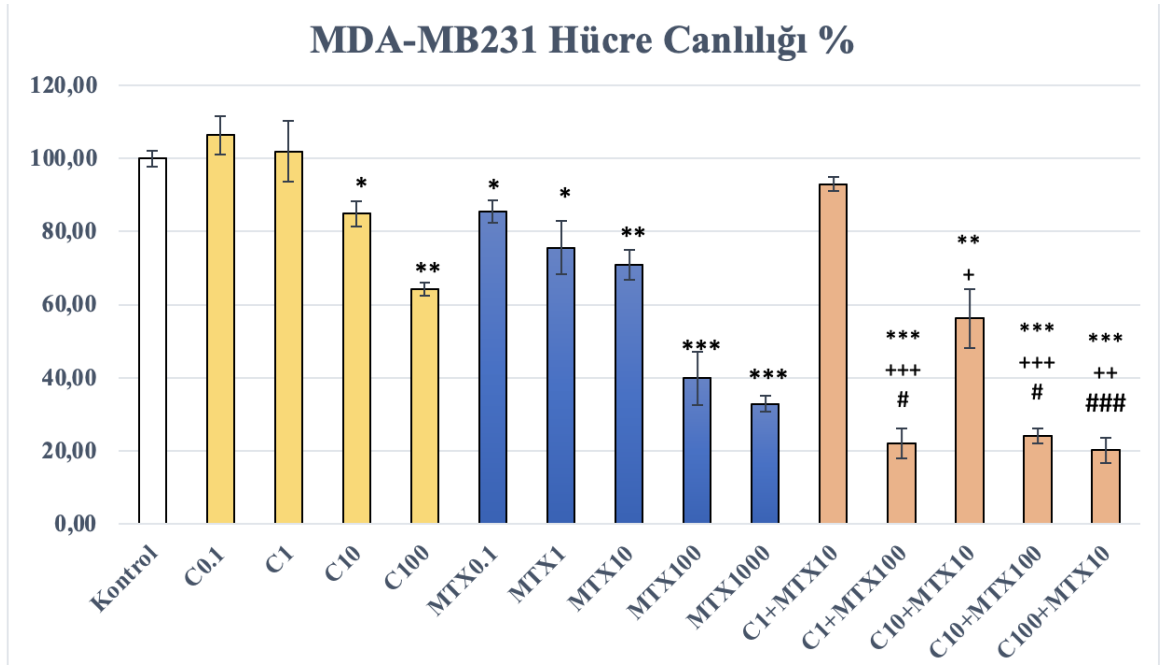
Resim 5. MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan kontrol, CUR 1, 10, 100 µM, MTX 10,100 µM ve kombine dozları invert mikroskop görüntüleri (5x).

10X Hücre Görüntüleri



Resim 6. MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan kontrol, CUR 1, 10, 100 µM, MTX 10,100 µM ve kombine dozları invert mikroskop görüntüleri (10x).

SPSS istatistiksel analiz yöntemi grafiği kullanılarak meme kanseri MDA-MB-231 hücreleri üzerine uygulanan tekli ve kombinasyon dozları WST-1 sonuçları toksisite %'leri aşağıdaki şekil 10'de gösterilmiştir.



μM ve kombine dozlarının hücre canlılığı %'leri ve standart sapmaları sonuçları grafiği.

*Kontrol grubuna göre * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

+ Kurkumin grubuna göre + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$

MTX grubuna göre # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$

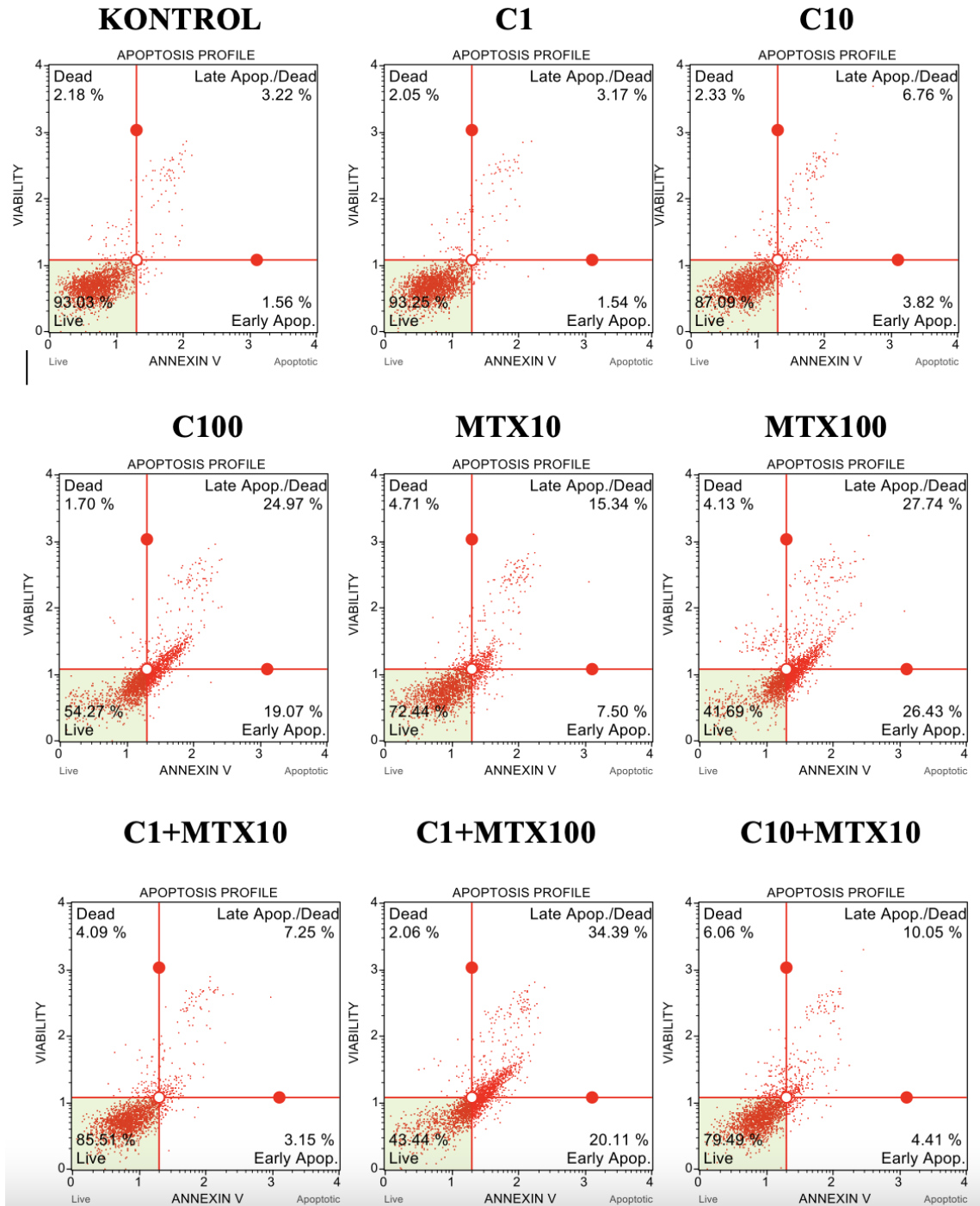
Şekil 10. MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan kontrol, CUR 1, 10, 100 μM , MTX 10,100.

Kurkuminin dozları değerlendirildiğinde 10 μM ile 100 μM dozunun kontrole göre gösterdiği sitotoksitelerinde istatistiksel açıdan önemli bir fark olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). Kurkuminin düşük dozlarında (0.1 μM , 1 μM) kontrole göre herhangi bir fark saptanmamıştır.

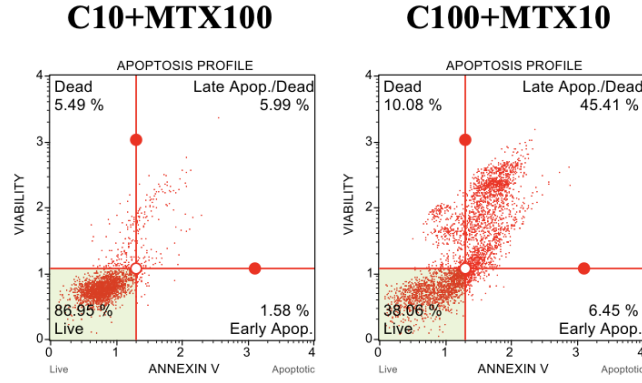
Elde edilen bulgulara göre; Metotreksatın tüm dozlarının kontrole göre % canlı hücre oranını istatistiksel olarak belirgin bir fark yaratacak şekilde ($p < 0.05$) azalttığı gözlemlenmiştir. Hücre canlılığına etkisine bakıldığında kombine doz için 10 ve 100 μM 'lık dozların seçilmesi uygun görülmüştür.

Çalışılan ikili kombinasyonlar ele alındığında; CUR 10 μM +MTX 100 μM ile CUR 100 μM MTX 10 μM dozları istatistiksel açıdan kontrole, kurkuminin ve metotreksatın tekli dozlarına göre önemli bir fark saptanmıştır ($p < 0.05$). CUR 1 μM ile MTX 100 μM dozunun kontrole göre istatistiksel açıdan farkı olduğu gözlemlenmekle birlikte uzun vadede çalışılabilecek en uygun kombinasyonun CUR 10 μM ile MTX 10 μM olduğu görülmektedir. Bu kombine dozda da kontrole göre istatistiksel bir fark saptanmış olup ($p < 0,01$), kurkuminin tekli dozlarına göre de istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. ($p < 0,05$)

4.2. Apoptoz Sonuçları Değerlendirme



Şekil 11. Apoptoz sonuçlarının değerlendirilmesi.



Şekil 11. Apoptoz sonuçlarının değerlendirilmesi

Meme kanseri hücrelerinde kurkumin kaynaklı apoptoz sonuçları şekil 10 ve şekil 11 de gösterilmiştir. MDA-MB-231 hücreleri, 24 saat boyunca CUR 1, 10, 100 μ M, MTX 10, 100 μ M kombine dozlar CUR 1 μ M + MTX 10 μ M, CUR 1 μ M, + MTX 100 μ M, CUR 10 μ M + MTX 10 μ M, CUR 10 μ M + MTX 100 μ M, CUR 100 μ M, + MTX 10 μ M dozları ile muamele edildi ve hücre apoptozu, akış sitometrisi kullanılarak Annexin V ile belirlendi. Veriler, üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama değerleri temsil eder. * $P < 0.05$, erken ve geç apoptoz (sırasıyla sağ üst ve sağ alt alanlar) karşılaştırılarak kontrol grubuyla karşılaştırıldı.

4.3. Annexin V Testi Sonuçları

MDA-MB-231 hücre hattı üzerine uygulanan kurkumin ve metotreksat tekli ve kombine dozları WST-1 testi sonuçlarına ve invert mikroskop gözlemlerine dayanarak 24 saatlik inkübasyon sonucunda Muse cihazındaki okuması yapılmıştır.

Annexin V testi 0-24 saatlik inkübasyon sonunda kontrol grubunda canlı hücre oranı %95,18 iken sırasıyla kurkumin (CUR) 1, 10, 100 μ M %95,12, %88,10, %51,07 Metotreksat (MTX) 10, 100 μ M %74,09, %40,86 kombinasyon dozlarında CUR 1 μ M + MTX 10 μ M %85,09, CUR 1 μ M + MTX 100 μ M %41,07, C10 μ M +MTX10 μ M %76,03, C10 μ M +MTX100 μ M %81,04, C100 μ M +MTX10 μ M %36,19 olarak bulunmaktadır.

Bu testin sonuçlarına göre; canlı hücre, apoptotik hücre ve nekroz hücre yüzdeleri ortalama \pm standart sapma olarak Tablo 5'te detaylı olarak gösterilmektedir.

Tablo 5. 0-24 saat analizi sonuçları Annexin-V boyaması (%) canlılık, apoptoz ve nekroz ortalama± standart sapmaları.

Grup	%Canlılık	% Total Apoptoz	% Nekroz	P
Kontrol	95,18 ± 3,01	3,62 ± 1,03	1,33 ± 1,07	
C1	95,12 ± 1,03	3,52 ± 0,21	1,36 ± 0,82	
C10	88,10 ± 1,19	6,75 ± 1,08	3,45 ± 0,78	*
C100	51,07 ± 2,10	26,32 ± 4,47	18,97 ± 2,03	***
MTX10	74,09 ± 8,16	15,71 ± 4,38	7,70 ± 2,11	***
MTX100	40,86 ± 6,72	29,66 ± 4,28	25,03 ± 1,37	***
C1+MTX10	85,09 ± 1,39	6,12 ± 3,33	3,01 ± 1,41	*,+,#
C1+MTX100	41,07 ± 6,27	35,12 ± 6,27	20,41 ± 2,74	***,+++,###
C10+MTX10	76,03 ± 3,08	12,16 ± 2,57	5,91 ± 2,03	***,++
C10+MTX100	81,04 ± 6,17	5,14 ± 1,74	1,21 ± 0,11	*,+
C100+MTX10	36,19 ± 0,41	45,78 ± 1,95	7,05 ± 1,62	***,+++,###

*Kontrol grubuna göre *p<0.05, ** p< 0.01, ***p< 0.001

+ Kurkumin grubuna göre +p<0.05, ++ p< 0.01, +++p< 0.001

MTX grubuna göre #p<0.05, ## p< 0.01, ###p< 0.001

Yapılan bu çalışmada CUR ve MTX' in tekli ve yüksek dozlarında hücreleri etkili bir şekilde öldürdüğü görülmektedir. Hücrelerin apoptoza gitme oranları doz artışına paralel olarak artmaktadır.

CUR ve MTX'in birlikte kullanıldığı kombine yüksek dozlarında da hücrelerin ölüm oranlarındaki artış dikkat çekicidir fakat uzun vadeli tedaviler için düşük dozlarının kombinasyonunun daha etkili olacağını düşünüyoruz.

CUR10 µM + MTX10 µM doz kombinasyonu 24 saatlik inkubasyon sonunda %12,6 oranında düşük bir apoptotik etki göstermiş olsa da 48 ve 72 saatlik etkisinin uzun vadeli tedaviler için daha etkili olacağını tahmin ediyoruz.

Kurkuminin en düşük dozlarında bile kombinasyonel kullanımında apoptotik etkinliğinin yadsınamaz olduğu görülmüştür. Özellikle MTX 100 µM dozunun tekli kullanımına kıyasla kurkuminle kombine dozlarında (CUR1 µM + MTX100), hücre canlılığında belirgin bir artış olmasa da halen canlı hücrelerin de var olduğunu, apoptoza giden hücre sayısındaki %5,46'lık bir artış gözlenirken ve nekroza giden hücre sayısında %4,62'lik azalmasına dayanarak söylenebilir. Ancak bu doz kombinasyonu hücreyi yüksek miktarda apoptoza götürmesine rağmen halen yüksek miktarda hücreyi nekroza da uğrattığı için uzun vadeli tedavilerde uygun bir doz kombinasyonu olarak kullanımına uygun bulunmamıştır. Bu tür tedavilerde kanser hücrelerinin apoptoza uğradığı ve diğer hücrelerin canlılığını koruduğu düşük nekroz yüzdeli

dozlar kullanılması uygun bulunmaktadır. Dolayısıyla MTX ve CUR yüksek dozlarının kombinasyonu istediğimiz tedaviye uymamaktadır.

Kullanılan tüm doz kombinasyonlarına baktığımızda apoptoza götürme süreci açısından değerlendirildiğinde CUR10 μ M + MTX10 μ M dozunun daha etkili olacağı öngörülmektedir.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda epitelyal meme hücre dizisi MDA-MB-23 üzerinde Kurkumin ve metotreksatın tekli ve kombine dozlarının hücre canlılığına ve apoptoza etkisi araştırılmıştır. CUR 100 µM dozu canlı hücre oranını en çok azalttığı, apoptoza en fazla yol açtığı; MTX 100 µM dozunun ise canlı hücre oranını en fazla düşürdüğü ancak apoptoza ve nekroza giden hücre sayısını arttırdığı saptanmıştır. Kullanılan tüm doz kombinasyonlarına baktığımızda ise apoptoza götürme süreci açısından CUR10 µM + MTX10 µM dozunun daha etkili olduğu görülmüştür.

Çok sayıda in vitro ve in vivo çalışmada, kurkuminin epitelyal meme hücre dizisi MDA-MB-231 'de bahsedilen anti-kanser etkisini göstermiştir. İnsanlarda kemopreventif bir ajan olarak kurkuminin kullanımı ile ilişkili ana problem, gastrointestinal sistemden düşük emilimi, vücut sıvılarında zayıf çözünürlüğü ve düşük biyoyararlanımıdır (Tomeh ve diğerleri, 2019).

Kurkuminin in vivo biyoyararlanımını ve etkinliğini artırmak için mevcut çalışmalar devam etmektedir.

Polifenoller (örneğin kurkumin, resveratrol veya epigallocatechin gallate [EGCG]) veya izotiyosiyanat (örneğin sülforafan [SFN]) gibi diyetle alınan biyoaktif bileşiklerin histon asetilasyonunu düzenleyebileceği bildirilmiştir (Gianfredi ve diğerleri, 2017).

Gianfredi ve arkadaşları MDA-MB-231 hücre hattında yapılan araştırmalarda az veya ihmal edilebilir yan etkilerle, diyetteki biyoaktif bileşiklerinin, düşük dozlarında ve fizyolojik konsantrasyonlarında, detoksifikasyon enzimlerini baskılayarak ve hücre döngüsü durmasını kolaylaştırdığını ve apoptozu indükleyerek, hücresel proliferasyonu inhibe ederek kemopreventif etkiler gösterdiğini bildirmişlerdir (Gianfredi ve diğerleri, 2017).

Yang ve arkadaşları kurkuminin oral biyoyararlanımının %1 civarında olduğunu göstermişlerdir, bu nedenle herhangi bir yararlı sonuç elde etmek için çok yüksek dozlarda kurkumin (3600 ila 12.000 miligram) gerektiği bildirilmiştir (Yang ve diğerleri, 2007).

Naragaju ve arkadaşları, kurkuminin PI3K/AKT, MAPK ve nükleer faktör (NF)-κB dahil olmak üzere çoklu sinyal yollarını düzenleyebileceğini bildirmiştir (Naragaju ve diğerleri, 2012).

Kurkuminin diğer kemoterapötik ajanlarla kombine edildiğinde sinerjik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Tan ve diğerleri, 2019).

Kurkuminin endotelyal büyüme faktörü reseptör bozulmasını indüklediği ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizilerinde ve ksenograft fare modellerinde gefitinibin antitümör aktivitesini güçlendirdiği ayrıca ilginç bir şekilde, p38 aktivasyonunu değiştirerek gefitinibin neden olduğu gastrointestinal yan etkileri de hafiflettiği gösterilmiştir (Lee ve diğerleri, 2011).

Yapılan bir çalışmada tamoksifene dirençli meme kanseri hücrelerinde (MCF-7/TAMR) kurkuminin hücre sel proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu önlediği bildirilmiştir (Cai ve diğerleri, 2021). Bařka bir çalışmada ise kurkuminin MDA-MB-231 hücreleri üzerinde çalışılmış, Akt/mTOR sinyal yolunun fosforilasyonunu inhibe ettiği, anti-apoptotik protein BCL2'nin ekspresyonunu azalttığı, apoptotik protein BAX'ın ekspresyonunu arttırdığı ve hücre apoptozisine yol ačan kaspaz-3 aktifleşmesi sonucu meme kanseri hücrelerinin çoğalmasının kurkumin tarafından doza bağımlı olarak inhibe edildiği gösterilmiştir (Shan ve diğerleri, 2018). 72 saatlik tedaviden sonra ER-PR-HER2- MDA-MB-231 hücrelerinde, IC50 nispeten daha zayıf olduğu ($11.32 \pm 2.13 \mu\text{M}$), belirlenmiştir (Shan ve diğerleri, 2018).

Kurkumin derivelerinin meme kanseri MDA-MB-231 hücre hattındaki etkilerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada ise, kurkuminin Bor (B (Cur)²) ve Demir (Fe (Cur)³) dozlarının bizim çalışmamıza benzer biçimde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. (Mohammed ve diğerleri, 2020)

Literatür araştırmalarından yola çıkılarak bu tez çalışmamızda, kurkumin, metotreksat tekli ve kombine dozları arasındaki antiproliferatif ve apoptotik etkileri değerlendirildi. Tekli dozlar CUR 1, 10, 100 μM , MTX 10, 100 μM kombine dozlar CUR 1 μM + MTX 10 μM , CUR 1 μM , + MTX 100 μM , CUR 10 μM + MTX 10 μM , CUR 10 μM + MTX 100 μM , CUR 100 μM , + MTX 10 μM olarak karar verilmiştir. 24 saatlik tedavi sonucunda $12,16 \pm 2,57$ 'lik apoptotik etkisi ile CUR 10 μM + MTX 10 μM kombinasyon dozlarının 48 ve 72 saatlik uzun süreli tedavilerde apoptoza götürme açasından daha da artış göstereceği düşünülerek kullanımının daha uygun olabileceği öngörülmektedir.

CUR ve MTX'in birlikte kullanıldığı kombine yüksek dozlarında da hücrelerin ölüm oranlarındaki artış dikkat çekicidir fakat uzun vadeli tedaviler için düşük dozlarının kombinasyonunun daha etkili olacağı tahmin ediliyor.

CUR10 μM + MTX10 μM doz kombinasyonu 24 saat inkübasyon sonunda %12,6 oranında düşük bir apoptotik etki göstermiş olsa da 48 ve 72 saatlik etkisinin uzun vadeli tedaviler için daha etkili olacağını tahmin ediyoruz.

Kurkuminin en düşük dozlarında bile kombinasyonel kullanımında apoptotik etkinliğinin yadsınamaz olduğu görülmüştür. Özellikle MTX 100 μM dozunun tekli kullanımına kıyasla kurkuminle kombine dozlarında (CUR1 μM + MTX100), hücre canlılığında belirgin bir artış olmasa da halen canlı hücrelerin de var olduğunu, apoptoza giden hücre sayısındaki %5,46'lık bir artış gözlenirken ve nekroza giden hücre sayısında %4,62'lik azalmasına dayanarak söylenebilir. Ancak bu doz kombinasyonu hücreyi yüksek miktarda apoptoza götürmesine rağmen halen yüksek miktarda hücreyi nekroza da uğrattığı için uzun vadeli tedavilerde uygun bir doz kombinasyonu olarak kullanımına uygun bulunmamıştır. Bu tür tedavilerde kanser hücrelerinin apoptoza uğradığı ve diğer hücrelerin canlılığını koruduğu düşük nekroz yüzdeli dozlar kullanılması uygun bulunmaktadır. Dolayısıyla MTX ve CUR yüksek dozlarının kombinasyonu istediğimiz tedaviye uymamaktadır.

Kullanılan tüm doz kombinasyonlarına baktığımızda apoptoza götürme süreci açısından değerlendirildiğinde CUR10 μM + MTX10 μM dozunun daha etkili olacağı öngörülmektedir.

MTX'in yüksek dozlarında hücreler açısından toksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Howard ve diğerleri, 2016).

Kemoterapi tedavisi alan meme kanserli kişilere tedaviye yardımcı kemoterapinin yan etkilerini azaltıcı olarak kurkumin takviyesi verilmesinin sağlıklı hücrelere herhangi bir toksik etkisinin olmadığı, sadece kanser hücrelerini hedeflediği yapılan deneylerle gösterilmiştir (Ramezani ve diğerleri, 2019).

Kurkuminin anti-kanseröjen özelliğinin yanı sıra anti-inflamatuar etkisi vücuttaki enflamasyonu önemli ölçüde önlediği bildirilmiştir (Panahi ve diğerleri, 2012; Ravindran ve diğerleri, 2010; Sahebkar, 2014).

Tüm bu çalışmalardan görülebileceği üzere, enflamasyonu, anjiyogenezi ve kanseri kontrol altına almasına rağmen kurkuminin terapötik rolü hala sınırlıdır. Yeni formülasyonların geliştirilmesine yönelik çalışmalar hala güncelliğini korumaktadır (Aravind, ve diğerleri, 2021; Mahmoudi ve diğerleri, 2021; Pandya ve diğerleri, 2020)

Bu çalışma sonucuna göre kurkuminin metotreksatin gibi kemoterapotik ilaçlarla birlikte kullanımı metotreksatin kanserli hücreler üzerindeki apoptotik etkilerini artırıp sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etkisini baskılamış olduğu için olası yan etkileri de hafifletici etkiye

sahip olabileceđi uygun dozlarda yeterli teorik ve klinik çalıřmalar sonucu takviye ilaç olarak kullanılabileni dūřüncesini destekler niteliktedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, insan meme kanseri MDA-MB-231 hücre hattında uygulanan kurkumin ve metotseksat ilaç dozlarının tekli ve kombine halleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, kombine ilaç dozunun, tekli ilaç dozlarına göre sinerjik etki yaparak canlı hücre ve apoptotik hücre sayısını çoğalttığı görülmektedir. Annexin V analizi sonucuna göre;

CUR 100 μM dozu canlı hücre oranını en fazla düşürmekte, apoptoza en fazla yol açmaktadır. MTX 100 μM dozu canlı hücre oranını en fazla düşürmüş fakat apoptoza ve nekroza giden hücre sayısı daha fazladır.

Elde edilen veriler sonucunda kurkumin ve metotreksat kombine uygulanan ilaç dozlarının sinerjik etki yaptığı gösterilmiştir. Düşük doz metotreksatın fitoterapotik ajanlarla kombine dozlarının kullanımı; yan etkileri azaltarak hastaların yaşam kalitesini yükseltebilir.

KAYNAKLAR

- Aggarwal, B., Surh, YJ., Shishodia, S. (2007). The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease. Springer, 10.1007/978-0-387-46401-5.
- American Society of Health-System Pharmacists. (2016). *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 73(13), 1010. <https://doi.org/10.2146/sp160001>
- Anuchapreeda, S., Leechanachai, P., Smith, M. M., Ambudkar, S. V., & Limtrakul, P. N. (2002). Modulation of P-glycoprotein expression and function by curcumin in multidrug-resistant human KB cells. *Biochemical pharmacology*, 64(4), 573–582. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01224-8](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01224-8)
- Aravind, S. R., Lakshmi, S., S, R., & Krishnan, L. K. (2021). Sustained release of curcumin from fibrin matrix induces cancer cell death and immunomodulation. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 133, 110967. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110967>
- Aronson, K. J., Miller, A. B., Woolcott, C. G., Sterns, E. E., McCready, D. R., Lickley, L. A., Fish, E. B., Hiraki, G. Y., Holloway, C., Ross, T., Hanna, W. M., SenGupta, S. K., & Weber, J. P. (2000). Breast adipose tissue concentrations of polychlorinated biphenyls and other organochlorines and breast cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 9(1), 55–63.
- Bachmeier, B. E., Mohrenz, I. V., Mirisola, V., Schleicher, E., Romeo, F., Höhneke, C., Jochum, M., Nerlich, A. G., & Pfeffer, U. (2008). Curcumin downregulates the inflammatory cytokines CXCL1 and -2 in breast cancer cells via NFkappaB. *Carcinogenesis*, 29(4), 779–789. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm248>
- Bahrami, A., & A Ferns, G. (2021). Effect of Curcumin and Its Derivates on Gastric Cancer: Molecular Mechanisms. *Nutrition and cancer*, 73(9), 1553–1569. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1808232>

- Bednarek, A. K., Sahin, A., Brenner, A. J., Johnston, D. A., & Aldaz, C. M. (1997). Analysis of telomerase activity levels in breast cancer: positive detection at the in situ breast carcinoma stage. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 3(1), 11–16.
- Bentires-Alj, M., Barbu, V., Fillet, M., Chariot, A., Relic, B., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M. P., & Bours, V. (2003). NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene*, 22(1), 90–97. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206056>
- Cai, J., Sun, H., Zheng, B., Xie, M., Xu, C., Zhang, G., Huang, X., & Zhuang, J. (2021). Curcumin attenuates lncRNA H19-induced epithelial-mesenchymal transition in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Molecular medicine reports*, 23(1), 13. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11651>
- Cheng, A. L., Hsu, C. H., Lin, J. K., Hsu, M. M., Ho, Y. F., Shen, T. S., Ko, J. Y., Lin, J. T., Lin, B. R., Ming-Shiang, W., Yu, H. S., Jee, S. H., Chen, G. S., Chen, T. M., Chen, C. A., Lai, M. K., Pu, Y. S., Pan, M. H., Wang, Y. J., Tsai, C. C., ... Hsieh, C. Y. (2001). Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer research*, 21(4B), 2895–2900.
- Crum CP, Lester SC, Cotran RS. (2003). Kadın Genital Sistem ve Meme İçinde: Temel Patoloji. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, pp.705-715.
- Donepudi, M. S., Kondapalli, K., Amos, S. J., & Venkateshan, P. (2014). Breast cancer statistics and markers. *Journal of cancer research and therapeutics*, 10(3), 506–511. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.137927>
- Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Fahad Ullah M. (2019). Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status. *Advances in experimental medicine and biology*, 1152, 51–64. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_4

- Garcea, G., Berry, D. P., Jones, D. J., Singh, R., Dennison, A. R., Farmer, P. B., Sharma, R. A., Steward, W. P., & Gescher, A. J. (2005). Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *14*(1), 120–125.
- Gianfredi, V., Vannini, S., Moretti, M., Villarini, M., Bragazzi, N. L., Izzotti, A., & Nucci, D. (2017). Sulforaphane and Epigallocatechin Gallate Restore Estrogen Receptor Expression by Modulating Epigenetic Events in the Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics*, *10*(3-4), 126–135. <https://doi.org/10.1159/000480636>
- Global Cancer Observatory [GLOBOCAN]. (2020). <https://gco.iarc.fr> adresinden erişildi.
- Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., & Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, *16*(6), 2129–2144. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.6.2129>
- Gucalp, A., Traina, T. A., Eisner, J. R., Parker, J. S., Selitsky, S. R., Park, B. H., Elias, A. D., Baskin-Bey, E. S., & Cardoso, F. (2019). Male breast cancer: a disease distinct from female breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, *173*(1), 37–48. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4921-9>
- Hardwick, J., Taylor, J., Mehta, M., Satija, S., Paudel, K. R., Hansbro, P. M., Chellappan, D. K., Bebawy, M., & Dua, K. (2021). Targeting Cancer using Curcumin Encapsulated Vesicular Drug Delivery Systems. *Current pharmaceutical design*, *27*(1), 2–14. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200728151610>
- Harris, J. R., Lippman, M. E., Veronesi, U., & Willett, W. (1992). Breast cancer (1). *The New England journal of medicine*, *327*(5), 319–328. <https://doi.org/10.1056/NEJM199207303270505>
- He, Y., Yue, Y., Zheng, X., Zhang, K., Chen, S., & Du, Z. (2015). Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked?. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *20*(5), 9183–9213. <https://doi.org/10.3390/molecules20059183>

- Heim, E., Valach, L., & Schaffner, L. (1997). Coping and psychosocial adaptation: longitudinal effects over time and stages in breast cancer. *Psychosomatic medicine*, 59(4), 408–418. <https://doi.org/10.1097/00006842-199707000-00011>
- Hortobagyi, G. N., Edge, S. B., & Giuliano, A. (2018). New and Important Changes in the TNM Staging System for Breast Cancer. *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, 38, 457–467. https://doi.org/10.1200/EDBK_201313
- Hosseini, A., & Ghorbani, A. (2015). Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. *Avicenna journal of phytomedicine*, 5(2), 84–97.
- Howard, S. C., McCormick, J., Pui, C. H., Buddington, R. K., & Harvey, R. D. (2016). Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. *The oncologist*, 21(12), 1471–1482. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0164>
- Hu, C., Li, M., Guo, T., Wang, S., Huang, W., Yang, K., Liao, Z., Wang, J., Zhang, F., & Wang, H. (2019). Anti-metastasis activity of curcumin against breast cancer via the inhibition of stem cell-like properties and EMT. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 58, 152740. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.11.001>
- Hu, S., Xu, Y., Meng, L., Huang, L., & Sun, H. (2018). Curcumin inhibits proliferation and promotes apoptosis of breast cancer cells. *Experimental and therapeutic medicine*, 16(2), 1266–1272. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6345>
- Jacquillat, C., Weil, M., Baillet, F., Borel, C., Auclerc, G., de Maublanc, M. A., Housset, M., Forget, G., Thill, L., & Soubrane, C. (1990). Results of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in the breast-conserving treatment of 250 patients with all stages of infiltrative breast cancer. *Cancer*, 66(1), 119–129. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19900701\)66:1<119::aid-cncr2820660122>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19900701)66:1<119::aid-cncr2820660122>3.0.co;2-3)
- 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(4), 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>

- Kunnumakkara, A. B., Bordoloi, D., Padmavathi, G., Monisha, J., Roy, N. K., Prasad, S., & Aggarwal, B. B. (2017). Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *British journal of pharmacology*, *174*(11), 1325–1348. <https://doi.org/10.1111/bph.13621>
- Lee, J. Y., Lee, Y. M., Chang, G. C., Yu, S. L., Hsieh, W. Y., Chen, J. J., Chen, H. W., & Yang, P. C. (2011). Curcumin induces EGFR degradation in lung adenocarcinoma and modulates p38 activation in intestine: the versatile adjuvant for gefitinib therapy. *PloS one*, *6*(8), e23756. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023756>
- Mahmoudi, R., Ashraf Mirahmadi-Babaheidri, S., Delaviz, H., Fouani, M. H., Alipour, M., Jafari Barmak, M., Christiansen, G., & Bardania, H. (2021). RGD peptide-mediated liposomal curcumin targeted delivery to breast cancer cells. *Journal of biomaterials applications*, *35*(7), 743–753. <https://doi.org/10.1177/0885328220949367>
- Manolova, Y., Deneva, V., Antonov, L., Drakalska, E., Momekova, D., & Lambov, N. (2014). The effect of the water on the curcumin tautomerism: a quantitative approach. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, *132*, 815–820. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.05.096>
- McTiernan A. Behavioral risk factors in breast cancer: can risk be modified? *Oncologist*. 2003;8(4):326-34.
- Mirzaei, H., Bagheri, H., Ghasemi, F., Khoi, J. M., Pourhanifeh, M. H., Heyden, Y. V., Mortezapour, E., Nikdasti, A., Jeandet, P., Khan, H., & Sahebkar, A. (2021). Anti-Cancer Activity of Curcumin on Multiple Myeloma. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, *21*(5), 575–586. <https://doi.org/10.2174/1871520620666200918113625>
- Mohammed, F., Rashid-Doubell, F., Taha, S., Cassidy, S., & Fredericks, S. (2020). Effects of curcumin complexes on MDA-MB-231 breast cancer cell proliferation. *International journal of oncology*, *57*(2), 445–455. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5065>
- Moran, M. S., Schnitt, S. J., Giuliano, A. E., Harris, J. R., Khan, S. A., Horton, J., Klimberg, S., Chavez-MacGregor, M., Freedman, G., Houssami, N., Johnson, P. L., & Morrow, M. (2014). Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, *88*(3), 553–564. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2013.11.012>

- Morrow, M. (2014). Chapter 3: Physical Exam of the Breast. *Diseases of the Breast*. 5.baskı Philadelphia: Wolters Kluwer Health.
- Nagaraju, G. P., Aliya, S., Zafar, S. F., Basha, R., Diaz, R., & El-Rayes, B. F. (2012). The impact of curcumin on breast cancer. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 4(9), 996–1007. <https://doi.org/10.1039/c2ib20088k>
- National Cancer Institute. (2021). *Physician Data Query (PDQ). Breast Cancer Treatment – Patient Version*. <https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq> adresinden erişildi.
- Neuman, H. B., Morrogh, M., Gonen, M., Van Zee, K. J., Morrow, M., & King, T. A. (2010). Stage IV breast cancer in the era of targeted therapy: does surgery of the primary tumor matter?. *Cancer*, 116(5), 1226–1233. <https://doi.org/10.1002/cncr.24873>
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B., & Bao, J. K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell proliferation*, 45(6), 487–498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x>
- Panahi, Y., Sahebkar, A., Parvin, S., & Saadat, A. (2012). A randomized controlled trial on the anti-inflammatory effects of curcumin in patients with chronic sulphur mustard-induced cutaneous complications. *Annals of clinical biochemistry*, 49(Pt 6), 580–588. <https://doi.org/10.1258/acb.2012.012040>
- Pandya, N., Khan, E., Jain, N., Satham, L., Singh, R., Makde, R. D., Mishra, A., & Kumar, A. (2021). Curcumin analogs exhibit anti-cancer activity by selectively targeting G-quadruplex forming c-myc promoter sequence. *Biochimie*, 180, 205–221. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.11.006>
- Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C., & Ramirez-Tortosa, M. (2016). Curcumin and Health. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(3), 264. <https://doi.org/10.3390/molecules21030264>
- Quispe-Soto, E. T., & Calaf, G. M. (2016). Effect of curcumin and paclitaxel on breast carcinogenesis. *International journal of oncology*, 49(6), 2569–2577. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3741>

- Ravindran, J., Subbaraju, G. V., Ramani, M. V., Sung, B., & Aggarwal, B. B. (2010). Bisdemethylcurcumin and structurally related hispolon analogues of curcumin exhibit enhanced prooxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities in vitro. *Biochemical pharmacology*, 79(11), 1658–1666. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.01.033>
- Ruiz de Porras, V., Layos, L., & Martínez-Balibrea, E. (2021). Curcumin: A therapeutic strategy for colorectal cancer?. *Seminars in cancer biology*, 73, 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.09.004>
- Sahebkar A. (2014). Curcuminoids for the management of hypertriglyceridaemia. *Nature reviews. Cardiology*, 11(2), 123. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2013.140-c1>
- Segal, R., Evans, W., Johnson, D., Smith, J., Colletta, S., Gayton, J., Woodard, S., Wells, G., & Reid, R. (2001). Structured exercise improves physical functioning in women with stages I and II breast cancer: results of a randomized controlled trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19(3), 657–665. <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.3.657>
- Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., & Srinivas, P. S. (1998). Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta medica*, 64(4), 353–356. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957450>
- Siddique, M., Hassan, A., Nawaz, M. K., Bashir, H., & Chaudhry, M. Z. (2020). Comparison between sentinel lymph node hybrid scintigraphy and blue dye technique in breast cancer patients: An institutional experience. *World journal of nuclear medicine*, 19(1), 21–27. https://doi.org/10.4103/wjnm.WJNM_23_19
- Singh, S., & Aggarwal, B. B. (1995). Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *The Journal of biological chemistry*, 270(42), 24995–25000. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.42.24995>
- Stark, G. B., Grandel, S., & Spilker, G. (1992). Tissue suction of the male and female breast. *Aesthetic plastic surgery*, 16(4), 317–324. <https://doi.org/10.1007/BF01570694>
- Sun, Y., & Peng, Z. L. (2009). Programmed cell death and cancer. *Postgraduate medical journal*, 85(1001), 134–140. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2008.072629>

- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P. P., & Zhu, H. P. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International journal of biological sciences*, *13*(11), 1387–1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>
- Tan, B. L., & Norhaizan, M. E. (2019). Curcumin Combination Chemotherapy: The Implication and Efficacy in Cancer. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(14), 2527. <https://doi.org/10.3390/molecules24142527>
- Tanis, P. J., Nieweg, O. E., Valdés Olmos, R. A., & Kroon, B. B. (2001). Anatomy and physiology of lymphatic drainage of the breast from the perspective of sentinel node biopsy. *Journal of the American College of Surgeons*, *192*(3), 399–409. [https://doi.org/10.1016/s1072-7515\(00\)00776-6](https://doi.org/10.1016/s1072-7515(00)00776-6)
- Thomsen, S., & Tatman, D. (1998). Physiological and pathological factors of human breast disease that can influence optical diagnosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *838*, 171–193. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08197.x>
- Tomeh, M. A., Hadianamrei, R., & Zhao, X. (2019). A Review of Curcumin and Its Derivatives as Anticancer Agents. *International journal of molecular sciences*, *20*(5), 1033. <https://doi.org/10.3390/ijms20051033>
- Torre, L. A., Sauer, A. M., Chen, M. S., Jr, Kagawa-Singer, M., Jemal, A., & Siegel, R. L. (2016). Cancer statistics for Asian Americans, Native Hawaiians, and Pacific Islanders, 2016: Converging incidence in males and females. *CA: a cancer journal for clinicians*, *66*(3), 182–202. <https://doi.org/10.3322/caac.21335>
- Vaux, D. L., Haecker, G., & Strasser, A. (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*, *76*(5), 777–779. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90350-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90350-6)
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., & Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology*, *68*, 251–306. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62312-8](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62312-8)
- Yang, K. Y., Lin, L. C., Tseng, T. Y., Wang, S. C., & Tsai, T. H. (2007). Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, *853*(1-2), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.03.010>

Yao, Z., Le, T. H., Du, Q., Mu, H., Liu, C., & Zhu, Y. (2021). The Potential Clinical Value of Curcumin and its Derivatives in Colorectal Cancer. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 21(13), 1626–1637. <https://doi.org/10.2174/1871520620999201113095821>