

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE KARNOSİK ASİT VE
OLEUROPEİNDEN ZENGİN BİTKİ ÖZÜTLERİ VE
SALİSİLİK ASİTİN SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

FUNDA PEHLEVAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. OĞUZ ÖZTÜRK**

**MOLEKÜLER TIP
MOLEKÜLER TIP DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

İTHAF



Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora dönemim boyunca bana destek olan, danışmanlığımı üstlenen değerli bilgi, birikim ve tecrübelerini benimle paylaşan tez danışmanım Sayın hocam Prof. Dr. Oğuz ÖZTÜRK'e,

Tüm zorlu süreçlerimde, en sıkışık anlarımda yardımlarını, desteğini, sevgisini ve güzel hayat görüşlerini esirgemeyen, tecrübelerini değerli bilgi birikimlerini enerjisini benimle paylaşan en az danışmanım kadar üzerimde emeği olan kıymetli hocam Prof. Dr. Hülya YILMAZ-AYDOĞAN'a

Yıllardır bitmeyen bir sabırla maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen canım annem Zehra PEHLEVAN ve sevgili babam Sedat PEHLEVAN'a

Her zorlu anımda, üzüntümde ve mutluluğumda destekleri ile yanımda olan canım teyzelerim Zekiye GÜLERYÜZ ve Safiye GÜLERYÜZ'e

Her adımda desteğini arkamda hissettiğim, zorlu süreçlerimde anlayışını ve sevgisini benden esirgemeyen, başarılarımı destekleyen sevgili nişanlım Mehmed Mazhar KARABIYIK'a

Laboratuvardaki her konuda, her aşamada bilgi birikimini benden esirgemeyen, her türlü konuda başım sıkıştığında yanımda olan desteğini ve sevgisini hep hissettiğim çok sevgili arkadaşım Msc. Begüm CEVİZ'e

Laboratuvarda birlikte çalıştığım, yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen yalnızca tezim için değil her türlü konuda daima destek olan sevgili arkadaşlarım Phd. Allison Pınar ERONAT, Msc. Gonca CANDAN, Phd. Gülçin ÖZKARA, Msc. Fidan MALİKOVA ve Phd. Kubilay KINOĞLU'na

Tezimin yazım ve yapım aşamasında her türlü desteği gösteren arkadaşlarım Msc. İncilay ÇELİK ve Msc. Çağatay AYDOĞAN'a

Bu zorlu süreçte her konuda desteğini hep arkamda hissettiğim her zorluğumda yanımda olan sevincimi üzüntümü paylaşan bir çalışma arkadaşından öte kardeş gibi olan canım arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Nurcihan TAN ERKOÇ'a,

Doktoranın başından beri arkadaşlığını dostluğunu bilgisini her türlü destek ve sevgisini kardeşliğini esirgemeyen canım arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Hilal EREN GÖZEL'e,

Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. İlhan Yaylın ve tüm AD. Öğretim üyelerimize teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 32461



İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	3
İTHAF.....	4
TEŞEKKÜR.....	5
İÇİNDEKİLER	7
TABLolar LİSTESİ.....	10
ŞEKİLLER LİSTESİ	11
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	13
ÖZET	18
ABSTRACT.....	19
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	20
2. GENEL BİLGİLER	23
2.1. Kanser	23
2.1.1. Meme Kanseri	25
2.1.1.1. Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri	25
2.1.1.2. Patofizyolojisi	26
2.2. Hücre Döngüsü	30
2.2.1. Siklin Aileleri ve Siklin Bağımlı Kinazlar	31
2.2.2. Kontrol Noktaları	32
2.2.3. Hücre Döngüsü Evreleri.....	33
2.2.3.1. G1 evresi;	33
2.2.3.2. S Evresi	35
2.2.3.3. G2.....	36
2.3. Apoptoz.....	36
2.3.1. Apoptozdaki Morfolojik Değişiklikler.....	38
2.3.2. Apoptozdaki Biyokimyasal Değişiklikler	39
2.3.3. Apoptozun Mekanizması	40
2.3.4. Apoptozun Düzenlenmesi	40
2.3.4.1. Dıştan Gelen Uyarıların Tetiklediği Apoptoz	40
2.3.4.2. İçsel Mitokondriyal Apoptoz	41
2.3.4.3. Ortak Yol.....	44

2.3.4.4. Kaspaz Mekanizması	45
2.3.5. Apoptoz ve Karsinogenez	46
2.4. Oleuropein'den Zengin Zeytin Yaprağı Ekstraktı	46
2.4.1. Antikanser Etkileri	48
2.5. Karnosik Asitten Zengin Biberiye Ekstraktı	51
2.5.1. Anti Kanser Etkisi	52
2.6. Salisilik Asit	55
2.6.1. Antikanser Etkisi	57
3. GEREÇ VE YÖNTEM	59
3.1. Gereçler	59
3.1.1. Kullanılan Cihazlar,	59
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Sarf Malzemesi ve Kitler,	59
3.2. Yöntemler	60
3.2.1. Hücrelerin Çoğaltılması	60
3.2.2. Hücrelerin Sayılması ve Ekilmesi	60
3.2.3. WST-1 ile Sitotoksikite Testi	60
3.2.4. Apoptoz Tayini	61
3.2.5. RNA İzolasyonu	61
3.2.6. RNA Miktarının Spektrofotometrik Yöntemle Ölçülmesi	62
3.2.7. cDNA Çevrimi	62
3.2.8. Gerçek Zamanlı PCR İle Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi	63
3.2.9. İstatistiksel veriler ve Analizler	64
4. BULGULAR	65
4.1. Hücre Canlılığı WST-1 Deneyi Bulguları	65
4.1.1. Karnosik Asitten Zengin Bitki Özütü Uygulanması	65
4.1.2. Oleuropeinden Zengin Bitki Özütü Uygulanması	67
4.1.3. Salisilik Asit uygulanması	69
4.1.4. 3'lü Kombin Dozun Uygulanması	71
4.2. Annexin V analizi bulguları	74
4.3. PCR Bulguları	77
5. TARTIŞMA	79
KAYNAKLAR	89
HAM VERİLER	101

FORMLAR	102
ETİK KURUL KARARI	103
PATENT HAKKI İZNİ	104
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	105



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: cDNA çevrimi reaksiyon bileşenleri.....	62
Tablo 3-2: cDNA çevrimi inkübasyon koşulları	63
Tablo 3-3: Gerçek zamanlı PCR Reaksiyon bileşenleri	63
Tablo 3-4: Gerçek zamanlı PCR reaksiyon koşulları	64
Tablo 4-1: Karnosik Asitten Zengin Biberiye Ekstraktının saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması.....	66
Tablo 4-2: Karnosik asitten zengin biberiye özütünün saatlere göre MCF-10A hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması.....	67
Tablo 4-3: Oleuropeinden zengin bitki özütünün saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması.....	68
Tablo 4-4: Oleuropeinden zengin bitki özütünün saatlere göre MCF-10A hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması.....	69
Tablo 4-5: Salisilik asitin saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması.....	70
Tablo 4-6: Salisilik asitin saatlere göre MCF-10A hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması.....	71
Tablo 4-7: 3'lü karışım dozun saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması	72
Tablo 4-8: 3'lü karışım dozun saatlere göre MCF-10A hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması.....	73
Tablo 4-9: Tekli madde uygulamaları sonrasında belirlenen IC50 değerleri (µg/ml)....	73
Tablo 4-10: 3'lü karışım uygulanmış MDA-MD-231 hücrelerinin Annexin V analizi sonucunda belirlenen Ortalama ve p değerleri	75
Tablo 4-11: MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 3'lü karışım uygulanan dozlu ve uygulanmayan (dozsuz) hücrelerdeki APAF-1, BAX, BCL-2 ve CDK-2 ekspresyon kat değişimi.....	77
Tablo 5-1: 3'lü karışım uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında Ekspresyon kat değişim sonuçları.....	85

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: 2019 Ölüm Nedeni İstatistikleri	24
Şekil 2-2: Hücre döngüsü kontrol noktaları ve Siklin Düzenlenmesi	31
Şekil 2-3: Hücre döngüsü kontrol noktaları ve düzenlenmesi	33
Şekil 2-4 Hücre döngüsü regülasyonunda bazı temel adımların şematik bir görünümü	35
Şekil 2-5: Normal hücre, apoptotik ve nekrotik hücre karşılaştırması	37
Şekil 2-6: Apoptozun iç ve dış yolağı.....	44
Şekil 2-7: Oleuropein yapı iskeleti	48
Şekil 2-8: Oleuropeinin apoptoz yolağı üzerine etkileri	51
Şekil 2-9: Karnosik asitin apoptoz yolağındaki etkilerinden bazıları.....	54
Şekil 2-10: Aspirin metabolizması yolu	56
Şekil 4-1: Karnosik Asitten Zengin Bitki Özütünün MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattına etkisi	65
Şekil 4-2: Oleuropeinden zengin bitki özütünün MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattına etkisi.....	68
Şekil 4-3: Salisilik Asitin MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hattına etkisi.....	70
Şekil 4-4: 3'lü karışımın MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hattına etkisi.....	72
Şekil 4-5:MDA-MB-231 hücre hattında kontrol (doz verilmemiş) 3'lü karışım uygulanması apoptoz analizi sonuçları dot plot görüntüleri	74
Şekil 4-6: MDA-MB-231 hücre hattında %50 3'lü karışım uygulanması apoptoz analizi sonuçları dot plot görüntüleri.....	74
Şekil 4-7: MDA-MB-231 hücre hattında %75 3'lü karışım uygulanması apoptoz analizi sonuçları dot plot görüntüleri.....	75
Şekil 4-8: 3'lü karışım uygulanmış MDA-MD-231 hücrelerinin morfolojik farklılıkları	76
Şekil 4-9: MDA-MB-231 hücre hatlarında 3'lü karışım uygulanan dozlu ve uygulanmayan (dozsuz) hücrelerdeki APAF-1, BAX, BCL-2 ve CDK-2 ekspresyon kat sayı değişimi	78
Şekil 4-10: MCF-10A hücre hatlarında 3'lü karışım uygulanan dozlu ve uygulanmayan (dozsuz) hücrelerdeki APAF-1, BAX, BCL-2 ve CDK-2 ekspresyon kat sayı değişimi	78
Şekil 5-1: Apoptoz Sinyal Yolağı.....	84
Şekil 5-2: MDA-MB-231 hücre hattında 3'lü karışımın apoptoz yolağındaki etkileri ...	86

Şekil 5-3: MCF-10A hücre hattında 3'lü karışımın apoptoz yolağındaki etkileri..... 87



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

5-FU	f 5-fluorouracil
AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör (Apoptosis Inducing Factor)
APAF-1	Apoptotik Proteaz Aktive Eden Faktör-1
APC	Anafaz Destekleyici Kompleks
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA Düzenleyici Katalitik Polypeptide-benzeri (Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide-like)
ARF	ADP-ribozil Faktör
ATG	Otofaji İlişkili Gen (Autophagy-related genes)
ATM	Ataksi Telenjipektazi Geni (Ataxia Telangiectasia Mutated)
ATP	Adenozin trifosfat
B2M	Beta-2-Mikroglobulin
BAD	Bcl-2 İlişkili Protein X
BAX	Bcl-2 İlişkili Protein X
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BID	BCL-2 Etkileşim Domaini
BL1	Bazal benzeri 1
BL2	Bazal benzeri 2
BRCA1	Meme Kanseri Proteini Tip 1 (Breast Cancer Type 1)
BRCA2	Meme Kanseri Proteini Tip 2 (Breast Cancer Type 2)
Bub	Benomil
Cdc20	Hücre bölünme kontrolü 20(Cell division control 20)
Cdc25	Hücre bölünme kontrolü 25 (Cell division control 25)
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz (Cyclin Dependent Kinase)
CDK-2	Siklin Bağımlı Kinaz 2(Cyclin Dependent Kinase 2)
c-FLIP	Cellular FLICE-inhibitory protein
Chk1	Kontrol Noktası Kinaz Protein 1 (Checkpoint Kinase 1)
Chk2	Kontrol Noktası Kinaz Protein 2 (Checkpoint Kinase 2)

Cip / Kip	Siklin bağımlı-CDK inhibitör ailesi, CDK ile etkileşime giren protein (CDK-interacting protein)
CKI	CDK inhibitörleri
COX-1	Siklooksigenaz-1 (Cyclooxygenase-1)
COX-2	Siklooksigenaz-2 (Cyclooxygenase-2)
Cp	Threshold Cycle
cyt c	sitokrom c
DAPK	Ölümle İlişkili Protein Kinaz
DCIS	Duktal Carcinoma in Situ
DD	Ölüm alanı
DISC	Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DR3	Ölüm Reseptörü 3
DR4	Ölüm Reseptörü 4
DR5	Ölüm Reseptörü 5
DTMP	Deoxythymidine Monophosphate
E2F	Elongasyon faktör 2f
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGF	Epitelyal büyüme faktörü (Epidermal growth factor)
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü (Epidermal growth factor reseptor)
ER	Östrojen reseptörü
ErbB2	epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
ERK	Hücre Dışı Sinyal ile Regüle Kinaz (extracellular-signal-regulated kinase)
ESR1	Östrojen Reseptörü 1
FADD	Fas ilişkili DD
FasL	Fas Ligant
FasL/FasR	Fas Ligant/Fas Reseptör
FASN	Yağ Asidi Sintaz Enzimi

FasR	Fas Reseptör
FBS	Fetal Bovin Serum
FGFR4	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 4 (Fibroblast growth factor reseptor 4)
FOXA1	Forkhead box A1
G1	Aralık 1
G2	Aralık 2
G6PD	Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz
Gadd45	büyüme durması ve DNA hasarı ile indüklenebilir gen
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GCNT3	Glukozaminil (N-Asetil) Transferaz 3
GPER	G protein-coupled estrogen receptor 1
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
HIF-1alfa	Hypoxia inducible factor-1 alfa
HR	Hormon reseptörleri
HSG1	Heat shock-induced gene 1
HT	Hidroksitirosol
IC50	%50 inhibisyon konsantasyonu (The half maximal inhibitory concentration)
IDC	İnfiltratif Duktal Karsinom
IHC	İmmünohistokimyasal
KA	Karnosik asit
LCIS	Lobular Carcinoma in Situ
LDH-A	Laktat dehidrogenaz A
LDH-B	Laktat dehidrogenaz B
M	Mitoz
Mad	Mitotik tutuklama eksikliği
MAP3KI	Mitojen Aktive Protein Kinaz Kinaz Kinaz 1 (Mitogen Activated Protein Kinaz Kinaz Kinaz 1)
Mdm2	Mouse Double Minute 2

MDM2	Mouse Double Minute 2 Homolog
MMP	Matris Metalloproteinazlar
MSL	Mezenkimal kök benzeri
Mtor	Mammalian Target of Rapamycin
NBS1	Nijmegen kırılma sendromu 1
NCCD	Nomenklatür Hücre Ölümü Komitesi
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NPAT	ATM lokusuna eşlenen nükleer protein
NST	Non-spesifik tip
NuMA	Nuclear mitotic apparatus
p53 (TP53)	Tümör Protein 53
p-Akt	Fosforillenmiş Akt
PARP	Poli Adp-Riboz Polimeraz (Poly Adp-Ribose Polymerase)
PBS	Fosfat Dengeli Salin Solüsyonu
PCNA	Prolifere hücre nükleer antijen
PGM	Fosfoglukomutaz (Phosphoglucomutase)
PI3K/PI3 Kinaz	Fosfotidil İnoзит 3 Kinaz
PIK3CA	Fosfotidil İnoзит 4,5 Bifosfat 3 Kinaz Katalitik Ünite Altbirim Alfa
PKM2	Piruvat Kinaz M2
PR	Progesteron reseptörü
PS	fosfatidilserin
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
R noktası	Restriction Point
RA	Rosmarinik asit
Rb	Retinoblastoma Proteini
RIP	Receptor-interacting protein
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Serbest Oksijen Radikalleri (Reactive Oxygen Species)
S	Sentez
SA	Salisilik asit

STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TGF	Tümör büyüme faktörünün (TGF)
TIMPS	Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri
TK1	Timidin Kinaz Enzimi
TMS	Timidilat Sentetaz Enzimi
TNF	tümör nekroz faktörü
TNF-a/TNFR1	Tümör Nekroz Faktör Alfa/Tümör Nekroz Faktör Reseptör 1
TNF-R1	Tümör Nekroz Faktör Reseptör 1
TRADD	TNFR-ilişkili DD
TRAIL-R1	Tümör nekroz faktör (TNF) ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand resöptör 1
TRAIL-R2	Tümör nekroz faktör (TNF) ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand resöptör 2
WST-1	Suda çözünen tetrazolyum tuzları-1 (Water soluble tetrazolium salts)
XPB1	X-box Binding Protein 1

ÖZET

PEHLEVAN, F. (2022). Meme Kanseri Hücrelerinde Karnosik Asit ve Oleuropeinden Zengin Bitki Özütleri Ve Salisilik Asitin Sitotoksik Ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser çeşididir. Üçlü negatif olarak adlandırılan agresif meme kanserinin standart tedavi seçenekleri reseptör kayıpları ve tümör homejenitesi sebebi ile çok etkin sonuçlar vermemekte veya kısa sürede direnç oluşmaktadır. Bitkilerin ikincil metabolitleri ve bitki özleri ile yapılan bazı çalışmalarda agresif kanser hücrelerinde hücre çoğalmasının azalması ve hücre ölümüne gidişin artması gözlemlenmiştir. Çalışmamızda üçlü negatif meme kanserini temsil eden MDA-MB-231 hücre hattı ve fibroblast benzeri MCF-10A kontrol hücre hatlarına Karnosik asit ve Oleuropeinden zengin bitki özütleri ve Salisilik asit bireysel ve kombin olarak uygulanmış ve sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. WST-1 analizi ile yapılan analizde sözkonusu maddelerin bireysel uygulamalarının sitotoksikite ile sonuçlandığı gözlemlenmiştir ($p < 0,0001$). Tekli IC50 değerlerine göre oluşturulan 3'lü karışımın IC50 değeri ba z alınarak (%50) yapılan analizde kombin madde uygulanması da MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksikite ile sonuçlanmıştır. Annexin V deneyleri sitotoksik etkinin apoptoz kaynaklı olduğunu doğrulamıştır ($p < 0,005$). Uygulanan 3'lü karışımın hücre apoptoz ve hücre döngüsü yolağında görev yapan APAF-1, BCL-2, BAX ve CDK2 ekspresyon değişimleri RT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde APAF-1'de 17,5 kat olmak üzere BCL-2 12,2 kat, BAX 2,7 ve CDK2 2,1 kat olarak ekspresyonlarında artış gözlemlenmiştir. Karnosik asit, Oleuropeinden zengin bitki özütleri ve Salisilik asit'in bireysel ve kombin uygulamalarının agresif meme kanseri hücre hattında etkin sitotoksik potansiyelini gösteren bulgularımız sözkonusu doğal biyoaktif maddelerin kemoterapiye yardımcı ve preventif olarak kullanılabileceğini de vaat etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Agresif Meme Kanseri, Karnosik asit, Oleuropein, Salisilik asit, MDA-MB-231

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 32461

ABSTRACT

PEHLEVAN, F. (2022). Investigation of Cytotoxic and Apoptotic Effects of Carnosic Acid and Oleuropein-Rich Plant Extracts and Salicylic Acid in Breast Cancer Cells. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Molecular Medicine. Doctoral Thesis. Istanbul.

Breast cancer is the most common type of cancer in women. Standard treatment options for the most aggressive breast cancer, triple negative, do not give very effective results due to loss of receptors and tumor homogeneity, or resistance occurs shortly. In some studies with secondary metabolites of plants and plant extracts, a decrease in cell proliferation and an increase in cell death have been observed in aggressive cancer cells. In our study, Carnosic acid and Oleuropein rich plant extracts and Salicylic acid were applied individually and in combination to MDA-MB-231 cell line representing triple negative breast cancer and fibroblast-like MCF10-A cell line as control to evaluate their cytotoxic effects. WST-1 analysis showed that the individual applications of these substances resulted in cytotoxicity ($p < 0.0001$). In the analysis based on the IC₅₀ value of the triple mixture formed according to the single IC₅₀ values (50%), the application of the combined substance also resulted in cytotoxicity in MDA-MB-231 cells. Annexin V analysis confirmed that the cytotoxic effect was due to apoptosis ($p < 0.005$). The expression changes of APAF-1, BCL-2, BAX and CDK2, which are involved in the cell apoptosis and cell cycle pathway, induced by the applied triple mixture were determined by RT-PCR method. In MDA MB 231 cells, increase in the expression of APAF-1 was observed as 17.5 fold, BCL-2 as 12.2 fold, BAX 2.7 and CDK2 as 2.1 fold. Our findings showing the effective cytotoxic potential of individual and combined applications of carnosic acid, Oleuropein-rich plant extracts and Salicylic acid in aggressive breast cancer cell line also indicate that these natural bioactive substances can be used as an adjunct and preventive to chemotherapy.

Key Words: Aggressive Breast Cancer, Carnosic acid, Oleuropein, Salicylic acid, MDA-MB-231

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 32461

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada en yaygın kanserlerden biri olan meme kanseri kadınlarda kansere bağlı mortalitenin başlıca nedenidir. Meme kanseri tedavisinde hedefli tedavi, hormonal tedavi, radyoterapi, cerrahi ve kemoterapi gibi farklı stratejiler kullanılmaktadır (Akram ve ark. 2017). Ancak tedavi yöntemlerindeki sürekli gelişmelere rağmen meme kanseri, kanser kaynaklı ölümlerde tüm cinsiyetlerde beşinci sırada ve kadınlarda birinci sıradaki yerini korumaktadır (Dünya Sağlık Örgütü, Kanser verileri 2020).

Meme kanseri tedavisinin yaşam kalitesini etkileyen yan etkileri ve kemoterapötik ilaçlara karşı direnç gelişimi, araştırmacıları alternatif tedavi yöntemleri aramaya yönlendirmiştir. Bu nedenle çalışmalar meme kanserinin tedavisinde antikanser potansiyeli olan çeşitli bitkilerin doğal bir alternatif olarak kullanılabilirliklerini araştırmaya yönelmiştir (Akram ve ark. 2017).

Bitkilerde fizyolojik süreçler için gerekli olan çeşitli hücresel fonksiyonlara hizmet etmek için büyüme koşullarına göre değişen çok sayıda ikincil metabolitler üretilir. Bir bitki tarafından üretilen ikincil moleküllerin tipi ve konsantrasyonları; türü, genotipi, fizyolojisi, gelişim aşaması ve büyüme sırasındaki çevresel faktörler tarafından belirlenir (Isah 2019). Son yıllarda ikincil metabolitlerin üretimlerinde stres ve savunma tepkisi sinyalinin etkili olduğunu gösteren kanıtlar artmaktadır. Bu metabolitlerin nörodejeneratif hastalıklarda (Pohl ve Kong Thoo Lin 2018) ve inflamatuvar süreçlerde (Serafini ve ark 2010) etkileri üzerine çok sayıda çalışmalar yapılmış ve pek çok hastalık için potansiyel tedavi edici, semptom giderici özelliklere sahip olduklarını gösteren sonuçlar elde edilmiştir.

Çeşitli kanser tedavilerinde de ikincil bitki metabolitleri doğal biyoaktif bileşikler olarak önerilmektedir (Seca ve Pinto 2018). Farklı kimyasal yapılara sahip bu metabolitler arasında yer alan özellikle fenolik bileşikler, terpenoidler, alkaloidler ve kükürt içeren bileşiklerin potansiyel çok hedefli antikanser ajanları olarak işlev gördükleri ve bu nedenle umut verici antikanser aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (Fakhri ve ark. 2020).

Çalışmamızda antikanserojenik etkilerini incelediğimiz doğal ürünlerden biberiye ve adaçayıda bulunan benzenediol diterpen yapıdaki ikincil bitki metaboliti olan Karnosik asitin antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri bilinmektedir. Daha sonra, onkoloji alanında hem in vivo hem de in vitro olarak karnosik asitle yapılan çok sayıda çalışmada antikanserojenik etkileri değerlendirilmiştir (Bahria ve ark. 2016). Bu çalışmalarda karnosik asitin insan renal karsinoma hücrelerini apoptoza duyarlı hale getirebileceği (Jung ve ark. 2015), hepatoselüler karsinom hücrelerini apoptotik ölüme yönlendirdiği (Zhang ve ark. 2017), ve östrojen-negatif meme kanseri hücre hatlarında zerdeçal ile beraber etki göstererek büyümeyi durdurduğu belirtilmiştir (Einbond ve ark. 2012).

Araştırmamızda yer alan diğer doğal ürün olan Salisilik asit, beyaz söğüt ve kestane yapraklarının kabuğundan elde edilen bir bileşik olup bakteristatik, mantar öldürücü ve keratolitik etkilere sahiptir. Kardiyoprotektif özellikleri iyi bilinen salisilik asitin, kanser önleyici ajan olarak da işlev yapabileceği önerilmektedir (Alfonso ve ark. 2014). Son çalışmalarda aspirinin insan üçlü negative MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında tümör baskılayıcı protein p53'ü asetilize ettiği ve hedef genlerin ekspresyonunu indüklediği gösterilmiş ve aspirin tedavisinin kanser metabolizmasında önemli glikolitik yolda yer alan altı enzimin asetillenmesine neden olduğu saptanmıştır (Guoqiang ve ark. 2016). Lactobacillus rhamnosus GG ile kombine uygulandığında salisilik asitin insan kolon (HT-29) ve prostat (PC-3) kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri belirlenmiştir (Celebioglu 2021). Son yıllarda yapılan bir meta analiz çalışmasında ise aspirin kullanımının meme kanseri riskinde %9 azalma sağladığı rapor edilmiştir (Cao ve Tan 2020).

Çalışmamızda yer alan zeytin ağacının temel fenolik bileşiği olan oleuropein ise, antioksidan ve vazodilatatif etkilere sahiptir. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında oleuropeinden zengin zeytin yaprağı ekstraktının melanoma, kolon ve meme kanseri gibi çeşitli solid tümörlerde ve kronik miyeloid lösemide yüksek glikolitik aktiviteyi azaltabildiği gösterilmiş ve metabolik inhibitör aktivitesi bu doğal ürünün çok çeşitli malignitelerin geleneksel tedavisinin desteklenmesinde kullanılabileceği önerilmiştir (Ruzzolini ve ark. 2020).

Tez çalışmamızda yukarıda belirtilen özellikleri sebebi ile karnosik asitten zengin biberiye özütünün, oleuropeinden zengin zeytin yaprağı özütünün ve salisilik

asitin MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattında ve kontrol olarak tümörojenik- olmayan fibrokistik meme epitel hücre hattında (MCF10A) tekli ve kombine sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştırarak meme kanserindeki antikanserojen etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Ayrıca bu biyoaktif bileşenlerin kombine dozlarda tedavi edilen ve tedavi edilmeyen hücre hatlarında apoptoz nekroz değerlerinin karşılaştırılması ve sonrasında anti apoptotik BCL-2 ve hücre döngüsünü kontrol eden Siklin Bağımlı Kinaz 2 (CDK-2) proteinleri ile pro-apoptotik Bcl-2 ilişkili Protein X (BAX) ve Apoptotik Proteaz Aktive Eden Faktör-1 (APAF-1) proteinlerinin mRNA seviyeleri belirlenmesi ile olası antikanserojen etkilerinin gerçekleşmesinde bu yolların kullanımı ve temel etki mekanizmalarının aydınlatılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanserin pek çok farklı tanımı olsa da ortak olarak anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması ile karakterize edilen bir grup hastalık olarak tanımlanabilir. Kanser ilk olarak vücut hastalığı sonra doku ardından da hücrelerin düzensiz çoğalması ile ilişkili bir hücre hastalığı olarak ele alınmıştır (Baran 2021 p1). Bulaşıcı hastalıkların, parazitlerin ve birçok çevresel hastalığın aksine, kanser birincil olarak vücudumuza yabancı olan bazı organizmalardan değil organizmanın kendi hücrelerinin kontrolden çıkması ile ilişkilidir (Hausman 2019).

Kanserler, çok hücreli canlıları 200 milyon yıldan fazla bir süredir etkilemiştir ve modern insanların atalarında da kanserlerin var olduğuna dair kanıt vardır. Paleontolojik çalışmalar hayvanlarda bulunan kanserlerin insandan çok daha önce de dünyada varlığına işaret etmektedir. Yazılı kaynaklara göre kanserin en eski yazılı tanımı, M.Ö. 3000 civarında yazılmış olan Edwin Smith Papirüsünde bulunur. Memenin şişkin tümörünün ciddi bir hastalık olduğu ve bunun için bir tedavi olmadığı yorumlanan yazı ilk tanımlanan kanser çeşidinin meme kanseri olduğunu göstermektedir. Yine yumuşak doku tümörüne ilk referansı içeren M.Ö. 1500 yıllarına ait Ebers Papirüsü olası cilt, rahim, mide ve rektum kanserlerine atıfta bulunmaktadır (Hajdu 2010). Görüldüğü üzere, tarihsel olarak günümüze kadar 5000 yıldır pek çok bilim insanı tarafından açıklanmaya ve tedavi edilmeye çalışılmış kanser günümüzde hayatı tehdit edici hastalıklar arasında yerini korumaktadır.

Meme kanseri, kanser tiplerinin arasında 2 milyonun üstünde vaka ile ilk sırada yer almaktadır. Kanser kaynaklı ölümlerde ise tüm cinsiyetlerde 5. sırada yer alırken kadınlarda ise 1. sırada bulunmaktadır (Dünya Sağlık Örgütü, Kanser verileri 2020). Türkiye istatistiksel verileri de 2018 ve 2019 yıllarında ölüm sebeplerinde kanserin ikinci sırada yer aldığını (Şekil 2.1.1) göstermektedir (Türkiye İstatistik Kurumu Türkiye Ölüm Nedenleri 2018-2019)



Şekil 2-1: 2019 Ölüm Nedeni İstatistikleri

(<https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2019-33710>)

2020'de dünya çapında tahmini 19,3 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 10,0 milyon kanser ölümü meydana gelmiştir. Kadın meme kanseri ise 2020'de en sık teşhis edilen kanser olarak akciğer kanserini geride bırakmıştır (Sung ve ark. 2021).

Tümörler farklı doku ve organlardan kökenlenebilirler, bu nedenle pek çok farklı kanser türü tanımlanmıştır (Carlberg ve Valleuer, 2021 p-17). Kanser çoğu durumda, onkogenlerin aktivasyonu ve/veya tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna, kontrolsüz hücre döngüsü ilerlemesine ve apoptotik mekanizmaların inaktivasyonuna yol açar. Benign tümörlerin aksine, malign kanserler, kısmen dokuya özgü hücre-hücre bağlanması için gerekli hücre yapışma reseptörlerinin aşağı regülasyonu ve hücre hareketliliğini artıran reseptörlerin yukarı regülasyonu sayesinde metastaz yeteneği kazanırlar. Ek olarak, membran metalloproteazlarının aktivasyonu, metastatik kanser hücrelerinin yayılması için fiziksel bir yol sağlar. Bu genetik ve hücresel değişikliklerin meydana geldiği farklı mekanizmalar belirlenmiştir. Genel kabul edilen mekanizmalar, mutasyon, kromozomal translokasyon veya delesyon ve sinyal yollarının düzensiz ekspresyonu veya aktive olmasıdır. Bu olaylar, düzensiz hücre döngüsünü destekleyen ve/veya apoptotik yolları inaktive eden genleri aktive edebilir (Sarkar ve ark. 2013). Hepsinde hücre bölünmesinin ve farklılaşmasının kontrolü kaybolmakta böylece tek bir hücre uygunsuz bir şekilde çoğalarak primer tümörü oluşturmaktadır. (Carlberg ve Valleuer, 2021 p-17)

2.1.1. Meme Kanseri

Meme; pektoral kasın üzerinde bulunan deri, yağ, fasiyal tabakalar, cooper bağları, fibroglandüler doku, lenfatikler ve nörovasküler yapılardır. Erkeklerde meme parankimi genellikle sadece yağdan oluşur ve fibroglandüler doku yoktur. Kadınlarda fibroglandüler doku hacimleri yaşa göre değişir, birçok kadında menopozdan sonra göğüslerinde yağ doku artışı gözlemlenir (Jesinger, 2014).

Hangi hücrelerin etkilendiğine bağlı olarak çeşitli meme kanseri türleri vardır; memelerdeki üç ana kısım lobüller, kanallar ve bağ dokusudur. Lobüller sütün üretildiği yerlerdir, kanallar ise sütü meme ucuna taşır. Bağ dokusu her şeyi çevreler ve bir arada tutar. Çoğu kanser lobüllerde veya kanallarda meydana gelir ve kan damarları yoluyla vücudun diğer organlarına yayılabilir.

2.1.1.1. Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Türkiye verilerine göre meme kanseri tüm cinsiyetlerde 2. en sık görülen kanser türü iken kadınlarda ise en sık görülen kanser türü olarak yer almaktadır. Mortalite oranları ise dünya ile aynı şekilde sıralanmaktadır. (Dünya Sağlık Örgütü, Kanser verileri 2020).

Mevcut verilere bakıldığında gelir seviyesi yüksek ülkelerde ölüm oranları gelir seviyesi düşük ülkelere oranla daha düşüktür. Bu değişimin sebebi özellikle erken teşhis ve tedavi imkanlarına erişim ve değişen risk faktörleri olması muhtemeldir (Winter ve ark. 2017 pp 1-32) Bu eğilimleri ve çeşitli popülasyonlarda meme kanserinin farklı insidans oranlarını açıklamak için birçok faktör araştırılmaktadır. Uzun süredir araştırılan Meme Kanseri Proteini Tip 1 (BRCA1) ve Meme Kanseri Proteini Tip 2 (BRCA2) genlerindeki mutasyonlar meme kanseri için genetik risk faktörü olarak ilişkilendirilmiştir. Diğer risk faktörleri arasında ırk, menstrüasyon değişiklikleri (erken yaşta başlayan menstrüasyon veya gecikmiş menopoz), üreme (ilk doğumun geç yaşta olması), hormonal değişiklikler, doğum kontrol hapları (Ahmad 2019 p29), menopoz döneminde hormon kullanımı, alkol alımı, tütün kullanımı ve obezite yer almaktadır. Emzirme ve fiziksel aktivite ise meme kanserine karşı koruyucu faktörler arasında kabul edilmektedir. İlginç bir şekilde, düşük insidanslı yerleşim alanlarından yüksek insidanslı yerleşim alanlarına göç eden bireylerde sonradan insidansın yükseldiği gözlenmiş ve bu nedenle çevresel, diyet gibi faktörlerin meme kanseri gelişimini desteklediği bildirilmiştir. (Ahmad 2019 p29; Winter ve ark. 2017 pp 1-32)

2.1.1.2. Patofizyolojisi

Geçen yüzyılın başlarında hastanın meme malignitesi olduğunun bilinmesi yeterliydi ve tüm hastalara tek tip tedavi uygulanıyordu. Ancak zamanla, aynı kanser tipine sahip hastaların değişen prognoz gösterdiğinin gözlemlenmesi ve son 50 yılda patoloğlar tarafından farklı morfolojik varyantların, artan formlarının tanımlanması meme kanseri sınıflandırması hakkında tartışmaya yol açmıştır. Çok farklı varyantların keşfi ile birlikte, bu varyantların biyolojik olarak önemli olup olmadığı şüpheyile yaklaşılacak bir konu olmuştur. Hatta bu durumun patoloğun kendi tercihlerinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Eliyatkin ve ark. 2015). Fakat yapılan çalışmalar ve vakalar göstermiştir ki meme kanserleri heterojendir, değişken morfolojik ve biyolojik özellikler gösterir ve bu nedenle farklı klinik davranış sergileyerek tedaviye farklı yanıt verir (Tsang ve Tse 2019). Tüm bu farklılıkların temelinde, spesifik belirteçlerin yokluğu ve meme dokusunun epitelyal hücresel gelişiminin tam olarak anlaşılabilmesi yatmaktadır. Ancak gen ekspresyon profili gibi moleküler tekniklerin gelişmesiyle birlikte “meme kanserinde heterojenlik” kavramı artık genel-geçer bir görüş olarak kabul görmüştür. Bu gelişmelerin ışığında meme kanseri sınıflandırmasında yeni bir “taksonomi” geliştirilmiştir. Her iki sınıflandırmayı birlikte alarak yapılan yeni sınıflandırma ile hedefe yönelik tedaviler ve daha da önemlisi kişiye özel tedavi programları mümkün hale gelmiştir (Tsang ve Tse 2019). Meme kanseri histolojik olarak in situ karsinom ve invaziv karsinom olarak geniş bir şekilde kategorize edilebilir. Ayrıca meme karsinomu bulunduğu yere göre duktal (DCIS; daha yaygın) veya lobüler (LCIS; daha az yaygın) olarak alt sınıflara ayrılır. DCIS, tümörün özelliklerine dayalı olarak, komedo, kribiform, mikropapiller, papiller ve katı olarak karakterize edilen beş alt tipe ayrılmıştır. Benzer şekilde, invaziv karsinomlar; infiltratif duktal (IDC), invaziv lobüler, duktal/lobüler, müsinöz (kolloid), tübüler, medüller ve papiller karsinomları içeren histolojik alt tiplere ayrılan heterojen bir tümör grubudur. İnvaziv karsinomlar arasında IDC, tüm invaziv lezyonların %70-80'ini oluşturan en yaygın alt tiptir. IDC ayrıca nükleer pleomorfizm, glandüler/tübül oluşumu ve mitotik indeks seviyelerine dayalı olarak iyi farklılaşmış (derece 1), orta derecede farklılaşmış (derece 2) veya zayıf farklılaşmış (derece 3) olarak alt sınıflara ayrılır (Ahmad 2019 p55).

Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (ErbB2-Her2/neu) gibi belirli belirteçlerin prognostik değeri, meme kanseri

alt tiplerinin moleküler bir sınıflandırmasını sağlamak için kullanılmıştır. in Situ Duktal Karsinoma DCIS için kullanılsa da sınıflandırmanın İnfiltratif Duktal Karsinom (IDC) için yüksek prognostik ve prediktif önemi olduğu gösterilmiş tüm invaziv karsinomlarda belirlenmesi önerilmiştir. ER, PR ekspresyonunu ve ErbB2 (HER2/neu) varlığına veya yokluğuna göre Luminal A (ER ve/veya PR pozitif ve HER2 negatif); Luminal B (ER ve/veya PR pozitif ve HER2 pozitif); HER2 ile zenginleştirilmiş (ER ve PR negatif ve HER2 pozitif) ve Bazal Like (Üçlü negatif meme kanseri ER, PR ve HER2 negatif) şeklinde alt tiplere ayrılmaktadır. Üçlü negatif meme kanserleri, diğer meme kanseri türlerinin çoğundan daha hızlı büyür ve yayılır. Luminal A ve B ve HER2 ile zenginleştirilmiş alt tipleri olan hastalar hedefe yönelik tedavilere duyarlıyken, üçlü negatif özelliği olan hastalar kötü prognoz gösterir. Bu belirteçlerin durumu, hangi hastaların hedefe yönelik tedavilere (yani, ER+/PR+ hastaları için tamoksifen veya aromataz inhibitörleri ve HER2/neu hastaları için trastuzumab veya lapatinib) yanıt verme olasılığının belirlenmesine yardımcı olurken, üçlü negatif hastalara alternatif olarak yalnızca kemoterapi uygulanmaktadır (Ahmad 2019 p56). Meme kanseri alt tiplerin belirlenmesinde ER, PR ve HER2 proteinlerinin yanısıra Luminal A'yı luminal B ayırıcı tanısı için Ki67 ekspresyonu da kullanılmaktadır (Maggie ve ark. 2009)

Ki-67, G0 haricinde hücre döngüsünün tüm aşamalarında ifade edilen bir nükleer çoğalma belirteçidir. Genel olarak, yüksek düzeyde Ki67 sentezlenen meme kanserlerinin daha kötü prognoza sahip olduğu bildirilmiştir (De Azambuja ve ark. 2007).

Luminal alt tipinin ayırt edici özelliği ER ekspresyonudur. “Luminal” adı, bu tümörler tarafından ifade edilen genler ile memenin luminal epitel hücreleri tarafından eksprese edilen genler arasındaki benzerlikten türetilmiştir. Luminal tümörlerin çoğunluğu ER, PR ve ER aktivasyonu ile ilişkili diğer genlerin genetik ekspresyonunu gösterir. Luminal alt tip, meme kanserinin en yaygın alt tipidir, A ve B luminal olmak üzere iki farklı alt gruba ayrılır. Luminal A ve B meme kanserleri, gen ekspresyon paternleri ve klinik prognozda önemli farklılıklara sahiptir. Hormon reseptörlerinin (HR) genetik ekspresyonu, luminal A ve B tümörlerinin paylaşılan bir özelliğidir (Johnson ve ark. 2021)

Bu sınıflandırma için gereken ilişkili genlerin gen profilinin çıkarılmasıdır. Fakat bu ticari yüksek maliyetli gen analizleri yerine immünohistokimyasal (IHC) belirteçlerden hücre proliferasyonunda artan Ki-67 ve Prolifere hücre nükleer antijen (PCNA) ekspresyonları tespit edilmektedir. Ki-67 Luminal B'de yüksek oranda eksprese edilirken, luminal A tümörlerinde eksprese edilmez. Fakat yine de aradaki farkın kesinleşmemesi sebebi ile Ki-67 kesin tanı değerlerinin arasında yer almamaktadır. Luminal B tümörleri, luminal A'nın aksine, yüksek p53 mutasyonları ile ilişkilidir. Morfolojik olarak, luminal A tümörleri aksi belirtilmeyen, tübüler, müsinöz, klasik lobüler ve nöroendokrin karsinomları içeren iyi farklılaşmış karsinomlardır. Luminal B tümörleri daha az farklılaşır ve tipik olarak daha yüksek derecelidir (Johnson ve ark. 2021).

Klinik olarak, luminal A grubunun sadece hormonal tedaviden yararlanması muhtemeldir, oysa luminal B tümörleri ilave kemoterapi gerektirebilmektedir (Provenzano ve ark. 2018).

Luminal A alt tipi tüm invaziv meme kanserlerinin % 30-40'ını oluşturmaktadır. Gen ekspresyon profiline bakıldığında Fosfotidil İnozitol 4,5 Bifosfat 3 Kinaz Katalitik Ünite Altbirim Alfa (PIK3CA) mutasyonları, Mitojen Aktive Protein Kinaz Kinaz Kinaz 1 (MAP3KI) mutasyonları, yüksek Östrojen Reseptörü 1 (ESR1) ve X-box Bağlayan Protein 1 (XBP1) ekspresyonu, GATA3 mutasyonları, FOXA1 mutasyonları bu alt tiple ilişkilendirilmiştir. Morfolojik olarak 1 veya 2 derecede; çoğu özel olmayan tipte, klasik lobüler karsinomlar, tübüler, müsinöz, nöroendokrin olarak tanımlanmıştır (Fragomeni ve ark. 2018)

Tüm invaziv meme kanserlerinin % 20-% 30'unu oluşturan Luminal B alt tipinin gen ekspresyon profiline bakıldığında; TP53, PIK3CA mutasyonları, siklin D1 ve Fare Dubling Zaman Homologu 2 (MDM2) amplifikasyonu, Ataksi Telenjektazi Geni (ATM) kaybı, artan genomik kararsızlık, fokal amplifikasyonlar (örn. 8p12, 11q13) tanımlanmıştır. Morfolojik olarak 2 veya 3 derece; daha az farklılaşmış kanserler, çoğunlukla invaziv duktal karsinomlar ve ayrıca bazı invaziv mikropapiller karsinomları içermektedir. IHC Profili ER-pozitif, daha düşük PR ekspresyonu (<% 20), HER2-negatif ve daha yüksek KI67 indeksine (>% 14 veya 20'lik düzeyde (>% 14 veya %20) sahiptirler. Yüksek nüks skoru olan bu alt tipin moleküler temelde, luminal A ve

luminal B meme kanserlerinin onkojenik proliferasyona yol açan spesifik gen profillerine sahip olduğu bildirilmiştir (Fragomeni ve ark. 2018)

HER-2, tüm invaziv meme kanserlerinin %12-% 20'sini oluşturmaktadır. Gen ekspresyon profiline bakıldığında ise HER2 amplifikasyonu, P53 ve PIK3CA mutasyonları, FGFR4 ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) yüksek ekspresyonu, Apolipoprotein B mRNA Düzenleyici Katalitik Polypeptide-benzeri (APOBEC) mutasyonları, siklin D1 amplifikasyonu ve yüksek genomik instabilite gözlenmektedir. Morfolojik olarak 2 veya 3. derece, infiltrate karsinom non-spesifik tip (NST), apokrin ve pleomorfik lobüler karsinomları içermektedir. IHC'de, HER2-pozitif tümörler 2 alt tipe bölünebilir: HER2 ile zenginleştirilmiş alt tip (ER-negatif ve/veya PR-negatif/HER2-pozitif) ve luminal HER2 alt tipi (ER-pozitif ve/veya PR-pozitif ve/veya -pozitif, HER2-pozitif); ve ayrıca PR ekspresyonuna dayanan 2 fenotipe ayrılmıştır: ER-pozitif, PR-pozitif, HER2-pozitif ve ER-pozitif, PR-negatif, HER2-pozitif. Endokrin tedavisine yanıt üzerinde olumsuz bir etkisi olan HER2 ve ER sinyal yolları arasında karışma için klinik öncesi kanıtlar mevcuttur. (Fragomeni ve ark. 2018)

Tüm invaziv meme kanserlerinin %15-%20'sini temsil eden bazal benzeri üçlü negatif meme kanseri, ER, PR ve HER2 ekspresyonu yokluğunda tanımlanır. Basit tanımına rağmen, morfolojik, genetik ve klinik olarak heterojen bir meme kanseri kategorisidir. Çoğu üçlü negatif meme kanseri, invaziv duktal karsinom NST olarak gözlenir. Bununla birlikte, kategori aynı zamanda metaplastik karsinom, medüller özelliklere sahip karsinom (medüller karsinom), apokrin özellikleri olan karsinom (apokrin karsinom), salgı karsinomu (juvenil meme kanseri) ve adenoid kistik karsinom bu grupta yer almaktadır. Ayrıca gen ekspresyon profiline göre bu kanser tiplerinin belirli bir patolojik varyantla ilişkili olan farklı, prognostik olarak önemli alt tipleri tanımlanmıştır. Üçlü negatif meme kanserlerinin en yaygın ve en iyi karakterize edilmiş moleküler alt tipleri, bazal benzeri 1 (BL1), bazal benzeri 2 (BL2), immünomodülatör (IM), mezenkimal, mezenkimal kök benzeri (MSL) ve luminal androjen reseptör alt tipleridir. BL1 meme kanserleri genellikle klinik ve patolojik olarak invaziv duktal karsinom NST olarak ortaya çıkar ve yüksek Ki67 indekslerine sahiptir. Bu kanser tiplerinin ekspresyon profilinde, hücre döngüsü ve Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) replikasyonu ile ilişkili genlerden olan bazal sitokeratin genlerinin (KRT5 dahil) ekspresyonu arttığı tanımlanmıştır. BL2 tümörleri invaziv duktal karsinom NST olarak

ta ortaya çıkar ve ayrıca artmış bazal sitokeratin gen ekspresyonu, TP63 ve büyüme faktörü sinyallerinin artışı (örn., Epitelyal büyüme faktörü EGF ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptör yolları) ile ilişkilidir (Fragomeni ve ark. 2018).

2.2. Hücre Döngüsü

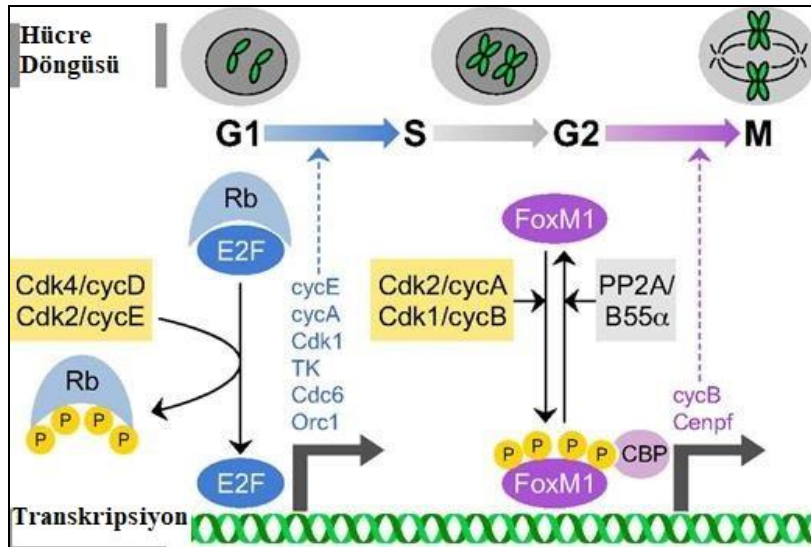
Hücre döngüsü, bir hücrenin genomunu çoğalttığı, büyüdüğü ve iki hücreye bölündüğü olaylar dizisidir (Poon 2016). Ökaryotik hücre döngüsünün genel özellikleri mayadan insana kadar korunmuş bir düzenleyici ağ ile kontrol edilir (Bertoli ve ark. 2013). Ökaryotlarda hücre bölünme döngüsü dört ayrı faz içerir: Aralık 1 (G1), Sentez (S), Aralık 2 (G2) ve Mitoz (M). İlk interfaz olarak bilinen G1 fazı sırasında hücre, DNA replikasyonu ve büyüme için gerekli proteinleri sentezler (Mens ve Ghanbari 2018). Bu aşamadaki hücreler DNA replikasyonuna başlamadan G0 adı verilen bir dinlenme durumuna girebilir. G0'daki hücreler, insan vücudundaki çoğalmayan veya büyümeyen hücrelerin büyük bir kısmını oluşturur. (Vermeulen ve ark. 2003) DNA replikasyonu ise S fazı sürecinde gerçekleşir ve bu fazı DNA bütünlüğünün kontrol edildiği ikinci interfaz olarak bilinen G2 fazı takip eder (Mens ve Ghanbari 2018). Son olarak, mitoz (M) fazında, kardeş kromatitler ayrılır ve yeni oluşan yavru hücrelere dağıtılır. Hücre döngüsü aşamalarında geçmeyen fakat iki yeni hücrenin oluşumu için önem arz eden sitokinez ile de iki yavru hücrenin arasında zar oluşumu gerçekleşerek hücrenin bölünmesi tamamlanmış olur. Hücre döngüsü boyunca ilerleme farklı kontrol noktalarında kontrol edilir. Ana kontrol noktaları S fazına (G1 – S kontrol noktası) ve mitoz (G2 – M kontrol noktası) ve anafaza ilerlemeyi kontrol eden noktalardır (Şekil 2-3) (Harashima ve ark. 2013).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda hücre döngüsünün evrimsel olarak da korunan ana kontrol mekanizmasının sikline bağlı kinazlar (CDK'lar) adı verilen bir protein kinaz ailesi olduğu belirtilmiştir. Diğer protein kinazlar gibi CDKlar da Adonezin trifosfattan (ATP) türetilen fosfat gruplarının protein substratlarına kovalent bağlanmasını katalize eder. Bu fosforilasyon, substratın enzimatik aktivitesinde veya diğer proteinlerle etkileşimlerinde değişikliklere neden olur. CDK aktiviteleri, hücre döngüsü boyunca artar veya düşer. Bu artış ve düşüşler, hücre döngüsü bileşenlerinin fosforilasyonunda doğrudan değişikliklere yol açarak döngü olaylarının başlatılmasına neden olur. Örneğin, S fazının başlangıcında CDK aktivitesindeki bir artış, DNA sentezini başlatan proteinlerin fosforilasyonuna neden olur. CDKlar, siklin adı verilen

düzenleyici proteinlere bağlanarak aktive edilir (Barnum ve O'Connell 2014; Poon 2016)

2.2.1. Siklin Aileleri ve Siklin Bağımlı Kinazlar

Siklin / CDK kompleksleri, hücre döngüsünün farklı fazları sırasında oluşurlar. Bir dizi farklı hedef proteininin fosforilasyonunda yer alırlar. Siklinler esas olarak artış zamanına ve hücre döngüsünde işlevlerine dayanarak dört sınıfa ayrılabilir. Bu sınıflardan üçü- G1 / S siklinleri, S siklinleri ve M siklinleri- hücre döngüsü olaylarının kontrolüne doğrudan katılırlar. Dördüncü sınıf olan G1 siklinleri, hücre dışı faktörlere yanıt olarak hücre döngüsü girişinin kontrolüne katkıda bulunur. G1 / S siklinleri hücre döngüsü sırasında salınır, geç G1'de yükselir ve erken S fazında azalır. (Giacinti ve Giordano 2006) Siklin D/CDK4, siklin D/CDK6 ve siklin E/CDK2 kompleksleri sırayla Rb proteinini ve E2F proteinlerinin aktivasyonuna ve E2F'ye yanıt veren genlerin ekspresyonuna yol açar. G1 fazında bu siklinler aktifken, Siklin A/CDK2 ve CDK1 yoluyla G1 fazından, S faz geçişini düzenlenmiş olur ve siklin A/CDK2, siklin B/CDK2 ve siklin B/CDK1 , G2/M geçişini düzenlenir. Şekil 2-2'de ayrıntılı gösterilmiştir (Bornfeldt 2003; Lim ve Kaldis, 2013).



Şekil 2-2: Hücre döngüsü kontrol noktaları ve Siklin Düzenlenmesi

(Lim ve kaldis, 2013)

CDK aktivasyonu, CDK'nın bir siklin düzenleyici alt birim ile ilişkisine bağlıdır. (Bornfeldt 2003) CDK aktivitesi, CDK'ya veya Siklin/CDK kompleksine bağlanan CDK inhibitörleri (CKI) olarak adlandırılan hücre döngüsü inhibitör proteinleri ile dengelenebilir. INK4 ailesi ve Siklin bağımlı-CDK inhibitör ailesi, CDK ile etkileşime giren protein (Cip / Kip) ailesi olmak üzere iki ayrı CDK inhibitörü ailesi keşfedilmiştir. INK4 ailesi, G1 CDK'sını (CDK4 ve CDK6) özellikle inaktive eden p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c), p19 (INK4d) içerir. Bu CKI, siklin bağlanmasından önce CDK enzimi ile kararlı kompleksler oluşturarak siklin D ile ilişkiyi önler. İkinci inhibitör ailesi, Cip / Kip ailesi, p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2), p57 (Kip2) içerir. Bu inhibitörler CDK-siklin komplekslerini inaktive eder. G1 Siklin/CDK komplekslerini ve daha az bir ölçüde Siklin B/CDK1 komplekslerini inhibe ederler. p21 ayrıca Prolifere hücre nükleer antijene (PCNA) bağlanarak DNA sentezini inhibe eder. CKI hem iç hem de dış sinyallerle düzenlenir: p21 ifadesi, p53 tümör baskılayıcı geni tarafından kontrol edilir. P21 gen promotoru, p53 bağlama bölgesi içerir ve bu şekilde kontrol gerçekleşmiş olur. Sırasıyla p15 ve p27'nin ekspresyonu ve aktivasyonu, büyüme faktörünün (TGF- β) transforme edilmesine yanıt olarak artarak büyümenin durdurulmasına katkıda bulunur. Farklı hücre döngüsü düzenleyici proteinlerinin hücrenin içerisinde bulunduğu lokalizasyon ile de hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynar. Örneğin Siklin B, nükleer dışlama sinyali içerir ve profazın başlangıcına kadar çekirdekten aktif olarak ihraç edilir. CDK etkisizleştiren kinazlar Wee1 ve Myt1, sırasıyla, çekirdek ve Golgi kompleksinde bulunur ve hücreyi erken mitozdan korur. 14-3-3 protein grubu, farklı proteinlerin hücre içinde lokalizasyonu düzenler. Örneğin interfazda, CDK aktive edici kinaz, Cdc25, 14-3-3 proteinleri ile etkileşim yoluyla sitoplazmada tutulur. DNA hasarını takiben sitoplazmada CDK1-siklin B kompleksinin salınımına da 14-3-3 protein aracılık eder (Vermeulen ve ark. 2003).

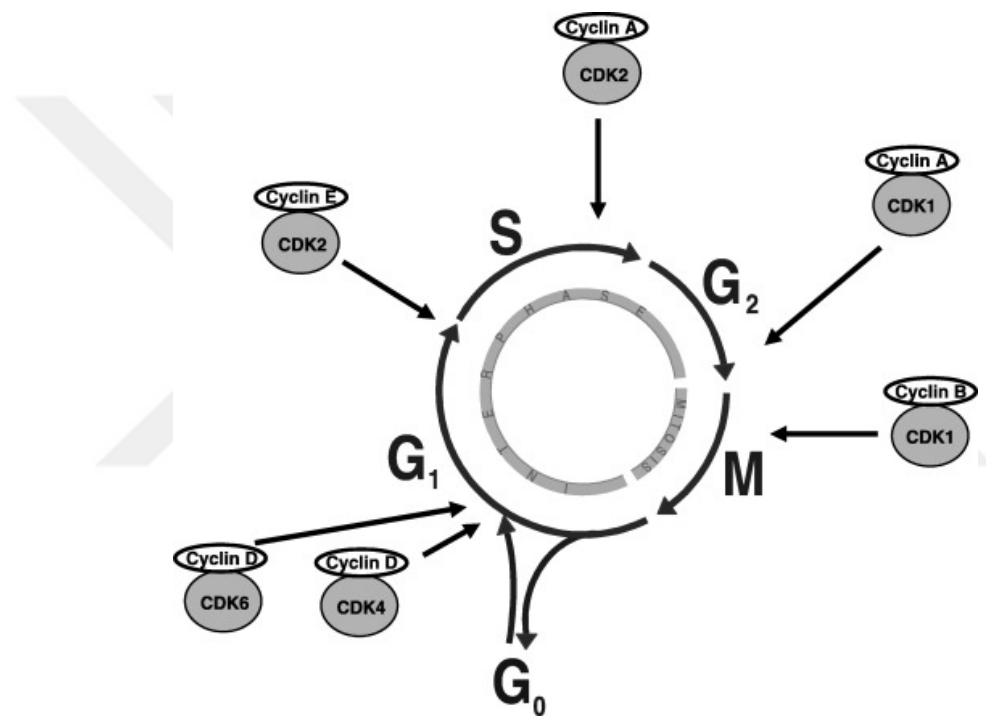
2.2.2. Kontrol Noktaları

G1 kontrol noktası: DNA'da hasar olup olmadığı kontrol edilerek hasarın olması durumunda döngüyü durdurur.

G2 kontrol noktası: DNA replikasyonundaki hataları kontrol eder. Olmaması durumunda döngü devam eder yoksa hücrenin G2 fazında kalmasını sağlar.

M kontrol noktası: Mitoz sırasında mitotik iğ iplikçiklerin üzerindeki kromozom dağılımını kontrol eder. Dağılımda hata olması durumunda döngüyü durdurur. (Güneş, 2013 p284)

DNA hasarına yanıt olarak, kontrol noktaları DNA onarımı için zaman sağlamak amacıyla hücre döngüsünü durdurur. DNA hasar kontrol noktaları, hücre S fazına (G1-S kontrol noktası) veya DNA replikasyonundan (G2-M kontrol noktası) sonra konumlandırılır ve S ve M fazları sırasında DNA hasar kontrol noktaları olduğu görülür (Şekil 2-3) (Vermeulen ve ark. 2003).



Şekil 2-3: Hücre döngüsü kontrol noktaları ve düzenlenmesi

(Vermeulen ve ark. 2003)

2.2.3. Hücre Döngüsü Evreleri

2.2.3.1. G1 evresi;

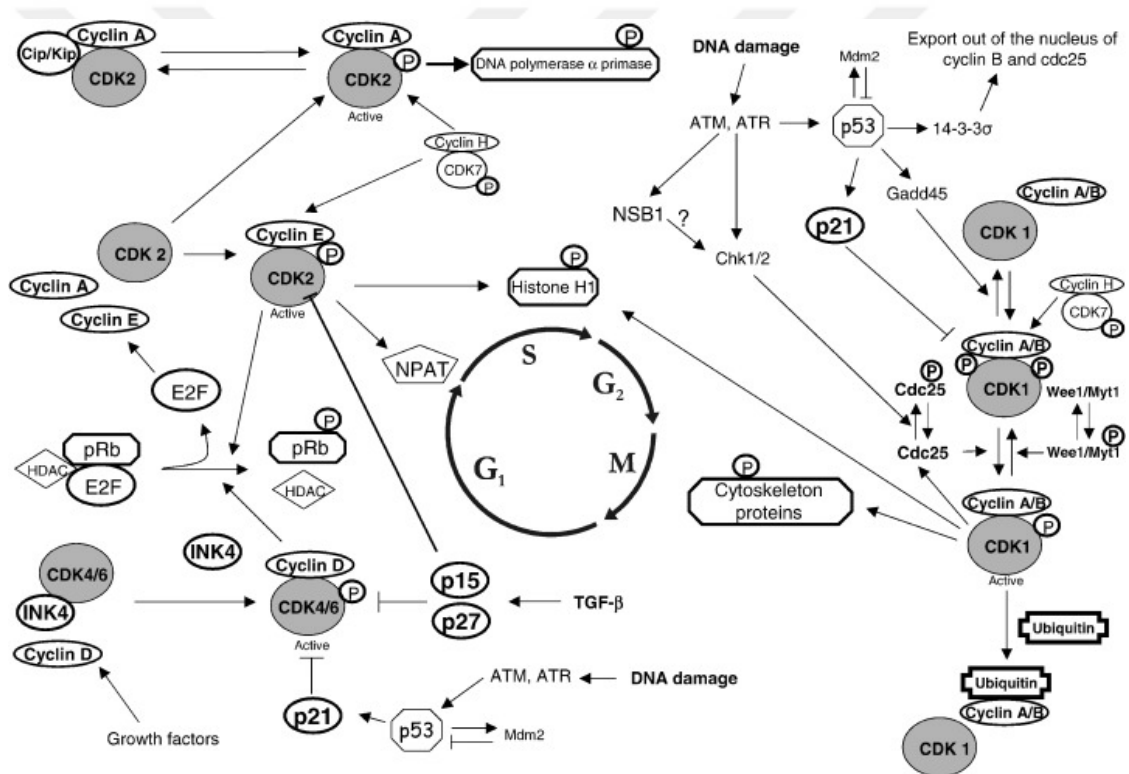
CDK2, CDK4, CDK6 ve siklin D'nin aktif olduğu G1 evresinde belirtilen R noktası (Restriction Point) S evresine geçişte çok önemlidir. Bu noktadan geçiş dışarıdan gelen büyüme faktörleri ve uyarılar sayesinde gerçekleşir. Yeterli uyarının bulunmadığı durumlarda hücre G1 evresinden G₀ olarak adlandırılan bekleme evresine geçer. Uygun uyarılar geldiğinde ise G₀'dan hücreler G1'e geçerek R noktasını da geçip hücre döngüsüne devam eder. Yapılan çalışmalar R noktasından önce yeterli

besin bulunmayan ortamlarda hücrelerin G0 benzeri bir duruma girdiği, R'den sonra benzer durumla karşılaşan hücrelerin ise etkilenmeyerek mitotik devam ettiğini göstermektedir (Pardee 1974). (Vermeulen ve ark. 2003). (Güneş, 2013 p283).

G1'den S fazına geçişi engelleyen 3 alt birimden oluşan Retinoblastoma (Rb) proteini, hipofosforile olarak aktive olduğunda E2F Faktör 2 E2F adı verilen S fazına geçişi sağlayan bir transkripsiyon faktörüne bağlanır. Bu sayede transkripsiyon faktörünün bağlandığı geni aktive etmesini ve sonuçta transkripsiyonun gerçekleşmesini engellemektedir. Ancak CDK4/siklin D kompleksi G1 evresindeki R noktasının geçilmesi için Rb'yi fosforilleyip E2F'den ayrılmasına sebep olarak, E2F'nin hedef geninin transkripsiyonunun başlamasını sağlamaktadır. CDK4/siklin D ile başlatılan Rb proteininin hiperfosforile hali CDK2/Siklin E ve CDK2/Siklin A kompleksleri ile korunur. Siklin D'den farklı olarak, siklin E ve siklin A'nın ekspresyonu hücre dışı sinyallerden bağımsızdır. (Dick ve Rubin 2013; Barnum ve O'Connell 2014; (Güneş, 2013 pp 289-290). Rb proteini ve geninde oluşan değişiklikler pek çok kanser tipi ile ilişkilendirilmiştir. Büyüme faktörü gibi faktörlerin olmaması durumu Siklin D'nin miktarını azalmasına ve böylece G1 fazından geçişin gerçekleşmesine engel olur. G1 / S sırasında Siklin E/CDK2 kompleksi CKI olan p27'yi fosforile ederek ubiquitin-proteazom bağımlı yolk ile bozunmasını indükler (Hinds ve ark. 1992; Montagnoli ve ark. 1999). NPAT (ATM lokusuna eşlenen nükleer protein), CDK2-siklin E ile birleşir ve aynı zamanda fosforile edilir. NPAT'ın protein seviyesinin G1 / S sınırında zirve yaptığı ve S faz girişinde rol oynadığı önerilmektedir. (Gao ve ark. 2003) CDK2-siklin E, histon H1'i fosforile eder ve bu aktivitenin DNA replikasyonu sırasında gereken kromozom yoğunlaşması için önemli olduğu düşünülmektedir. Histon H1 ayrıca CDK1-siklin B için de bir substrattır. Siklin A'ya bağlı kinazlar, DNA polimeraz alfa primazın fosforilasyonu ile DNA replikasyonunun başlatılmasını düzenler. CDK substratları arasında ayrıca CDK'nın kendi düzenleyicileri Wee1 ve Cdc25 ve doğru mitoz için gerekli olan nükleer lamineler, mikrotübüller ve vimentin gibi hücre iskelet proteinleri bulunur (Vermeulen ve ark. 2003).

G1 / S kontrol noktasında, DNA hasarı ile indüklenen hücre döngüsünün durması ise p53'e bağlıdır. Genellikle p53'ün hücresel seviyesi düşüktür, ancak DNA hasarı p53 aktivitesinin hızlı indüklenmesine yol açabilir. P53 proteini p21, Mdm2 ve Bax dahil farklı genlerin transkripsiyonunu uyarır. Bir CKI olan P21, hasar görmüş

DNA'nın replikasyonunu önleyerek CDKları inhibe eder ve bu yolla hücre döngüsünü durdurmuş olur. Mdm2 p53'ün düzenlenmesinde önemli bir rol oynar: hem p53 transkripsiyonel bölgesine bağlanarak inhibe eder hemde p53'ün ubiquitinasyonunu kolaylaştırarak proteolitik degradasyonuna katkıda bulunur. Ayrıca düzenleyici proteinlerin bağlanmasıyla p53 ubiquitinasyonunu modüle edebilir: ARF-INK4 lokusu tarafından kodlanan p19 (ARF) proteini, Mdm2'ye bağlanarak Mdm2 aracılı p53 proteolizini önler. Ciddi şekilde hasar görmüş hücrelerde ise, p53 apoptotik sinyalizasyonda yer alan genleri (örn. Bax, Fas ve oksidatif stres yollarında yer alan genler) aktive ederek hücre ölümünü indüklemektedir (Vermeulen ve ark. 2003). Bu düzenlemenin belirli kısımları şekil 2-4'te gösterildiği gibi şemalaştırılmıştır.



Şekil 2-4 Hücre döngüsü regülasyonunda bazı temel adımların şematik bir görünümü

2.2.3.2. S Evresi

DNA replikasyonu, replikasyon orijini olarak adlandırılan spesifik bölgelerde başlamaktadır. (Barnum ve O'Connell 2014). Bu orjinler ile S fazı DNA hasarı kontrol noktasının mekanizmalarının ilişkisi tam olarak anlaşılamamıştır, ancak DNA replikasyonunda hasar olduğunda hem başlama hem de uzama fazlarının baskılandığını

gösteren çalışmalar mevcuttur. S fazı kontrol noktası sırasında S fazı durmasını indüklemek için ATM aracılı Nijmegen kırılma sendromu 1 (NBS1) fosforilasyonunun gerekli olduğuna dair kanıtlar vardır (Lim ve ark. 2000; Vermulen ve ark. 2003).

2.2.3.3. G2

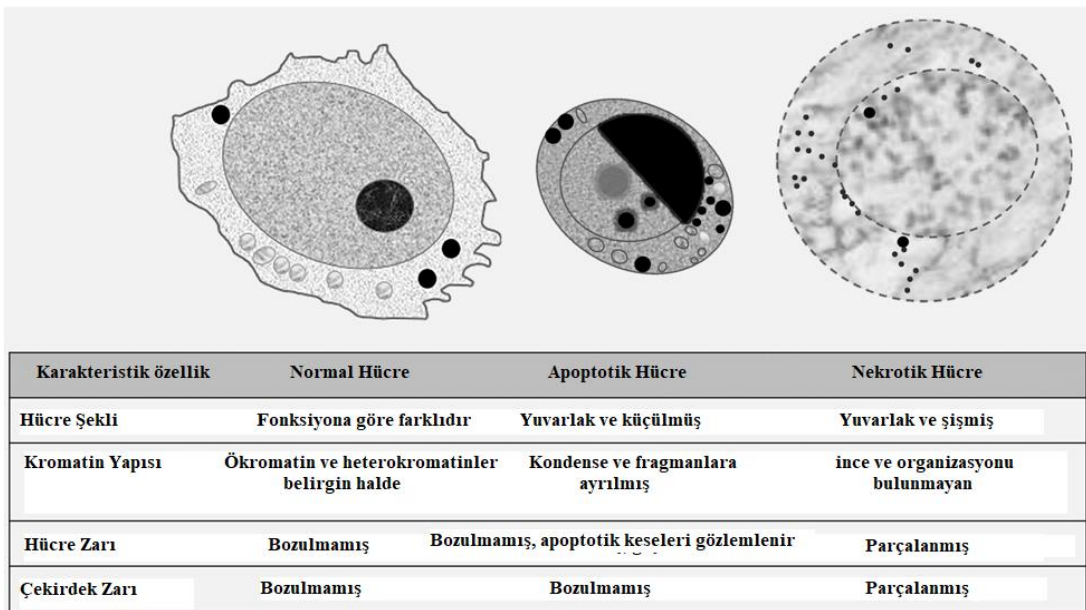
G2 sırasında DNA hasarı meydana geldiğinde, p53 varlığında veya yokluğunda hücre döngüsünün durması mitotik giriş, inhibitör fosforilasyon yoluyla CDK1'in inhibe edilmiş formda tutulması veya çekirdek dışında CDK1-siklin B kompleksinin bileşenlerinin sekestrasyonu yoluyla önlenir. ATM'ye bağımlı bir şekilde DNA hasarı sırasında aktive edilen ve Cdc25'i fosforile eden kinazlar Kontrol Noktası Kinaz Protein 1 ve 2 (Chk1 ve Chk2) Cdc25'in fosforilasyonu aktivitesini inhibe eder ve çekirdeğin dışına dizerek 14-3-3 proteinlerine bağlanmasını destekler. Bu şekilde p53, CDK1-siklin B'yi ve mitotik girişi aktive etmesini önlenmesi ve CDK üzerinde inhibitör fosforilasyonların indüklenmesinin yanı sıra G2'nin düzenlenmesinde de rol oynayabilir. G2 / M kontrol noktası. P53'ün DNA hasarına bağlı artışı, G1 / S kontrol noktasında olduğu gibi, p21 ve 14-3-3 sigmanın (14-3-3 σ) artan transkripsiyonuyla sonuçlanır. Siklin B'nin 14-3-3 σ 'ya artmış bağlanması, onu aktif olarak çekirdekte dışlar. p53 ayrıca Gadd45'in (büyüme durması ve DNA hasarı ile indüklenebilir gen) uyarılmasıyla CDK1-siklin B1 komplekslerinin ayrılmasına aracılık eder (Hermeking ve ark. 1997; Taylor ve Stark 2001). Mitotik kontrol noktası üzerinde kromozomların yanlış hizalanmasının tespit edilmesini sağlar ve metafazdaki hücre döngüsünü durdurur. Başlangıçta tomurcuklanan mayada, son zamanlarda, memeli iç kontrol noktası ile ilişkili birkaç protein tanımlanmıştır. Mitotik tutuklama eksikliği (Mad) ve benomil (Bub) proteinleri tarafından inhibe edilmeyen tomurcuklanma, mikrotübül bağlanma kusurları meydana geldiğinde aktive olur ve anafaz destekleyici kompleksin (APC) Cdc20 alt birimini inhibe ederek metafaz-anafaz geçişinin önlenmesine neden olur. (Vermeulen ve ark. 2003)

2.3. Apoptoz

Çok hücreli bir organizmanın hücreleri, oldukça organize bir topluluğun üyeleridir. Bu topluluktaki hücre sayısı sadece hücre bölünme hızını kontrol ederek değil, aynı zamanda hücre ölüm oranını da kontrol ederek sıkı bir şekilde düzenlenir. Hücreler artık gerekli değilse, hücre içi ölüm programını aktive ederek intihar ederler. Bu nedenle programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan bu süreç daha yaygın olarak

apoptoz olarak adlandırılmaktadır. (Molecular Biology of the Cell, 4th edition) Apoptoz terimi ilk kez 1972’de Kerri ve arkadaşları tarafından “hayvan hücre popülasyonlarının düzenlenmesinde mitoz için tamamlayıcı ancak zıt bir rol oynadığı görülen, şimdiye kadar çok az tanınan kontrollü hücre delesyonu mekanizması” olarak tanımlanmıştır. Ayrıca morfolojik özellikleri, aktif, doğal olarak programlanmış bir süreç olduğu ve hem fizyolojik hem de patolojik çeşitli çevresel uyaranlar tarafından başlatılabileceği veya engellenebileceğini göstermişlerdir. (Kerr ve ark. 1972)

Hücrelerin gelişim sırasında ölüme maruz olabileceği gözlemi ilk olarak 1920’lerde yapılmıştır. İzole edilmiş hücreler veya en küçük hücre kümeleri normal gelişim sırasında hücre ölümüne maruz kalmaktadır. Ölen bu hücrelerin morfolojisinin nekrotik hücrelerde (örneğin, yaralanmaya maruz kalan hücreler) gözlenenden belirgin şekilde farklı olduğu bulunmuştur. Embriyonik gelişim sırasında hücre ölümü gerçekleşen hücreler nekrozda görüldüğü gibi yırtılma yerine küçülür; hücre çekirdeği, pyknosis (Yunan pykno’dan, kalın, kompakt veya yoğun anlamına gelir) ve sonuçta parça olarak adlandırdığı şekilde yoğunlaşır. Ölmekte olan hücrelerin bu tür bileşenleri, diğer hücreler tarafından fagositoz için sitoplazmik membranla kapatılmış veziküller halinde paketlenir. Buna karşılık, yaralanma ve iltihaplanma sırasında ortaya çıkabilen nekrozda, genellikle daha geniş doku alanları etkilenir; hücreler şişer, plazma zarı ve nükleer zarf yırtılması sonucu hücre içeriği dökülür. (Voss ve Strasser 2020) Şekil 2-5’te bu karşılaştırılma verilmiştir.



Şekil 2-5: Normal hücre, apoptotik ve nekrotik hücre karşılaştırması

Apoptoz, normal olarak gelişme, yaşlanma ve dokulardaki hücre popülasyonlarının korunması sırasında homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkar. (Norbury ve Hickson 2001). Embriyogenez ve düzenli doku homeostazı dışında, çok hücreli organizmalar viral olarak enfekte olmuş veya genetik olarak zarar görmüş hücreler gibi potansiyel olarak tehlikeli hücreleri yok etmek için apoptozu kullanırlar. Hem mitokondriyal hem sitoplazmik homeostaz hem de genomik DNA bütünlüğü sürekli olarak izlenir. Hücre içi ve hücre dışı sinyaller, bir hücrenin ölmesi veya yaşaması gerekip gerekmediğini belirlemek için birleştirilir. Mitokondri, elektron taşıma zincirindeki b-c1 kompleksi (kompleks III) ve Sitokrom oksidaz (kompleks IV) arasındaki elektron taşıma sistemi ve ATP üreten sitokrom c (cyt c) salınımını düzenleyerek bu izleme sisteminde önemli bir rol oynar. (Özören ve El-Deiry 2003)

2.3.1. Apoptozdaki Morfolojik Değişiklikler

Apoptotik hücre ölümünün hem çekirdekle ilgili hem de sitoplazma ile ilgili morfolojik değişiklikleri hücre türleri arasında belirgin şekilde benzerdir. Genellikle hücre ölümünün başlatılmasından son hücresel parçalanmaya kadar birkaç saat gereklidir. Bununla birlikte, geçen süre hücre tipine, uyarana ve apoptotik yola bağlıdır. Çekirdekteki apoptozun morfolojik ayırt edici özellikleri, hücrenin şeklinin yuvarlak hale doğru gelmesi, hücresel hacimde azalma (pyknosis) ve psödopodların geri çekilmesi ile birlikte kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanmadır. Kromatin yoğunlaşması nükleer zarın çevresinde başlar ve hilal veya halka benzeri bir yapı oluşturur. Kromatin, çekirdek zarı parçalanana kadar daha da yoğunlaşır. Plazma zarı bu süreç boyunca bozulmaz. Apoptozun sonraki aşamasında morfolojik özelliklerden bazıları plazma zarının tomurcuklanması, sitoplazmik organellerin modifikasyonu ve membran bütünlüğünün kaybıdır. Genellikle fagositik hücreler apoptotik cisimler oluşmadan önce apoptotik hücreleri sarar. Apoptozun 1972 yılında hücre biyolojisi tarihinde çok geç keşfedilmiş olmasının ve apoptotik cisimlerin ancak özel koşullar altında in vitro olarak görülmesinin nedeni budur. Apoptotik hücrelerin kalıntıları yapay hücre kültürü ortamında olduğu gibi fagositoz sürecine girmediklerinde “ikincil nekroz” olarak adlandırılan nekroza benzeyen bozulmaya uğrarlar (Wong 2011)

2.3.2. Apoptozdaki Biyokimyasal Değişiklikler

Geniş ölçüde, apoptozda üç ana tip biyokimyasal değişiklik gözlemlenebilir:

- 1) Kaspazların aktivasyonu,
- 2) DNA ve protein dağılımı
- 3) Membran değişiklikleri ve fagositik hücreler tarafından tanınma (Wong 2011)

Apoptozun başlarında, hücre zarının dış katmanlarında -normal koşullarda iç katmanda yer alan fosfatidilserin (PS) bulunur. Bu fosfolipidin hücre membranının dış yüzeyinde konumlanması ölü hücrelerin makrofajlar tarafından erken tanınmasına ve pro-enflamatuar hücresel bileşenlerin salınması olmaksızın fagositoz ile sonuçlanmasını sağlar. Bunu DNA'nın karakteristik bir şekilde 50 ila 300 kilobaz çiftlik parçalara ayrılması izler. Daha sonrasında endonükleazlar tarafından DNA'nın 180-200 baz çifti katlarında bölünmesi gerçekleşir. Bu özellik apoptozun özelliği olmasına rağmen, agaroz jel elektroforezdeki tipik DNA parçalanması nekrotik hücrelerde de görülebildiğinden ayırt edici olarak kabul edilmemektedir (Wong 2011).

Apoptozun bir diğer özel özelliği, kaspaz adlı sistein proteaz ailesine ait bir grup enzimin aktivasyonudur (Wong 2011). Kaspazlar, memelilerde apoptoz veya inflamasyonda yer alan substratları parçalayan hücre içi proteazlardır. Neredeyse tüm kaspazlar zimojen formda bulunurlar ve çeşitli adaptör proteinleriyle etkileşimlerine aracılık eden bir N-terminal alanı sayesinde oligomerizasyonla aktif forma geçerler (Martinon ve ark. 2004). Aktif kaspazlar birçok hayati hücresel proteini ayırır ve nükleer iskeleti ve hücresel iskeleti parçalar. Ayrıca nükleer DNA'yı daha da bozan DNaz enzimini aktive ederler. Biyokimyasal değişiklikler kısmen apoptozdaki morfolojik değişikliklerin bir kısmını açıklasa da apoptozun oligonükleozmal DNA parçalanması olmadan ortaya çıkabileceği ve kaspazdan bağımsız olabileceği için, apoptozun tanımlanmasında DNA parçalanması veya kaspaz aktivasyonunun biyokimyasal analizlerinin kullanılması önerilmemektedir. Apoptozun tespitinde birçok biyokimyasal tahlil ve deney kullanılmış olsa da Nomenklatür Hücre Ölümü Komitesi (NCCD), hücre ölümü yöntemlerinin sınıflandırılmasının tamamen morfolojik kriterlere dayanması gerektiğini, çünkü ultra yapısal değişiklikler ile biyokimyasal hücre ölümü özellikleri arasında net bir eşdeğerlik olmadığını öne sürmüştür (Wong 2011).

2.3.3. Apoptozun Mekanizması

Apoptozun mekanizmalarının anlaşılması apoptoz sürecindeki değişikliklerden kaynaklanan hastalıkların, bozuklukların patogenezinin anlaşılması için elzemdir. Daha da önemlisi, belirli apoptotik genleri veya yolları hedef alan ilaçların geliştirilmesi ile tedaviye yardımcı olabilir.

Kaspazlar, hem başlatıcı hem de öldürücü oldukları için apoptoz mekanizmasının merkezindedir. Kaspazların aktive edilebileceği üç yol vardır. Yaygın olarak tanımlanan iki başlangıç yolu, apoptozun içsel (veya mitokondriyal) ve dışsal (veya ölüm reseptörü) yollarıdır. Her iki yol da sonunda ortak bir yola veya apoptozun yürütme aşamasının başlamasına yol açar. Üçüncü az bilinen bir diğer başlangıç yolu ise içsel endoplazmik retikulum yoludur (Wong 2011).

2.3.4. Apoptozun Düzenlenmesi

2.3.4.1. Dıştan Gelen Uyaranların Tetiklediği Apoptoz

Apoptozu başlatan dışsal sinyal yolları, transmembran reseptör aracılı etkileşimleri içerir. Bunlar, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen süper ailesinin üyeleri olan ölüm reseptörlerini içermektedir (Locksley ve ark. 2001). TNF reseptör ailesinin üyeleri, sisteinden zengin benzer hücre dışı alanları paylaşır ve “ölüm alanı” olarak adlandırılan DD şeklinde gösterilen yaklaşık 80 amino asitlik bir sitoplazmik alana sahiptir (Ashkenazi ve Dixit, 1998). Bu ölüm alanı, ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına iletilmesinde kritik bir rol oynar. Bugüne kadar, en iyi karakterize edilmiş ligandlar ve karşılık gelen ölüm reseptörleri, FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5'i olarak tanımlanmıştır (Elmore 2007).

Ölüm reseptör sinyalinin en önemlisi Fas ilişkili DD (FADD veya MORT1) ve TNFR-ilişkili DD (TRADD) olarak bilinen proteinlerdir. FADD ve TRADD adaptör proteinlerdir. Bu, kendilerinin herhangi bir enzimatik işlev uygulamadıkları, bunun yerine sinyal ve efektör proteinleri arasında bir köprü oluşturdıklarını ifade eder. Bir ölüm reseptörünün FADD veya TRADD'yi DD'sini etkilemesine bağlı olarak, iki sınıftan birine kategorize edilebilir: CD95, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 çapraz bağlantısı FADD'nin , TRADD, TNF-R1 ve DR3'e etki etmektedir. Ölüm reseptörlerinin FADD-bağımlı sınıfı birincil sinyal çıkışları olarak apoptoza neden olurken, TRADD bağlayıcıları öncelikle immün stimülatör, proinflamatuvar sinyalizasyona neden olur.

Apoptosis physiology and pathology kitabı (Death Domain–Containing Receptors – Decisions between Suicide and Fire 3. bölüm)

Apoptozun dışsal fazını tanımlayan olaylar dizisi en iyi şekilde FasL/FasR ve TNF- α /TNFR1 modelleri ile karakterize edilir. Bu modellerde, reseptörlerin kümelenmesi ve homolog trimerik ligand ile bağlanma yer alır. Ligandın reseptöre bağlanmasının ardından reseptörün ölüm alanlarına sitoplazmik adaptör proteinler toplanır. Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanması, adaptör protein FADD'nin bağlanmasıyla, TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanması ise adaptör protein TRADD'nin FADD ve RIP bağlanmasıyla sonuçlanır FADD daha sonra ölüm efektör alanının dimerizasyonu yoluyla prokaspaz-8 ile birleşir. Bu noktada, prokaspaz-8'in otokatalitik aktivasyonu ile sonuçlanan, ölümü indükleyen bir sinyal kompleksi (DISC) oluşur (Elmore 2007). Kaspaz-8 ve Kaspaz-10 bu DISC ile aktive edilir. Aktive olan kaspaz 8 ve 10, yürütücü kaspazlar olan kaspaz-3, Kaspaz-6 ve Kaspaz-7'yi aktive eder. Cellat kaspazlar olarak belirtilen bu kaspazlar aktive olduğunda, hücre ölümüne yol açan proteinlerin üretimi ve hücre iskeletinin yıkımı başlar. Ayrıca kaspaz-8, BCL-2 Etkileşim Domainini (BID) parçalayıp mitokondriden sitokrom C salınımını sağlar ve intrinsik yolda aktive olmuş olur (Celepli ve ark. 2020).

Kaspaz-8 etkinleştirildiğinde, apoptozun devam aşaması tetiklenir. Ölüm reseptörü aracılı apoptoz, c-FLIP adı verilen ve FADD ve kaspaz-8'e bağlanarak onları etkisiz hale getirecek bir protein tarafından inhibe edilebilir. Potansiyel apoptoz düzenlemesinin bir başka noktası, kaspaz-8 işleminin inhibisyonu yoluyla T hücrelerinde Fas kaynaklı apoptozu bloke ettiği gösterilen Toso adlı bir proteini içerir. (Elmore 2007; Galluzi ve ark. 2018).

Ölüm reseptörü sinyali ayrıca NF- κ B aktivasyonuna yol açabilir. TNFR1 dahil bazı ölüm reseptörlerinin Kaspaz-8 aktivasyonu üzerinde NF- κ B aktivasyonunu teşvik etme yeteneği bulunmaktadır (Galluzi ve ark. 2018).

2.3.4.2. İçsel Mitokondriyal Apoptoz

Hücre içinde içsel (intrinsik) yol aracılığı ile başlatılır. Onarılamaz genetik hasar, hipoksi, son derece yüksek sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonları ve şiddetli oksidatif stres gibi iç uyaranlar, içsel mitokondriyal yolun başlatılmasının bazı tetikleyicileridir (Wong 2011). Tüm bu uyaranlar, mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneginin açılması, mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybı ve iç mitokondriyal zar

değişikliklere neden olur, bu da pro-apoptotik proteinlerin iki ana grubunun zarlar arası boşluktan serbest bırakılmasına sebep olur. Birinci grup sitokrom c, Smac/DIABLO ve serin proteaz HtrA2/Omi'den oluşur. (Elmore 2007).

Kaspaz-9, sitokrom C, APAF-1, ve ATP birleşerek apoptozomu oluşturur. Apoptozom'un oluşması ile birlikte Kaspaz 9 aktive olur ve kaspaz kaskadı başlar. Mitokondriyal geçişin kontrolü BCL-2 ailesinin proapoptotik ve anti-apoptotik proteinleri tarafından düzenlenir. (Celepli ve ark. 2020)

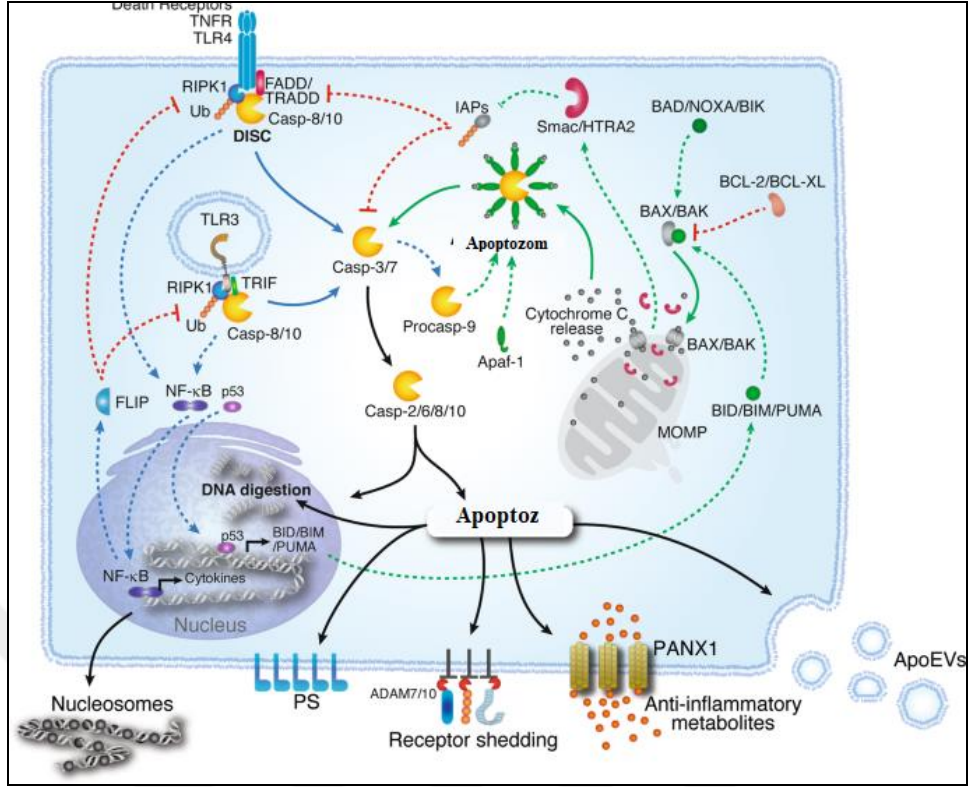
Proapoptotik proteinlerin ikinci grubu, Apoptoz İndükleyici Faktör (AIF), endonükleaz G ve CAD, apoptoz sırasında mitokondriden salınır. Ancak bu süreç hücrenin ölmeye karar vermesinden sonra meydana gelen geç bir olaydır. AIF çekirdeğe yer değiştirir ve DNA'nın ~50-300 kilo baz çiftlik parçalara bölünmesine ve periferik nükleer kromatinin yoğunlaşmasına neden olur. Bu erken nükleer yoğunlaşma formuna "evre I" yoğunlaşma denir. Endonükleaz G ayrıca, oligonükleozomal DNA fragmanları üretmek için nükleer kromatini parçaladığı çekirdeğe de yer değiştirir. AIF ve endonükleaz G'nin her ikisi de kaspazdan bağımsız bir şekilde işlev görür. CAD daha sonra mitokondriden salınır ve kaspaz-3 tarafından bölünerek oligonükleozomal DNA parçalanmasına ve daha belirgin ve gelişmiş bir kromatin yoğunlaşmasına yol açtığı çekirdeğe geçer. Bu daha belirgin kromatin yoğunlaşması, "evre II" yoğunlaşma olarak adlandırılır. (Elmore 2007).

İçsel apoptoz için kritik adım olan geri döndürülemez mitokondriyal dış membran geçirgenliği değişimi kontrolü ve düzenlenmesi BCL2, apoptoz regülatörü (BCL2) protein ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri tarafından kontrol edilir. Her BCL-2 proteini homolojisi alanları paylaşan kısımlar (BH1, BH2, BH3 ve BH4) içermektedir. Tümör baskılayıcı protein p53, Bcl-2 protein ailesinin düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir. Bcl-2 protein ailesi, mitokondriyal membran geçirgenliğini yönetir ve pro-apoptotik veya anti-apoptotik olabilir. Bugüne kadar Bcl-2 ailesinde toplam 25 gen tanımlanmıştır. Anti-apoptotik proteinler arasında en önemlileri Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG'yi yer alırken proapoptotik proteinlerden Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik ve Blk gösterilebilir. Bu proteinler, hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğini veya işlemi iptal edip etmediğini belirleyebildikleri için özel bir öneme sahiptir. Bcl-2 protein ailesinin ana etki mekanizmasının, mitokondriyal

membran geçirgenliğinin değiştirilmesi yoluyla mitokondriden sitokrom c salınımının düzenlenmesi olduğu önerilmektedir (Galluzi ve ark. 2018; Celepli ve ark. 2020).

Bad ayrıca Bcl-Xl veya Bcl-2 ile heterodimerleşerek, koruyucu etkilerini nötralize edebilir ve hücre ölümünü teşvik edebilir. Sitokrom C'nin mitokondriden salınmasını engelledikleri belirtilmiştir. Bcl-2 ve Bcl-XL'nin, öncelikle kaspaz proteazlarının aktivasyonunu kontrol ederek apoptotik ölümü engellediği gösterilmiştir (Newmeyer ve diğerleri, 2000). Bcl-2 veya Bcl-XL'den birinin aşırı ekspresyonunun diğerini aşağı regüle edeceğine dair kanıtlar vardır, bu mekanizma iki protein arasında karşılıklı bir düzenleme olduğunu göstermektedir. (Elmore 2007).

Puma ve Noxa, Bcl2 ailesinin aynı zamanda pro-apoptoza dahil olan iki üyesidir. Puma, p53 aracılı apoptozda önemli bir rol oynar. İn vitro olarak, Puma'nın aşırı ekspresyonuna, artan BAX ekspresyonu, BAX konformasyonel değişikliği, mitokondriye translokasyon, sitokrom c salınımı ve mitokondriyal membran potansiyelinde azalmanın eşlik ettiği gösterilmiştir (Liu ve ark. 2003). Noxa ayrıca p53 ile indüklenen apoptozun aday bir aracısıdır. Çalışmalar, bu proteinin mitokondriye yerleşebileceğini ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleriyle etkileşime girerek kaspaz-9'un aktivasyonu ile sonuçlandığını göstermektedir (Oda ve ark. 2000). Hem Puma hem de Noxa, p53 tarafından indüklendiğinden, genotoksik hasar veya onkogen aktivasyonu ile ortaya çıkan apoptoza aracılık edebilirler. Myc onkoproteininin ayrıca hem p53'e bağımlı hem de bağımsız mekanizmalar yoluyla apoptozu güçlendirdiği bildirilmiştir (Meyer ve ark. 2006; Elmore 2007). Son bilgilere göre şekil 2-6'da iç ve dış yol belirtilmiştir.



Şekil 2-6: Apoptozun iç ve dış yolu

(Bertheloot ve ark. 2021)

2.3.4.3. Ortak Yol

Dışsal ve içsel yolların her ikisi de, apoptozun son yolu olarak kabul edilen yürütme aşaması noktasında sona erer. Apoptozun bu aşamasını başlatan yürütücü güç kaspazlarının aktivasyonudur (Elmore 2007). İç yol için ana aktif kaspaz Kaspaz 9 iken dışsal yolunki Kaspaz 8'dir. (Wong 2011).

Yürütücü (Cellat) kaspaz olarak adlandırılan kaspazlar nükleer materyali bozan sitoplazmik endonükleazı ve nükleer ve hücre iskeleti proteinlerini bozan proteazları aktive eder. Kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7, efektör veya "yürütücü" kaspazlar olarak işlev görür, sitokeratinler, Poli Adp-Riboz Polimeraz (PARP), plazma membranı hücre iskeleti proteini alfa fodrin, nükleer protein NuMA ve diğerleri dahil olmak üzere çeşitli substratları parçalayarak sonuçta morfolojik ve apoptotik hücrelerde görülen biyokimyasal değişikliklere sebep olurlar.

Kaspaz-3, efektör (cellat) kaspazların en önemlisi olarak kabul edilir ve başlatıcı kaspazlardan herhangi biri (kaspaz-8, kaspaz-9 veya kaspaz-10) tarafından aktive edilebilir. Kaspaz-3, endonükleaz CAD'yi spesifik olarak aktive eder. Çoğalan

hücrelerde CAD, inhibitörü ICAD ile kompleks oluşturur. Apoptotik hücrelerde, aktive edilmiş kaspaz-3, CAD'yi serbest bırakmak için ICAD'yi bölerek inaktifleştirir. Serbest kalan CAD daha sonra çekirdek içindeki kromozomal DNA'yı bozarak kromatin yoğunlaşmasına neden olur. Kaspaz-3 ayrıca hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini ve hücrenin apoptotik cisimlere parçalanmasını indükler (Elmore2007; (Galluzi ve ark. 2018))

Aktin bağlayıcı bir protein olan Gelsolin, aktive edilmiş kaspaz-3'ün temel substratlarından biri olarak tanımlanmıştır. (Elmore 2007) Gelsolin tipik olarak aktin polimerizasyonu için bir çekirdek görevi görerek ve ayrıca aktin organizasyonu ve sinyal iletimini bağlayarak fosfatidilinositol bifosfatı bağlar. Kaspaz-3, gelsolin'i ve bölünmüş gelsolin fragmanlarını, sırayla, aktin filamentlerini kalsiyumdan bağımsız bir şekilde parçalayacaktır. Bu, hücre iskeleti, hücre içi taşıma, hücre bölünmesi ve sinyal iletiminin bozulmasına neden olur (Elmore 2007).

Apoptotik hücrelerin fagositik alımı, apoptozun son bileşenidir. Fosfolipid asimetrisi ve fosfatidilserinin apoptotik hücrelerin ve bunların parçalarının yüzeyinde dışsallaşması bu fazın ayırt edici özelliğidir. Apoptoz sırasında hücrenin dış kısmına fosfatidilserin translokasyonunun mekanizması iyi anlaşılmamasına rağmen, aminofosfolipid translokaz aktivitesinin kaybı ve çeşitli sınıflardaki fosfolipidlerin spesifik olmayan flip-flop'u ile ilişkilendirilmiştir. Araştırmalar, FAS, kaspaz-8 ve kaspaz-3'ün, oksidatif olarak stresli eritrositlerde fosfatidilserin dışa dönmesinin düzenlenmesinde rol oynadığını, ancak kaspazdan bağımsız da gerçekleştiği de bildirilmiştir. (Elmore 2007)

Apoptotik hücrelerin dış membranında fosfatidilserinin görünümü daha sonra inflamatuvar olmayan fagositik tanımayı kolaylaştırarak erken alım ve atılmalarına izin verir (Fadok ve diğerleri, 2001). Hücresel bileşenlerin salınımı olmadan bu erken tanınma esas olarak hiçbir inflamatuvar yanıtla sonuçlanmaz. (Elmore 2007)

2.3.4.4. Kaspaz Mekanizması

Kaspazlar, substratlarındaki aspartik asit kalıntılarına özgüllüğü olan sistein aspartik proteazlardı. Kaspazlar iki ana grupta incelenmektedir. Birincisi, başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, kaspaz 8, Kaspaz 9 ve Kaspaz 10) ve apoptozun yıkımını gerçekleştiren cellat kaspazlar (kaspaz 3, kaspaz 6 ve Kaspaz 7 (Celepli ve ark. 2020)). Çoğu proteolitik enzimde olduğu gibi, kaspazlar genellikle sınırlı proteoliz ile aktive

edilen latent formlar (zimojenler) olarak bulunurlar ve yolakta en altta işlev yapan kaspazlar yukarıdakiler tarafından aktive edilirler (Salvesen ve Riedl 2008).

Kaspaz zimojenlerinin, onları diğer proteazların çoğundan ayıran olağandışı özellikleri aktive olmalarıdır. Diğer proteazların çoğundan farklı olarak, kaspaz zimojenlerinde bulunan içsel proteolitik bir aktivasyon mevcuttur. İn vitro olarak, apikal kaspaz zimojenleri, kendi kendine birleşme (dimerizasyon) ve proteolitik işleme yoluyla efektör kaspazları, aktif hale getirilebilirler. Bu farklı aktivasyon, in vivo olarak kaspaz aktivitesi oluşturan süreçlerin merkezinde yer almaktadır (Celepli ve ark. 2020).

Cellat kaspazlar olan; kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7' nin aktive olmasıyla DNA fragmentasyonu, endonükleaz aktivasyonu, nükleer proteinlerin yok edilmesi, fagositik hücre ligand ekspresyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumunu gerçekleştirir (Dağdeviren, 2021)

2.3.5. Apoptoz ve Karsinogenez

1970'lerin başlarında Kerr ve arkadaşları apoptozu potansiyel olarak kötü huylu hücrelerin yok edilmesi, hiperplazi ve tümör ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir [8]. Bu nedenle, azalmış apoptoz veya apoptoza karşı direnç karsinogenezde hayati bir rol oynar. Kötü huylu bir hücrenin apoptozdan kaçması veya apoptoz direncinde azalma elde etmesinin birçok yolu vardır. Genel olarak, apoptozdan kaçınmanın meydana geldiği mekanizmalar aşağıdaki gibi olabilir: 1) pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesini bozmak, 2) azaltılmış kaspaz fonksiyonu ve 3) bozulmuş ölüm reseptörü sinyali. Birçok proteinin hücrede pro-veya anti-apoptotik aktivite uyguladığı bildirilmiştir. Hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli rol oynayan parametre bu pro-ve anti-apoptotik proteinlerin miktarı değil de oranıdır. Ayrıca, bazı genlerin aşırı veya az ekspresyonunun (dolayısıyla ortaya çıkan düzenleyici proteinlerin) kanser hücrelerinde apoptoz azaltılarak karsinogeneze katkıda bulunduğu bulunmuştur (Wong 2011).

2.4. Oleuropein'den Zengin Zeytin Yaprağı Ekstraktı

Botanik olarak *Olea europaea* olarak bilinen zeytin ağacı, Oleaceae ailesine aittir, dünyanın sıcak ılıman bölgelerine özgüdür. Ekiminin Suriye, Lübnan, Ürdün, Filistin ve İsrail'i içeren bölgede başladığına inanılmaktadır. Tarihi kanıtlara göre MÖ 7000–5000 yılından itibaren zeytin ve zeytinyağı gibi hasat ürünleri tüketilmektedir.

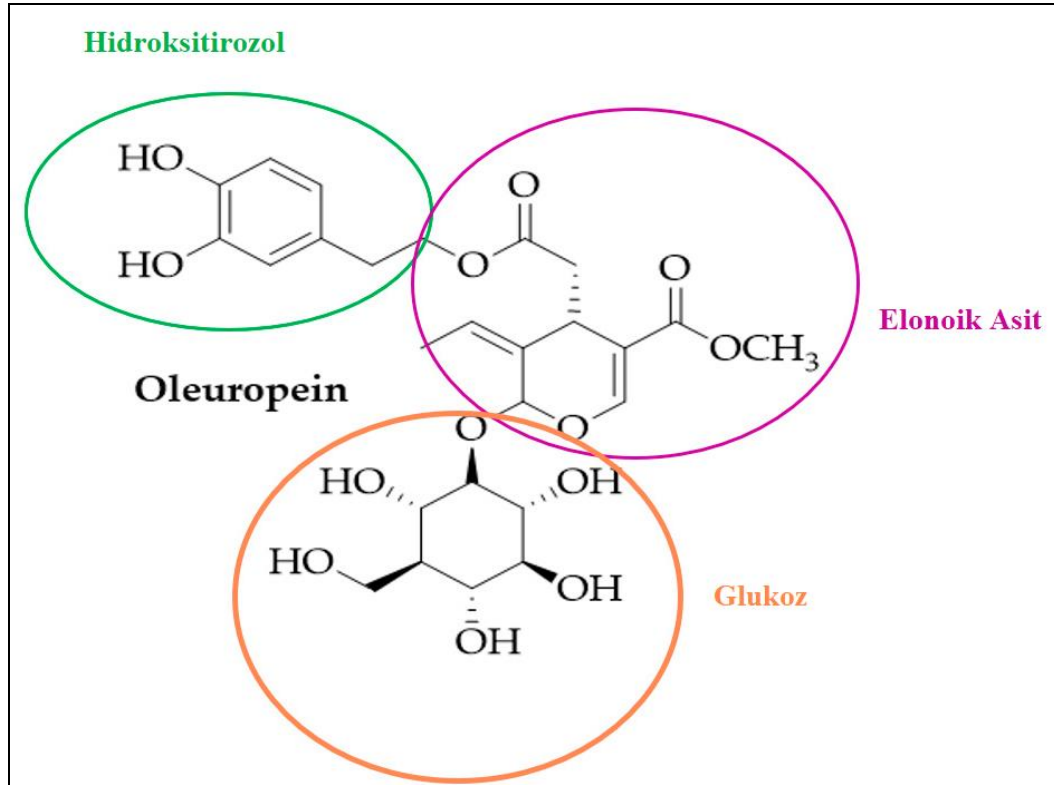
Zeytin yaprağı ürünleri eski çağlardan beri tıbbi özellikleri için üretilip kullanılmaktadır. Son yıllarda, bu ürünler sağlıklı bir diyetin önemli bileşenleri olarak kabul edilmiştir. Faydalı etkilerinin, zeytinyağının ve zeytin meyvesinin fenolik bileşenleri ve yağ asidi profilinden kaynaklandığı belirtilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalar, zeytinyağının tüketiminin koruyucu bir etkiye sahip olduğunu ve kanser riskini önemli ölçüde azalttığını belirtilmiştir (Shamshoum ve ark 2017).

Zeytin yaprağı özü koyu kahverengi renkli ve tadı acı bir sıvıdır. Zeytin yaprağı özü geleneksel olarak bitkisel takviye olarak kullanılmıştır, çünkü enerji seviyelerini artırmak, kan basıncını düşürmek ve kardiyovasküler sistemi ve bağışıklık sistemini desteklemek gibi faydalı özelliklere sahip polifenolik bileşikler içerir (Borjan ve ark. 2020)

Zeytin örneklerinde tespit edilen ana biyofenoller, hidroksitirosol (HT), tirozol ve onların sekoiridoit türevleri (oleuropein, oleuropein aglikon ve elenolik asit dialdehitleri), verbaskosit, lignanslar ve flavonoidler bulunur. Zeytin biyofenollerinin kimyası konusundaki raporların çoğunluğu, antioksidanlar olarak işlev görme yetenekleriyle ilgilidir, ancak diğer biyoaktiviteler, lipitlere, proteinlere, karbonhidratlara ve nükleik asitlere bağlanmayı içerir. Farmakolojik çalışmaların çoğunluğu sadece dört bileşik HT, tirozol, oleuropein ve verbaskoside odaklanmıştır. (Obied ve ark. 2012). Oleuropein bitkinin tüm bileşenlerinde bulunur, ancak zeytin ve yapraklarda daha yüksek seviyelerde birikir. (Shamshoum ve ark 2017)

Zeytin yaprak ekstraktları dikkate değer bir anti-tümör, anti-enflamatuar, anti-viral, antitrombotik, anti-mikrobiyal, hipokolesterolemik ve cildi ışıktan koruyucu özellikleri bulunduğu göstermiştir. Ek olarak, Zeytin yaprak ekstraktının ana polifenolu olan oleuropeinin, tek başına oleuropin'e göre geleneksel kemoterapötik yaklaşımlarla birlikte uygulanmada sitotoksik aktiviteyi arttırmak için daha etkili olduğu belirtilmiştir. (Benot-Domingue ve ark. 2021). Son raporlar ise, Oleuropein'in de zeytin yaprağı gibi kardiyo-koruyucu, nöroprotektif, anti-enflamatuar, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteler gibi birçok farmakolojik özellik olduğunu göstermiştir (Cao ve ark 2017). Oleuropeinden zengin zeytin yaprağı ekstraktının melanoma, kolorektal ve meme kanseri gibi çeşitli katı tümörlerin yüksek glikoliptik aktivitesini azaltabildiğini, aynı zamanda kronik miyeloid lösemi hücrelerinin de bu doğal ürünün çok çeşitli malignite için geleneksel tedavi ile birlikte olası bir kullanımını önerdiğini göstermişlerdir

(Ruzzolini ve ark. 2020). Oleuropein, Elenolik Asit ve HT'nin bir esteridir ve Oleaceae'nin Secoiridoid glukozitleri için ortak olan bir oleosidik iskeleti vardır (Şekil 2-7) (Nediani ve ark 2019). Oleo europaea L.'deki Oleuropein biyosentezi karmaşıktır ve henüz iyi anlaşılmamıştır. Karbon iskeleti mevalyonik asitten türetilmiştir (Shamshoum, ve ark. 2017).



Şekil 2-7: Oleuropein yapı iskeleti

(Nediani ve ark. 2019)

2.4.1. Antikanser Etkileri

Redoks dengesi hücre büyümesinde, aktivasyonunda ve ölümünde önemli bir rol oynar. Oksidatif strese verilen hücresel yanıtlar mitokondri ve endoplazmik retikulumdaki değişiklikleri içerir ve bu değişiklikler apoptozdan nekroza kadar pek çok şekilde hücre ölümüne yol açar (Ortona ve ark., 2008) Biyofenoller, apoptozu indükleyerek veya çeşitli mekanizmalarla hücre bölünmesini inhibe ederek karsinogenezin farklı aşamalarında hücre büyümesini doğrudan kontrol edebilir (Fishbein, 2012 p. 195-242). Naturel sızma zeytinyağı bakımından zengin bir diyetin

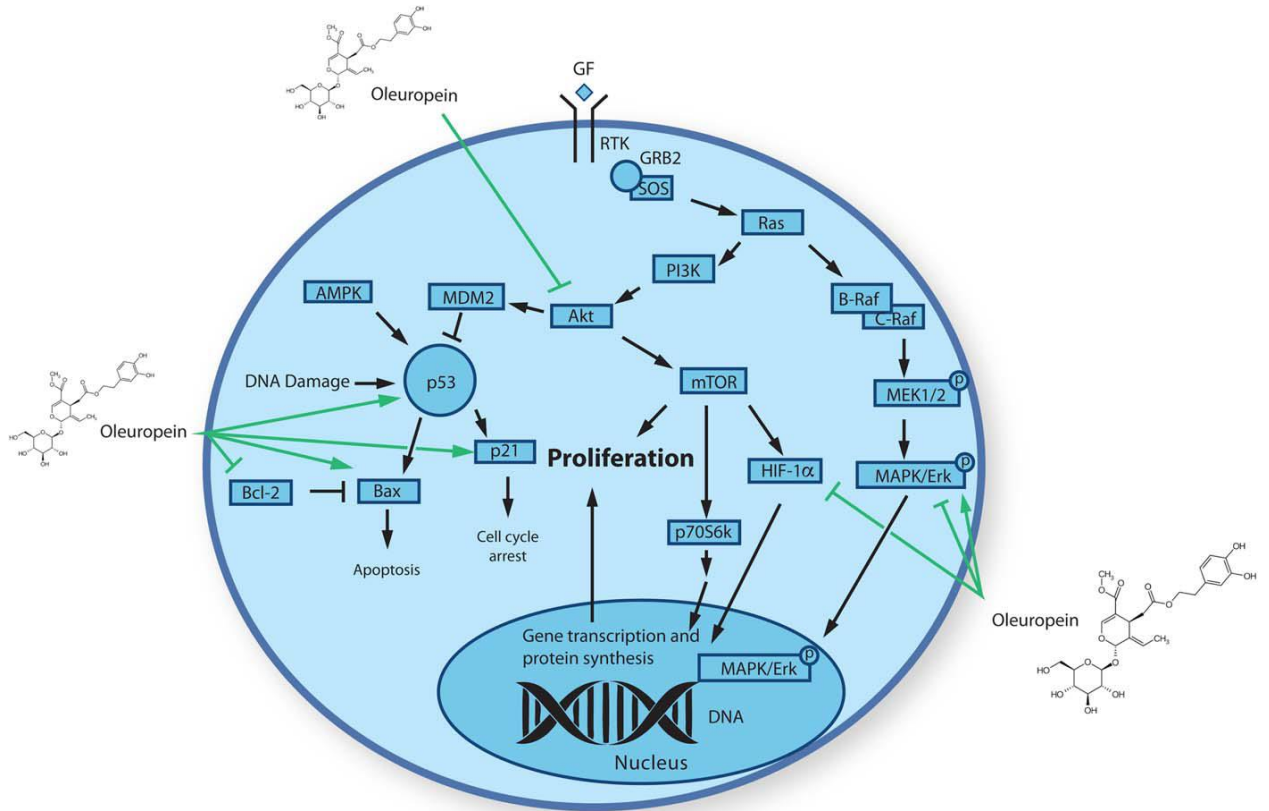
tüketimi, solunum yolu, üst gastrointestinal, meme ve kolorektal kanserler de dahil olmak üzere birkaç neoplazm riskinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. HT ve Oleuropein, Zeytin yağının antikanser aktivite araştırmalarının ana odak noktasıdır. UV-B maruziyeti sonrası naturel sızma zeytinyağının topikal uygulaması fare cilt tümörlerini etkili bir şekilde azalttığı ve bu etkinin epidermisteki DNA'nın oksidatif hasarının azalmasından kaynaklanmış alabileceği belirtilmiştir. Sızma zeytin yağı kolon karsinogenezinin (başlama, yayılma ve metastaz) in vitro birkaç aşamasını inhibe edebildiği ayrıca insan dişeti malign hücre hattı HSG1 de naturel sızma zeytinyağı biyofenollerine karşı duyarlı olduğu üzerine çalışmalar bulunmaktadır. HER2-aşırı eksprese eden meme karsinom hücrelerinde zeytinyağı biyofenolleri, HER2 proteininin proteozomal bozulmasını teşvik ederek ve diyet karbonhidratlarının yağa dönüştürülmesinde rol oynayan önemli bir enzim olan yağ asidi sintaz enzimi FASN'ın ekspresyonunu azaltarak HER2 gen aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Fishbein, 2012 p. 195-242).

Çeşitli IC₅₀ dozlarında Oleuropein tedavisinin ardından in vitro MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunun zamana bağlı bir şekilde azaldığını keşfedilmiştir (Liman ve ark. 2017). MCF-7 ile subkutan olarak enjekte edilen ve yiyeceklerinde Oleuropein verilen fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, peri pulmoner ve parankimal akciğer metastazı baskıladığı ortaya koyulmuştur (Sepportaa ve ark. 2014). Oleuropeinin, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında aktif NF-KB'yi baskıladığı, bu etkinin, oleuropeinin NF-KB aktivasyon kaskadının bileşenleri olan serin/treonin kinaz (Akt) ve Ib ekspresyonunu azaltarak yaptığı düşünülmektedir (Liu ve ark. 2019). TCAM-2 ve SEM-1 seminoma hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada da yine NF-κB yolunu inhibe ederek anti-proliferatif etki gösterdiği ve hücre göçünü önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir (Bossio ve ark. 2022). Oleuropein muamelesinin SKBR3 ve MCF7 hücrelerinde azalmış hücre canlılığı ve apoptozun artışı ile sonuçlandığı ve Her2 yüksek ekspresyonu olan SKBR3 hücrelerinin Her2 negatif MCF-7 hücrelerinden 5 kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Aynı grubun çalışmalarında oleuropein ile birlikte kullanılan Transtuzumab antikanser ilacının etkinliğinin 50 kat daha arttığı belirlenmiştir (Menendez ve ark. 2007;2008). Oleuropeinin SKBR3 ve MCF-7/HER2 meme kanseri hücre hatlarında FASN seviyelerini bastırdığı (Menendez ve ark. 2008), MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığının azalttığı, hücre çoğalmasını engellediği, apoptoz indüklediği ve bu etkileri sayesinde de G0 / G1 fazında hücre

sayısını arttırdığı belirtilmiştir (Han ve ark 2009). Başka bir çalışmada ise MCF-7 meme kanseri hücrelerinin oleuropein'e maruz kalması, E2 kaynaklı ERK1/2 aktivasyonunun inhibisyonu ile ilişkili olarak proliferasyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir (Sirianni ve ark. 2010). Oleuropeinin ER negatif MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinin bir tümör baskılayıcı gen olan p21'in upregulasyonu, aktif kaspaz-3 seviyesinin artışı, proapoptotik Bax proteini seviyelerinin yükselmesi ve antiapoptoz Bcl-2 ve survivin proteinlerinin seviyelerinin azalması ile ilişkilendirilerek hücre döngüsünün durması sayesinde hücre çoğalmasının önemli ölçüde inhibisyonuna etkisi olduğu belirtilmiştir (Elami ve ark 2013). Benzer bir çalışmada ise MCF-7 hücrelerinde oleuropeinin p53 ve Bax artışına ve Bcl-2 yi azaltarak apoptozu arttırdığı (Hassan ve ark. 2014) MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde ise kanser hücrelerinin farklı dokulara metastazında rol oynayan Matris Metalloproteinazları (MMP) azaltırken, metalloproteinazların (TIMPS) doku inhibitörlerini arttırdığı belirtilmiştir (Hassan ve ark. 2012; Liman ve ark. 2017). U251 ve A172 insan glioblastoma hücre hatlarında oleuropein uygulanması MMP ekspresyonunun azaldığı belirtilmiştir (Liu ve ark. 2016). SKBR3 (ER negatif ve GPER pozitif) hücrelerinde Bax, PARP1, Kaspaz 3- 9, P21, P53 miktarının ve ERK1/2 yollağının aktivasyonun arttığı ayrıca Bcl-2 ve Siklin D1in ise azaldığı tespit edilmiştir (Chimento ve ark. 2014) Kolon kanser hücre hattı olan HT29 ve SW620 hücrelerinde oleuropeinin proliferasyonu azaltarak apoptozu arttırdığı ve hücre döngüsünde S fazını durdurduğu belirlenmiştir (Notarnicola ve ark. 2011), benzer bir çalışmada ise SW480 ve HT29 hücrelerinde G2-M siklusunda durdurduğu ve yine hücre çoğalmasını azaltarak apoptozu arttırdığı belirtilmiştir (Fernandez-Arroyo ve ark. 2012). Bir başka çalışmada ise HT29 hücrelerinde hücre döngüsünde S fazında durduğu ve p53 artışı ve HIF-1 alfa azalması belirlenmiştir (Cardeno ve ark. 2013).

Karaciğer kanser hücre hatlarında HCC, HepG2 ve Huh7 hücrelerinde hücre canlılığının ve çoğalmanın azaldığı ve apoptozun arttığı, Kaspaz 3, 8 ve 9 un, PARP, Bax ve hücre içi Serbest oksijen radikal (ROS) seviyesinin arttığı ve Bcl-2 p-Akt'nin (fosforillenmiş Akt) azaldığı belirlenmiştir (Yan ve ark. 2015). HepG2 hücre hattında kemoteröpatik cisplatin ile birlikte oleuropein kullanımında MMP azalması gözlemlenmiş ve bu tedavinin metastazı azaltma için kombin olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Sherif ve Al-Gayyar 2018).

Prostat ve pankreas kanseri hücre hatlarında canlılık azaldığı (Acquaviva ve ark. 2012; Goldsmith ve ark. 2015), tiroid kanser hücrelerinde çoğalmanın azaldığı H₂O₂ kaynaklı Rosun azaldığı (Bulotta ve ark. 2013), osteosarkoma hücre hatlarında sitotoksitenin arttığı belirlenmiştir (Morana ve ark. 2016). Lösemi hücre hattı HL60da canlılığın azaldığı, apoptoz ve DNA fragmentasyonun arttığı (Anter ve ark. 2011), nöroblastoma hücre hattında çoğalmanın azaldığı ve apoptozun arttığı belirlenmiştir (Secme ve ark. 2016). Şekil 2-8’de oleuropeinin hücre içerisindeki etkilerin bir kısmı belirtilmiştir.



Şekil 2-8: Oleuropeinin apoptoz yolağı üzerine etkileri

2.5. Karnosik Asitten Zengin Biberiye Ekstraktı

Karnosik asit ilk olarak *Salvia officinalis* L. Linde tarafından keşfedilmiş, daha sonra ise Wenkert ve ark. *Rosmarinus officinalis* L. yapraklarında karnosik asitin çok daha yüksek seviyelerde bulunduğu belirtmiştir (Birtic 2015). Türkçe kuşdili, hasalban ve akpüren gibi farklı isimlerle anılan biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) Nane Ailesi

Lamiaceae'nin (ballıbabalığiller) ailesinin bir üyesidir. Akdeniz bölgesine özgü olan bu bitki mutfakta kullanımının yanı sıra tıbbi kullanım alanına da sahiptir. Biberiye ekstraktı ana polifenoller, diterpenler karnosik asit (KA) ve rosmarinik asit (RA) içerir (Moore ve ark. 2016; Begum ve ark. 2013). Akdeniz bitkilerinin, düşük su mevcudiyeti, yüksek ışık, sıcaklık dalgalanmaları ve besin yoksunluğu dahil olmak üzere pek çok çevresel stres koşullarına maruz kalmaktadır. Bu tür stresler, antioksidan savunmalar ile ROS miktarı arasındaki dengesizliğe neden olabilir, bu da oksidatif strese neden olur. Bazı bitkiler bu oksidatif stresi azaltmak için yüksek antioksidan özellikleri gösteren karnosik aside sahiptir (Birtić, ve ark. 2015). KA ve RA'nın güçlü antikanser etkileri bilinmektedir. Biberiye ekstraktının daha önceki çalışmalar sonucunda antioksidan, anti-enflamatuvar, antikanser ve antidiyabetik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Baron ve ark 2021).

2.5.1. Anti Kanser Etkisi

Antikanser aktivitesinin tespiti için yapılan ilk araştırmalarda Karnosik asit yer alır. Karnosik asit, lösemik hücrelerde nekrotik hücre ölümü olmadan apoptoz ile hücre ölümüne ve antiproliferatif etkiye sebep olduğu belirtilmiştir. Karnosik asitin antikanser etkilerini güçlendirmek için D vitamini ve retinoik asit metabolitleri gibi diğer doğal antikanser bileşiklerle sinerjik olarak iş birliği yapabileceği de gösterilmiştir. Bununla birlikte hem onkolojik hücrelerde hem de diğer alanlarında yapılan çalışmalarda, karnosik asitin birçok hastalığının tedavisinde yararlı olabileceği belirtilmiştir (Bahria ve ark. 2016).

Caco-2, HT29 ve LoVo hücre hatlarında karnosik asitin apoptozu indüklediği, hücre göçünü ve proteolitik enzim aktivitelerini azalttığı belirtilmiş ve büyük olasılıkla COX-2 mRNA ekspresyonunun azalmasıyla Caco-2 hücre büyümesini inhibe ettiği öne sürülmüştür. Bütün hücrelerin sonuçlarında ise karnosik asitin hücre proliferasyonu ve apoptoz yollarında yer alan farklı hedefleri modüle edebileceği sonucu ortaya konulmuştur. Bu bulgular karnosik asitin kolorektal kanser ilerlemesine karşı kemopreventif ve/veya kemoterapötik ajan olarak hizmet edebileceğini göstermektedir (Barni ve ark 2012). Karnosik asitin CaCo-2 (Colorectal adenocarcinoma) hücrelerinde H₂O₂ ilişkili oksidatif kaynaklı DNA hasarını ve görünür ışık kaynaklı oksidatif hasarı azaltarak uzun ve kısa süreli antioksidan etkisi ile hücre kolonileşmesini azalttığını (Slamenova ve ark 2002), SW480 (Colorectal adenocarcinoma) hücre hattında ise

hücre bölünmesini azalttığını (Yi ve Wetzstein 2011), SW480 ve HT29 hücre hatlarının ikisi ile yapılan çalışmada ise hücre çoğalmasının SW480 hücre hattında HT29a oranla daha fazla azaldığını ve hücre döngüsünü durduğu belirlenmiştir (Valdés ve ark. 2013).

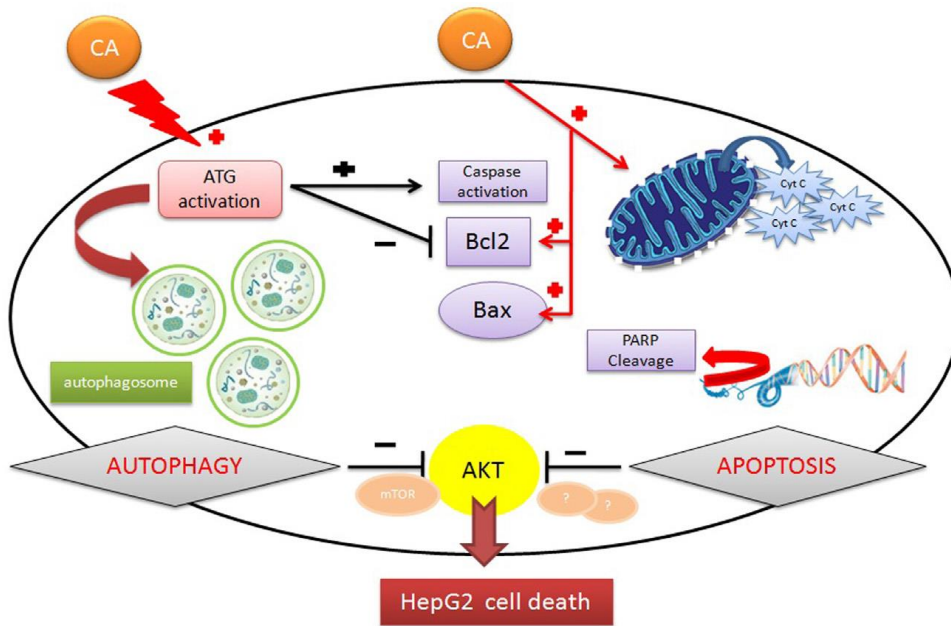
SW620 ve DLD-1 kolorektal adenokarsinom hücre hatlarında yapılan çalışmada f 5-fluorouracil (5-FU) ile birlikte kullanılan biberiye ekstraktının bu ajan ile sinerjik etki gösterdiği belirtilmiştir. 5-FU'nun ana etki mekanizması, Deoksitimidin mono fosfatın DTMP sentezi için gerekli olan timidilat sentetaz enziminin (TMS'lerin) inhibisyonu üzerinden gerçekleşmektedir. Bununla birlikte, 5-FU dirençli timidin kinaz enzimi (TK1) tarafından kazanılabilmekte ve tedavide sonuç alınmaya sebep olmaktadır. Biberiye ekstraktı ile kullanılan 5-FU'nun hem direnç bulunmayan hücrelerde hem de dirençli hücrelerde etkisinin artabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada ikisi birlikte PARP kesilmesinin arttırdığı, hücre çoğalmasını azalttığı ve apoptozu arttırırken transformasyonu düşürdüğü belirtilmiştir. (González-Vallinas ve ark. 2013).

Yine aynı grubun aynı hücre hatları ile yapılan farklı bir çalışmada biberiye ekstraktının PARP kesilmesini ve Glukozaminil N-Asetil Transferaz 3 (GCNT3) artışı ve miR-15b gen ekspresyonunu azaltarak hücre canlılığını düşürdüğü belirtilmiştir (González-Vallinas ve ark. 2014).

CA ile tedavi edilen insan kolon kanseri HCT116 hücrelerinin canlılığında bir azalma gösterilmiştir. ROS üretimi, p53 ve Bax indüksiyonu, kaspaz 3-9 aktivasyonu, PARP bölünmesi ve STAT3 sinyal yolu inhibisyonu yoluyla HCT116 hücreleri apoptozunu tetiklediği belirtilmiştir (Kim ve ark. 2016). Ayrıca yine aynı hücre hattında yapılan iki çalışma ise hücre çoğalmasında azalma, hücre döngüsünde duraklama ve apoptoz artışı belirlenmiştir (Ibanez ve ark 2012; Dilas ve ark. 2012). Dekstran sodyum sülfat ile indüklenen bir fare kolit modelinde ve azoksimehanın neden olduğu kolon kanseri modelinde karnosik asidin etkisini test edilmiş. Tedavi edilmeyen hayvanlarla karşılaştırıldığında, CA ile tedavi edilen fareler kolon tümörlerinin sayısında bir azalma ve dolaşımdaki leptin, adiponektin, insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 konsantrasyonlarında bir azalma göstermiştir. Ayrıca kolondaki leptin ve insülin reseptörleri, fosforilasyonlu Akt ve ERK, Bcl-xL ve siklinD1 proteininin ekspresyonları CA tedavisi ile zayıfladığı belirtilmiştir (Bahria ve ark. 2016).

Biberiyeden izole edilmiş karnosik asitin HepG2 hücrelerinde otofajik hücre ölümüne önemli ölçüde neden olduğu belirtilmiştir. Karnosik asit tedavisinin otofajik vakuollerin oluşumuna neden olduğu, PI3K veya PTEN üzerinde herhangi bir etkisi olmadan fosforillenmiş Akt ve mTOR seviyelerini azalttığı ve en önemlisi, AKT'nin aşırı ekspresyonu ile Akt/mTOR yolunun inhibisyonu yoluyla otofajik hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (Gao ve ark. 2015). Buna karşılık bir başka çalışmada karnosik asitin HepG2 hücrelerinin hücre canlılığını azalttığını, hızlı bir kaspaz-3 aktivasyonu ve Akt'ın devre dışı bırakılması eşliğinde PARP proteolitik bölünmesine neden olduğunu gösterilmiştir (Xiang ve ark. 2015). Bu aynı hücre tipindeki iki farklı sonucun çevresel faktörler besiyeri içerikleri gibi farklılıklardan kaynaklanabileceği düşüncesini ortaya atılmasına sebep olmuştur (Bahria ve ark. 2016).

Apoptozu inhibe ettiği iyi bilinen PI3 kinaz / Akt yolu aktivasyonunun CA uygulanan insan kolon kanseri HT-29 hücrelerinde otofajiyi de inhibe edebileceğini göstermiştir. Ek olarak, mTOR/Akt sinyal yolu, ölümle ilişkili protein kinaz (DAPK) ve p53 aktivasyonunun her iki işleme de katıldığı açıklanmıştır. Çeşitli çalışmalar, iki tür ATG'nin Bcl-2 ailesi proteinleri ile etkileşime girebileceğini, FADD ve kaspazların aktivasyonuna neden olabileceğini göstermektedir (Şekil 2-9) (Maria-Simona ve ark. 2017)



Şekil 2-9: Karnosik asitin apoptoz yollağındaki etkilerinden bazıları

(Maria-Simona ve ark. 2017)

Biberiye ekstraktının uygulandığı MIA-PaCa-2 ve PANC-1 pankreatik karsinoma hücre hatlarında PARP kesilmesinin arttığı ve hücre canlılık oranının düştüğü belirlenmiştir. MCF-7, MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 hücre hattında canlılığın azaldığı ve bir başka çalışmada ise SK-BR-3(HER2+) UACC-812 (HER2+) T-47D(ER+) MCF-7(ER+) MDA-MB-231 hücre hatlarında yapılan çalışmada kemoterapik ajanların hücre canlılığında üzerinde yapmış olduğu azalmayı arttırdığı apoptozu arttırdığı ve hücre transformasyonunu azalttığı belirtilmiştir. Biberiye ekstraktı uygulanmış HeLA hücrelerinde proliferasyonu azalttığı, SK-OV3 ve HO-8910 hücrelerinde ise canlılığı azalttığı A2780 ve A2780CP70 (sisplatine dirençli) hücre proliferasyonunun azaldığı ayrıca sisplatine olan direncin azaldığı belirtilirken, apoptozun arttığı apoptotik genlerin aktivasyonu ile hücre döngüsünün durduğu belirtilmiştir. Prostat ve mesane kanseri hücre hatlarında da benzer etkilerden bahsedilmiştir. Hep-3B Bel-7402 ve HepG2 gibi hepatoselüler karsinoma hücre hatlarında hücre canlılığının azaldığı NCI-H82 hücre hattında canlılığı A549 hücre hattında, p-Akt, p-mTOR'un azaldığı PARP kesilmesinin artışı ile hücre çoğalmasında ve hayatta kalma oranında azalma gözlemlenirken apoptozda artma belirtilmiştir. İn vivo çalışmalarda ise RE uygulanan farelerde tümör büyüklüğünde, sayısında azalma ve hacminde düşüş, yaşam süresinde artış gözlemlenmiştir. CA uygulamaları da biberiye ekstraktı uygulamaları ile aynı yönde etki etmiştir. (Moore ve ark. 2016)

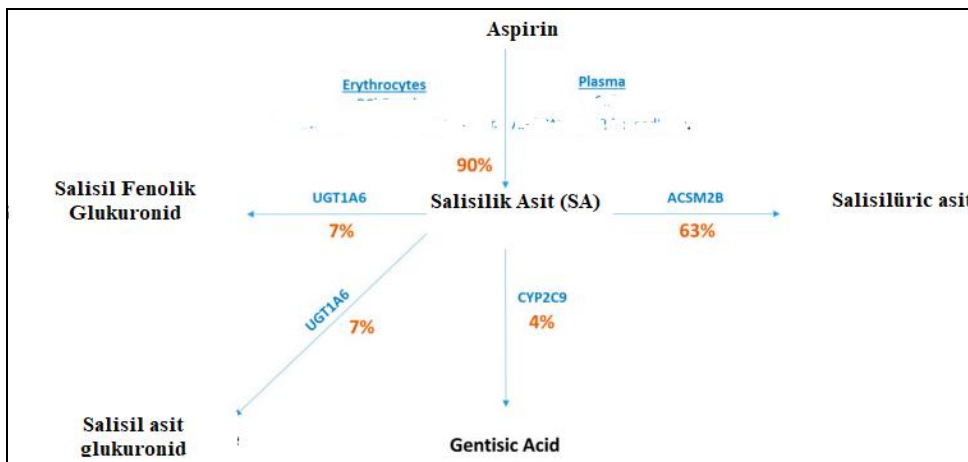
2.6. Salisilik Asit

Salisilik asit (SA), birçok patojene direnç oluşturmak için gerekli olan bir ana bitki hormonudur (Ding ve Ding 2020). Salisilik asit, orto pozisyonunda hidroksi grubu olan benzoik asit olan mono hidroksibenzoik asittir. Beyaz söğüt yapraklardan ve kabuğundan elde edilir. Antienfektif, antifungal ajan, keratolitik ilaç, L-askorbat peroksidaz inhibitörüdür. Hem bir bitki metaboliti iken hem alg metaboliti hem de bir bitki hormonu olarak rol oynar. Salisilatın konjuge asididir (Pubchem; National Library of Medicine. Salisilik Asit)

Bir asır önce aktif bir anti-enflamatuar bileşik olarak söğüt kabuğu ekstraktlarında tanımlanmıştır. Acı tadı nedeniyle, kullanım kolaylığı için salisilik asitin (2-hidroksibenzoik asit) kimyasal türevleri sentezlenmiştir. Asetilsalisilik asit(aspirin) ise bu denemeler sonucunda tanımlanmış olup salisilik asitin acı tadını ortadan kaldırmasına rağmen anti-enflamatuar etkiyi koruduğu anlaşıldığında 100 yıl önce insan

hastalıklarını tedavi etmek için sıklıkla kullanır hale gelmiştir Ağrı, enflamatuar semptomlar ve ateşi hafifletmek için en yaygın kullanılan ilaç olarak da hala günümüzde kullanılmaktadır. Aspirin ayrıca miyokard enfarktüsünü ve iskemik inme önlemenin yanı sıra akut miyokard enfarktüsünü tedavi etmek için etkinlik oluşturmuştur (Awtry ve Loscalzo 2000). Salisilik asit, araşidonik asidin prostaglandin ve tromboksanların öncüllerine dönüşümünü azaltmak için siklooksigenaz 1 ve 2'yi (COX-1 ve COX-2) doğrudan geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Salisilat analjezik ve antienflamatuar aktiviteden dolayı romatizmal hastalıklarda kullanılmaktadır. Salisilik asit, akne, sedef hastalığı, nasır, corn, keratoz pilaris ve siğillerin tedavisi için birçok cilt bakım ürününün önemli bir bileşendir. Salisilik asit, epidermisin hücrelerinin daha kolay soyulmasını sağlar. Cilt hücreleri üzerindeki etkisi nedeniyle, kepek tedavisinde kullanılan birkaç şampuanda salisilik asit kullanılır (Pubchem; National Library of Medicine. Salisilik Asit). Bitki kaynaklarından elde edilen salisilatlar, iltihaplanma, ateş ve ağrı gibi çeşitli rahatsızlıkları tedavi etmek için yüzyıllardır farklı kültürler tarafından kullanılmaktadır. Ayrıca, son epidemiyolojik çalışmalar, aspirin kullanımının kanserlerde, özellikle kolon kanserinde bir azalma ile eşlik ettiğini göstermektedir (Kenneth 2000)

Aspirin (asetilsalisilik asit, SA'ya hızla deasetilatlanır) etkili bir primer ve ikincil kemopreventif ajandır. (Nounu ve ark. 2021) Aspirinin metabolize edilmesi şekil 2-10'da verilmiştir.



Şekil 2-10: Aspirin metabolizması yolu

(Nounu ve ark. 2021)

Aspirin ve steroid olmayan antienflamatuar ilaçların proenflamatuar prostaglandin E2 sentezini inhibe ettiğinin (Vane ve Botting 1981) keşfinden sonra aspirinin aktif bölgeye yakın (COX-1'in tirozin 385) yakınında bulunan asetilasyon seriooksijenaz-1 (COX-1) aktivitesini inhibe ettiğini ve bu serin kalıntısının asetilasyonunun, araşidonik erişimini engellediği gösterilmiştir (Kurumbail ve ark. 1996; Mitchell ve ark. 1994).Aspirin benzer bir mekanizma ile COX-2'yi inhibe eder (Mitchell ve ark. 1994). Myokard enfaktüsündeki tıropatik etkisi de Trombosit COX-1 aktivitesinin inhibisyonuna açıkça bağlanmıştır (Mitchell ve ark. 1994).

Kardiyoprotektif özellikleri iyi belirlenmiştir; bununla birlikte, son kanıtlar, kanser önleyici ajan olarak da işlev yapabileceğini ortaya koymuştur. Enzim aktivitesini, transkripsiyon faktörlerini, hücrel sinyali ve mitokondriyal fonksiyonları etkileyen çoklu mekanizmalar önerilmesine rağmen, araştırmaya açık bir alandır. (Alfonso ve ark. 2014)

2.6.1. Antikanser Etkisi

Epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen kanıtlar, düzenli aspirin kullanımı ile kanser insidansı ve mortalitesi arasında anlamlı bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Bu ters korelasyon artık kolon, meme, prostat, akciğer ve cilt kanserleri için kurulmuştur. Hayvan ve insan çalışmaları da aspirinin kemopreventif rolünü destekler. Aspirin kolorektal kanser hastalarında anormal kript o odak oluşumunu baskılar (Pubchem; National Library of Medicine. Salisilik Asit).

İnsan meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231'de aspirinin tümör baskılayıcı protein p53'ü asetilize ettiğini ve hedef genlerinin ekspresyonunu indüklediğini gösterilmiştir. Kanserde önemli olan, glikolitik yolda yer alan altı enzimin aspirin tedavisi üzerine asetillendiği bulunmuş. Bunlar aldolaz, GAPDH, PGM, Enolaz, PKM2, LDH-A ve LDH-B'dir. Bu asetillenmenin işlevsellik ile ilgili çalışmaları da yapılmış olup en etkili olarak ise G6PD bulunmuştur Guoqiang ve ark. 2016). Lactobacillus rhamnosus GG ile kombine uygulandığında salisilik asitin insan kolon (HT-29) ve prostat (PC-3) kanser hücreleri üzerinde sitotoksik ve canlılık azaltıcı etkileri belirlenmiştir (Celebioglu 2021). Aspirin kullanımının meme kanseri ile ilişkisini değerlendiren bir metaanalize göre meme kanseri riskinin %9 azaldığının belirtilmiştir (Cao ve Tan 2020).

Bir başka çalışmada ise salisilat ve aspirinin düz kas hücresi proliferasyonunun inhibisyonunu göstermektedir. Salisilat, RB fosforilasyonunu ve sikline bağımlı kinaz 2 aktivitesini ve ayrıca Siklin A seviyesini baskıladığı ve bununla birlikte, siklin bağımlı kinazlar, p21WAF1 ve P27KIP1'in yanı sıra p53 seviyelerini de arttırdığı belirtilmiştir. Ayrıca salisilatın düz kas hücrelerinde NF-κB aktivasyonunu inhibe ettiğini doğrulamıştır (Marra ve ark. 2000).

İnsan kolon (HCT 116, HT-29, SW480); meme (MDA-MB-231, MCF7), deri (SK-MEL-28, SK-MEL-5); akciğer (NCI-H226); prostat (PC-3); over (OVCAR-3), ve fare deri melanoma (B16-F10) hücrelerinde Salisilik asitin ve aspirinin Siklin A2/CDK2 aşağı regülasyonu belirtilmiş ve çeşitli mRNAların seviyelerinde değişiklikler keşfedilmiştir. Bu sayede hücre döngüsü üzerine etkisi hakkında fikir edinilmiş olmuştur (Dachineni ve ark. 2016)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar,

- Spektrofotometre (Thermo Multiskan SPECTRUM),
- Santrifüj (Hettich, rotina 38)
- İnverted Işık mikroskobu (Olympus CKX41),
- Laminar flow kabin
- Hücre Sayım Cihazı (Beckman Coulter Vi Cell XR)
- CO2 İnkübatörü (Thermo electro corporation)
- Sıvı azot tankı (-196 °C)
- -80 °C derin dondurucu
- Vorteks (Velp scientifica)
- Sıcak su banyosu
- + 4°C ve -20 °C Buzdolabı (Bosh)
- Muse Cell analyzer (Merck)
- Roche Light Cyclor 480
- Nanodrop 2000 (Thermo Scientific)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Sarf Malzemesi ve Kitler,

DMEM (GİBCO), DMEM/F12 (GİBCO), Tripsin/EDTA %0,25 (Gibco), L-glutamin, Vi-Cell Reagents (Beckman Coulter), PBS tableti (VWR life science), Fetal Bovin Serum (Biochrome), Penisilin/Streptomisin (Gibco), Dimetil sülfoksit (Applichem), Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche), 96 well plates (Sarstedt), 6 well plates (Sarstedt), Hücre kültürü flaskları 75 cm² ve 25 cm² (Sarstedt). 5ml, 10ml, 25ml serolojik pipet (Jet Biofil), pipetör, 10,100,1000 ul pipet ucu, mikropipet seti, 15 ml ve 50 ml santrifüj tüpü (Jet Biofil), 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü, cell scraper (Jet Biofil), Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay kiti, NucleoGene cDNA Synthesis kiti, Exiqon RNA izolasyon kiti, BCL2, APAF1, BAX ve CDK2 primerleri, SYBR Green Master Mix (Biorad)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücrelerin Çoğaltılması

Daha önce ATCC'den temin edilerek çoğaltılan ve sıvı azot içerisinde saklanan MCF-10A ve MDA MD 231 hücreleri hızlı çözündürme yöntemiyle çözündürülüp %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren kendine özgü mediumların yer aldığı flasklara ekilmiştir. MDA-MB-231 için DMEM/F12, MCF-10A için ise DMEM/F12 içine ek olarak insülin, EGF, hidrokortizon, koleratoksin eklenmesi ile oluşan bir media hazırlanmıştır (The Brugge Lab; Media Recipes MCF10A Protokolü, Harvard Üniversitesi). Ardından flasklar %5 oranında CO₂ içeren 37°C inkübatöre kaldırılarak büyümesi ve çoğalması sağlanmıştır.

3.2.2. Hücrelerin Sayılması ve Ekilmesi

Hücreler yeterli sayıya ulaştığında deney aşamasına geçmek için hücreler flask yüzeyinden tripsinizasyon işlemiyle kaldırılmıştır. Bunun için ilk olarak flaskların içerisinde yer alan medium çekilerek flask yüzeyi soğuk PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra 2 ml tripsin eklenerek inkübatöre kaldırılmış ve 5 dk bekletilmiştir. Flask yüzeyinden kalkan hücreler inverted mikroskopta incelendikten sonra üzerine 4 ml medium eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Pipet ile tüm flask içindeki solüsyon toplanarak 15 cm'lik falkonlara toplanmış ve 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemiyle hücreler dibe çöktükten sonra süpernatant boşaltılarak hücreler medium ile dilüe edilmiş ve sayım işlemine geçilmiştir. Bu işlem sırasında hücre süpernatantından 100 ul çekilerek hücre sayım cihazı vialine 400 ul medium eklenmiş ve vial Vi-Cell Otomatik Hücre Sayım cihazına yüklenmiştir. Vi-Cell Otomatik Hücre Sayım cihazı tripan mavisi ile hücre sayım prensibine dayalı bir sayım cihazıdır. Çıkan hücre sayısına göre gerekli dilüsyonlar yapılarak hücreler kuyu başına 10.000 hücre olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekilmiştir.

3.2.3. WST-1 ile Sitotoksisite Testi

WST-1 bir tetrazolyum tuzudur. Bu bileşik hücrelere girerek mitokondriyal dehidrojenazlarla reaksiyona girer ve suda çözünen formazan kristali adı verilen sarı renkli bir kristal oluşturur. Bu sayede hücre ne kadar canlı ise o kadar güçlü sarı formazan kristal oluşacak, ne kadar ölü ise formazan kristali oluşmamasına bağlı olarak ışıma yapmayacaktır. Formazan kristali oluşumundaki bu değişim mikropate (Thermo Multiskan SPECTRUM) okuyucu ile 450 nm de ölçülmüştür.

Bunun için bu tez kapsamında oleuropeince zengin zeytin yaprağı ekstresi, karnosik asitçe zengin biberiye ekstresi ve salisilik asit çeşitli dozlarda hücrelere verilerek sitotoksitesi belirlenmiştir. Tüm maddeler %60 alkolde çözündürülerek 500 ug/ml konsantrasyonunda ana stok çözeltileri oluşturulmuştur. Ardından ana stoklar oleuropein için (0-80 µg/ml), karnosik asit için (0-60µg/ml), ve salisilik asit için (0-250 µg/ml) dozlarını uygulamak üzere dilüe edilmiştir.

96 kuyulu plakalara ekilen hücrelerin plaka yüzeyine tutunması için 1 gün bekletildikten sonra hücrelere belirlenen dozlarda maddeler uygulanmış ve inkübatöre kaldırılmıştır. Deney 4 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ölçüm yapılmadan 1,5 sa öncesinde hücrelere WST-1 ajanı verilmiş ve 24, 48 ve 72. saatlerde mikropate okuyucu ile 450 nm de ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonucunda Graphpad Prism programı ile tüm maddelerin IC50 değerleri belirlenmiştir. IC 50 değerleri belirlenen maddelerden 3 lü karışım oluşturularak yukarıda belirtilen hücre ekim ve (0,%25, %50, %75, %100) dozlama işlemleri sonrasında sitotoksitesi belirlenmiş ve karışımın IC50 değeri bulunmuştur.

3.2.4. Apoptoz Tayini

Apoptoz tayini Muse TM Annexin V & Dead Cell Assay kiti kullanılarak Muse Cell Analyzer cihazında gerçekleştirilmiştir. Bunun için tripsinizasyon işlemi ile flask yüzeyinden kaldırılan MDA-MB-231 hücreleri sayım cihazı ile sayıldıktan sonra 6 kuyulu plakalara kuyu başına 250.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin tutunması için 24 sa geçtikten sonra hücreler 3 tekrarlı olacak şekilde 3'lü karışım ile dozlanmıştır. 48 sa sonra hücreler tripsinize edilerek falkonlarda toplanmış ve PBS'le yıkanan hücreler en az %1 FBS içeren 1 ml mediumla pipetajlanarak yeniden homojen hücre karışımı elde edilmiştir. Ardından 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 100 ul hücre karışımından alınıp üzerine 100 ul Luminex Annexin V boyası eklenerek vortekslenmiştir. Karanlıkta 20 dk. inkübe edildikten sonra Muse cell Analyzer cihazında tüm örnekler okutulmuştur.

3.2.5. RNA İzolasyonu

Tripsinizasyon ile flask yüzeyinden kaldıran MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri T₂₅ flasklara flask başına 3.10⁶ sayıda olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler 24 sa sonra belirlenen doz karışım ile muamele edilmiştir. Hücreler karışım ile muamele edildikten 48 sa sonra Exiqon RNA izolasyon kit protokolüne uygun olarak RNA izole

edilmiştir. Bunun için flasktan medium uzaklaştırılarak PBS ile flask yüzeyi yıkanmış 350 µL Lysis Solution flaska eklenmiştir. Cell Scraper ile flask tabanında kalan hücreler de kazındıktan sonra lizat, mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiştir. Üzerine 200 µL absolute Ethanol eklenerek 10 saniye vorteksledikten sonra 3,500 x g'den yüksek hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolona 400 µL Wash Solution eklenerek 14.000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve toplama tüpü boşaltılarak yıkama işlemi tekrar edilmiştir. Kolonlar yeni mikrosantrifüj tüpüne alındıktan sonra 50 µL Elution Buffer eklenerek 200 x g'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve kullanılıncaya dek -80°C'de saklanmıştır.

3.2.6. RNA Miktarının Spektrofotometrik Yöntemle Ölçülmesi

Örneklerden RNA izole edildikten sonra miktar ve saflıklarının belirlenmesi için spektrofotometrik ölçüm yapan Nanodrop (Thermo Scientific, Nanodrop2000) cihazında miktar tayinleri yapılmıştır. Ölçüm için tüm örnekler buz üzerinde çözündürülmüş ve pipetaj işlemi sonrasında her bir örnekten 1 ul cihaza yüklenmiştir. 260 ve 280 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerine göre miktarlar belirlenmiş ve sonuçlar ng/ul cinsinden alınmıştır. A260/280 ve A260/230 oranı 2 ve üstü olan RNA örnekleri ile çalışmaya devam edilmiştir.

3.2.7. cDNA Çevrimi

-80°C'de saklanan RNA örnekleri, Nucleogene kiti ile protokole uygun olarak cDNA'ya çevrilmiştir. Bunun için RNA'lar buz üzerinde çözündürüldükten sonra reaksiyon içerisinde 4 ul NucleoGene cDNA Synthesis kit (5X), ve geriye kalan 16 ul hacimde değişen oranlarda RNA ve su ile total hacimde 600 ng konsantrasyon olacak şekilde tüm örnekler birbirine eşitlenmiştir. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler ve inkübasyon süresine ilişkin tablolar sırası ile tablo 3-1 ve tablo 3-2'de verilmiştir.

Tablo 3-1: cDNA çevrimi reaksiyon bileşenleri

<i>Bileşenler</i>	<i>Hacim</i>	<i>Final Konsantrasyonu</i>
<i>NucleoGene cDNA Synthesis kit (5X)</i>	4 ul	1X 600 ng RNA
<i>RNA kalıbı</i>	Değişken	
<i>DNAase/RNAase free H2O</i>	Değişken	
<i>Toplam Hacim</i>	20 ul	

Tüm bileşenler yapılan hesaplamalara göre buz üzerinde 0,2 ul hacimdeki PCR tüplerine eklenerek düşük hızda spinlenmiş ve aşağıda yer alan programda inkübe edilmiştir.

İnkübasyon

Tablo 3-2: cDNA çevirimi inkübasyon koşulları

5 dakika	25°C
30 dakika	42°C
5 dakika	85°C

İnkübasyonun ardından oluşan cDNA'lar kullanılıncaya dek -20°C'de saklanmıştır.

3.2.8. Gerçek Zamanlı PCR İle Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin 3'lü karışım ile muamelesi sonucunda elde edilen cDNA' lardan gerçek zamanlı PCR ile apoptoz ve hücre döngüsü ile ilişkili; BCL2, APAF1, BAX ve CDK2 genlerinin ekspresyonlarındaki değişimler saptanmıştır. Flouresan boya olarak SYBR Green Master Mix (Biorad) kullanılmıştır. Bu değişimler Roche Light Cycler 480 cihazı ile belirlenmiştir. Reaksiyon öncesinde cDNA' lar 1/40 (0,75ng/ul) oranında dilüe edilmiştir. İnternal kontrol olarak B2M seçilmiştir. Reaksiyonda yer alan bileşenler ve reaksiyon koşulları sırasıyla tablo 3-3 ve tablo 3-4'te yer almaktadır.

Tablo 3-3: Gerçek zamanlı PCR Reaksiyon bileşenleri

<i>Reaksiyon Bileşenleri</i>	<i>Hacim</i>
<i>SYBR Green Master (2X)</i>	5 ul
<i>Forward ve Revers Primerleri (1 uM)</i>	1 ul
<i>cDNA</i>	4 ul
<i>Total Hacim</i>	10 ul

Tablo 3-4: Gerçek zamanlı PCR reaksiyon koşulları

Denatürasyon	95 °C	5 dk	1 siklus
Amplifikasyon	95 °C	10 sn	45 siklus
	60 °C	45 sn	
	72 °C	25 sn	
Soğutma	40 °C	20 sn	1 siklus

Reaksiyon sonunda cihaz Cp değerlerini vermiştir. ΔC_p değerine ulaşmak için hedef genlerin (BCL2, APAF1, BAX ve CDK2) Cp değeri, internal kontrol olarak belirlenen B2M Cp değerinden sayısal olarak çıkarılmıştır. 3'lü karışım uygulanmış deney grubunun ΔC_p değerinden, madde uygulanmamış kontrol grubunun ΔC_p değeri çıkarılarak $\Delta \Delta C_p$ değerine ulaşılmıştır. Ekspresyon değişimleri $2^{-\Delta \Delta C_p}$ formülü ile hesaplanmış ve kat değişimleri olarak verilmiştir.

3.2.9. İstatistiksel veriler ve Analizler

İstatistiksel analizler için Graphpad Prism 6.0 programı kullanılmıştır. WST-1 ve Annexin V- 7AAD analizleri için çift yönlü anova testi uygulanmıştır. P değeri 0.05'ten küçük olan değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

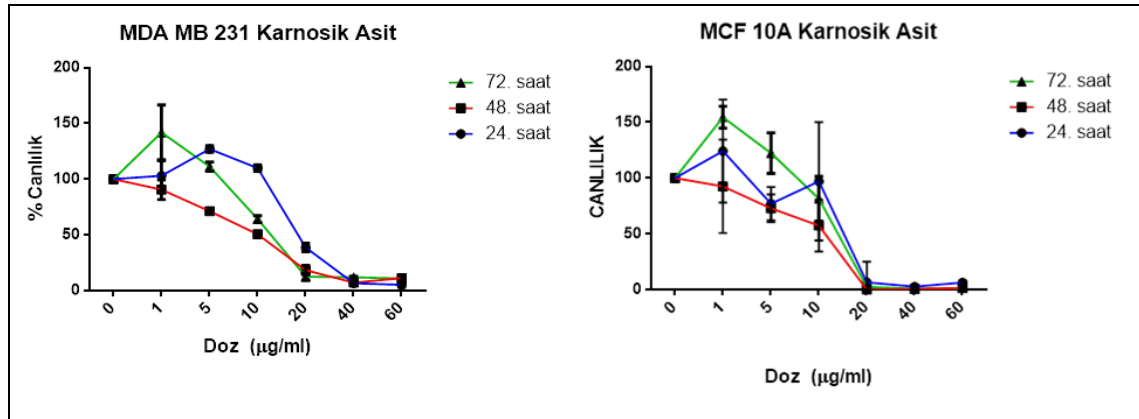
4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı WST-1 Deneyi Bulguları

MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında Karnosik Asit ve Oleuropeinden Zengin Bitki Özütleri ve Salisilik asit bireysel ve kombine olarak uygulanmıştır. Hücrelerde öncelikle ayrı ayrı uygulanan özütlerin ve maddenin etkileri WST-1 analizi ile belirlenmiş ve ardından sonuçlar (Graphpad Prism 6 ile) değerlendirilmiştir. Her bir maddenin IC50sine göre hazırlanan 3'lü karışımın etkileri de WST-1 analizi ile değerlendirilmiştir. Tekli ve kombin uygulamalarının WST-1 analiz bulguları aşağıda belirtilmiştir.

4.1.1. Karnosik Asitten Zengin Bitki Özütü Uygulanması

Karnosik Asitten Zengin Bitki Özütünün MDA-MB-231 hücre hattına uygulandıktan sonra, WST-1 testi ile çeşitli doz (1-60 µg/ml) ve zaman aralıklarında (24., 48. ve 72. saatler) hücre canlılığı/proliferasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Analiz sonucunda erken evrelerde (24. saat) özellikle orta dozdan (20 µg/ml) itibaren ve ilerleyen evrelerde (48. ve 72. saatler) düşük dozlardan (1-5 µg/ml) itibaren çok ileri derecede anlamlı sitotoksik etki gözlenmiştir ($p < 0.0001$). (Şekil 4-1 ve Tablo 4-1)



Şekil 4-1: Karnosik Asitten Zengin Bitki Özütünün MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattına etkisi

Tablo 4-1: Karnosik Asitten Zengin Biberiye Ekstraktının saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (doksuz) ile karşılaştırılması

Karnosik Asitten Zengin Özüt Doz (µg/ml)	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
1	103,05 ± 13,49	0,9765	90,61 ± 8,88	0,2613	141,99 ± 24,52	< 0,0001*
5	127,11 ± 2,87	< 0,0001*	71,19 ± 0,93	< 0,0001*	111,3 ± 4,17	0,1248
10	109,89 ± 2,82	0,2175	50,57 ± 1,43	< 0,0001*	64,21 ± 3,06	< 0,0001*
20	38,72 ± 3,71	< 0,0001*	18,43 ± 4,09	< 0,0001*	12,5 ± 3,33	< 0,0001*
40	6,8 ± 1,41	< 0,0001*	7,19 ± 0,99	< 0,0001*	12,04 ± 1	< 0,0001*
60	5,22 ± 2	< 0,0001*	11,22 ± 2,82	< 0,0001*	10,99 ± 0,64	< 0,0001*

İstatistiksel analiz iki-yönlü Anova Testi ile yapılmıştır. Sonuçlar ortalama± Standart sapma (X±SD) olarak verilmiştir. istatistiksel anlamlılık, p<0.05

Karnosik Asitten Zengin Bitki Özütü MCF10-A hücre hattına uygulandığında ise Şekil 4-1 ve Tablo 4-1’de görüldüğü üzere orta dozlardan itibaren (20µg/mL) hücre canlılığında istatistiksel anlamlı azalma gözlemlenmiştir (p<0,0001).

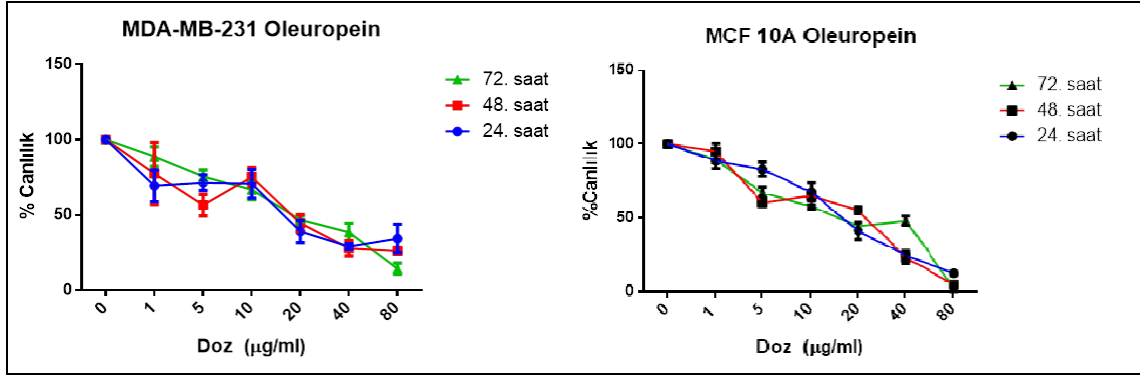
Tablo 4-2: Karnosik asitten zengin biberiye özütünün saatlere göre MCF-10A hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

İstatistiksel analiz iki-yönlü Anova Testi ile yapılmıştır. Sonuçlar ortalama± Standart sapma (X±SD) olarak verilmiştir. istatistiksel anlamlılık, $p < 0.05$

Karnosik Asitten Zengin Özüt Doz ($\mu\text{g/ml}$)	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
1	124,25 ± 46,16	0,3616	92,59 ± 41,86	0,9907	154,62 ± 9,88	0,002
5	77,1 ± 15,02	0,4187	72,91 ± 12,56	0,2582	122,4 ± 18,15	0,4409
10	97,11 ± 52,99	0,9997	57,41 ± 23,23	0,0227	81,54 ± 20,1	0,6316
20	6,65 ± 18,38	< 0,0001	-0,84 ± 0,98	< 0,0001	2,59 ± 0,64	< 0,0001
40	2,74 ± 0,91	< 0,0001	0,82 ± 0,32	< 0,0001	0,8 ± 1,04	< 0,0001
60	6,43 ± 1,73	< 0,0001	1,53 ± 0,52	< 0,0001	1,36 ± 0,85	< 0,0001

4.1.2. Oleuropeinden Zengin Bitki Özütü Uygulanması

Oleuropeinden Zengin Bitki Özütünün MDA-MB-231 hücre hattına uygulandıktan sonra, WST-1 testi ile çeşitli doz (1-80 $\mu\text{g/ml}$) ve zaman aralıklarında (24., 48. ve 72. saatler) hücre canlılığı/proliferasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bütün evrelerde ve 72. saat 1 $\mu\text{g/mL}$ dozunun dışında bütün dozlarda istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki gözlemlenmiştir ($p < 0.001$) (Şekil 4-2 ve Tablo 4-3).



Şekil 4-2: Oleuropeinden zengin bitki özütünün MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattına etkisi

Tablo 4-3: Oleuropeinden zengin bitki özütünün saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

Oleuropein Zengin Özüt Doz (µg/ml)	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
1	69,33 ± 10,47	< 0,0001	77,41 ± 20,69	0,0007	88,73 ± 6,42	0,1732
5	71,37 ± 5,23	< 0,0001	56,56 ± 7,13	< 0,0001	75,53 ± 4,26	0,0002
10	70,63 ± 9,49	< 0,0001	75,22 ± 6,37	0,0002	66,64 ± 6,48	< 0,0001
20	38,88 ± 7,45	< 0,0001	44,42 ± 5,9	< 0,0001	46,68 ± 2,8	< 0,0001
40	28,97 ± 1,83	< 0,0001	27,84 ± 5,13	< 0,0001	38,39 ± 5,87	< 0,0001
80	34,23 ± 9,44	< 0,0001	26,06 ± 0,56	< 0,0001	14,16 ± 3,79	< 0,0001

İstatistiksel analiz iki-yönlü Anova Testi ile yapılmıştır. Sonuçlar ortalama± Standart sapma (X±SD) olarak verilmiştir. istatistiksel anlamlılık, p<0.05

Oleuropeinden Zengin Bitki Özütünün MCF-10A hücre hattına uygulanması sonucunda ise Şekil 4-2 ve Tablo 4-4’de görüldüğü üzere bütün evrelerde ve 48. saat 1 µg/mL dozunun dışında bütün dozlarda istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki gözlemlenmiştir (p<0,0005).

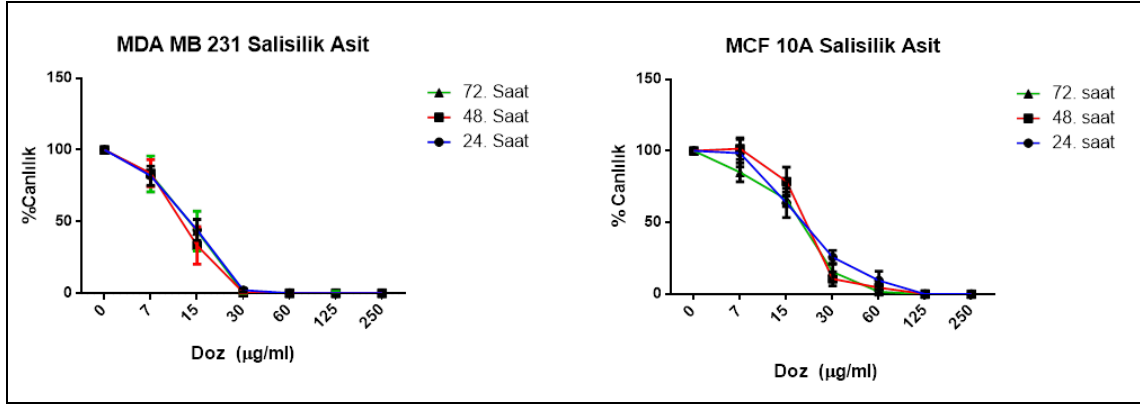
Tablo 4-4: Oleuropeinden zengin bitki özütünün saatlere göre MCF-10A hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

Oleuropeinden Zengin Özüt Doz (µg/ml)	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
1	88,52 ± 5,09	< 0,0001	94,97 ± 5,25	0,1635	89,55 ± 0,4	0,0004
5	82,85 ± 4,65	< 0,0001	60,17 ± 0,81	< 0,0001	66,87 ± 3,95	< 0,0001
10	67,54 ± 6,09	< 0,0001	64,84 ± 2,94	< 0,0001	57,85 ± 1	< 0,0001
20	41,18 ± 5,85	< 0,0001	55,21 ± 0,98	< 0,0001	44,45 ± 2,53	< 0,0001
40	24,72 ± 2,99	< 0,0001	23,22 ± 3,93	< 0,0001	48,09 ± 3,06	< 0,0001
80	12,43 ± 1,31	< 0,0001	4,68 ± 0,46	< 0,0001	2,28 ± 0,54	< 0,0001

İstatistiksel analiz iki-yönlü Anova Testi ile yapılmıştır. Sonuçlar ortalama± Standart sapma (X±SD) olarak verilmiştir. istatistiksel anlamlılık, p<0.05

4.1.3. Salisilik Asit uygulanması

Salisik Asitin MDA-MB-231 hücre hattına uygulandıktan sonra, WST-1 testi ile çeşitli doz (1-250 µg/ml) ve zaman aralıklarında (24., 48. ve 72. saatler) hücre canlılığı/proliferasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bütün evrelerde ve bütün dozlarda istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki gözlemlenmiştir (p<0.002) (Şekil 4-3 ve Tablo 4-5).



Şekil 4-3: Salisilik Asit'in MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hattına etkisi

Tablo 4-5: Salisilik asitin saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

Salisilik Asit Doz (µg/ml)	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
7	81,94 ± 6,77	0,0003	83,74 ± 9,4	0,0012	83,19 ± 12,53	0,0007
15	44,23 ± 7,32	< 0,0001	33,34 ± 13,08	< 0,0001	43,4 ± 13,81	< 0,0001
30	2,17 ± 1,25	< 0,0001	0,57 ± 0,16	< 0,0001	0,49 ± 0,81	< 0,0001
60	0,14 ± 0,67	< 0,0001	-0,11 ± 0,45	< 0,0001	-0,43 ± 0,39	< 0,0001
125	-1,26 ± 0,47	< 0,0001	-0,91 ± 0,39	< 0,0001	-0,53 ± 1,69	< 0,0001
250	-4,18 ± 0,57	< 0,0001	-2,91 ± 0,46	< 0,0001	-3,73 ± 0,41	< 0,0001

İstatistiksel analiz iki-yönlü Anova Testi ile yapılmıştır. Sonuçlar ortalama± Standart sapma (X±SD) olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık, p<0.05

Salisilik Asitin MCF-10A hücre hattına uygulanması sonucunda ise Şekil 4-3 ve Tablo 4-6’da görüldüğü bütün evrelerde ve orta düşük dozdan (15 µg/ml) sonra bütün dozlarda istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki gözlemlenmiştir ($p<0,0001$).

Tablo 4-6: Salisilik asitin saatlere göre MCF-10A hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (doksuz) ile karşılaştırılması

Salisilik Asit Doz (µg/ml)	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
7	98,46 ± 9,62	0,9956	101,61 ± 7,55	0,9948	85,05 ± 6,55	0,0016
15	63,73 ± 10,23	< 0,0001	78,73 ± 10,01	< 0,0001	66,16 ± 5,02	< 0,0001
30	25,8 ± 4,78	< 0,0001	10,7 ± 4,93	< 0,0001	15,52 ± 5,98	< 0,0001
60	9,62 ± 6,42	< 0,0001	4,58 ± 1,27	< 0,0001	1,71 ± 1,32	< 0,0001
125	0 ± 0	< 0,0001	0,17 ± 0,33	< 0,0001	0 ± 0	< 0,0001
250	0 ± 0	< 0,0001	0 ± 0	< 0,0001	0 ± 0	< 0,0001

İstatistiksel analiz iki-yönlü Anova Testi ile yapılmıştır. Sonuçlar ortalama± Standart sapma (X±SD) olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık, $p<0,05$

4.1.4. 3’lü Kombin Dozun Uygulanması

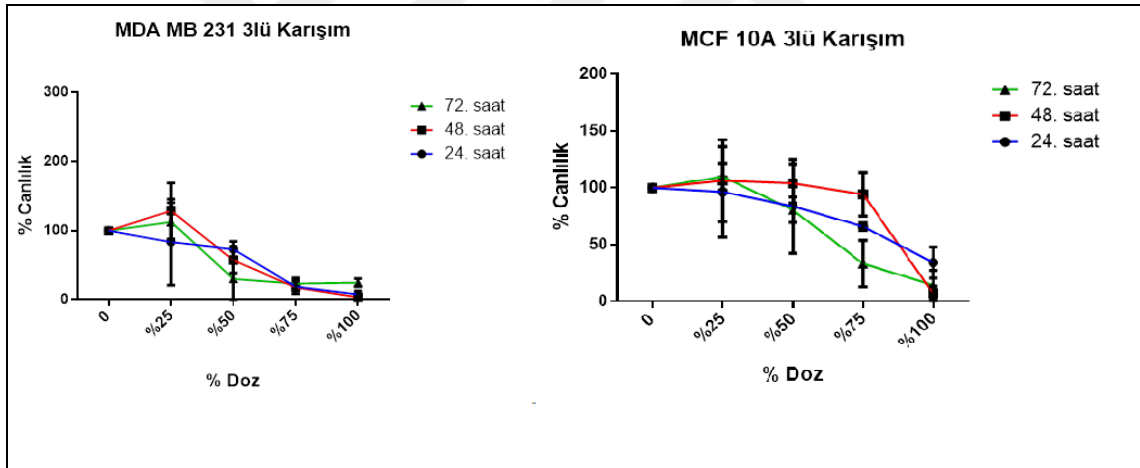
Çalışmamızda bireysel uygulamalarında hücre canlılığında önemli azalmaya neden olan karnosik asit, oleuropein ve salisilik asitin sitotoksik etkin dozlarında kombinasyonu ile bir üçlü karışımları oluşturulmuştur. Oluşturulan bu karışımın MDA-MB 231 (Şekil 4-4 ve Tablo 4-7) ve MCF10A (Şekil 4-4 ve Tablo 4-8) hücre hatlarındaki etkileri hücre canlılık testi ile değerlendirilen bulguları aşağıda verilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre MDA-MB-231 hücre hattına 3’lü karışımın %25’lik doz ve %50’lik doz uygulamalarında 24. saati dışında bütün saatler ve dozlarda anlamlı bir azalma gözlemlenirken, %75 ve sonrasında sitotoksik etki gözlemlenmiştir. P değerleri $p<0,05$)

Tablo 4-7: 3'lü karışım dozun saatlere göre MDA-MB-231 hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (doksuz) ile karşılaştırılması

Karışım Doz	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
25%	83,62 ± 62,32	0,7048	128,77 ± 40,52	0,2408	112,95 ± 27,47	0,8016
50%	73,36 ± 11,28	0,2408	57,75 ± 19,15	0,0255	30,74 ± 30,37	0,0002
75%	19,33 ± 10,43	< 0,0001	18,14 ± 8,97	< 0,0001	23,7 ± 8,72	< 0,0001
100%	7,87 ± 4,71	< 0,0001	3,7 ± 2,67	< 0,0001	25,2 ± 6,16	0,0002

İstatistiksel analiz iki-yönlü Anova Testi ile yapılmıştır. Sonuçlar ortalama± Standart sapma (X±SD) olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık, $p < 0.05$



Şekil 4-4: 3'lü karışımın MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hattına etkisi

MCF-10A hücre hattına 3'lü karışım uygulandığında %75 ve %100 dozlarda anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. %100 dozda anlamlı bir sitotoksik etki gözlemlenmiştir.

Tablo 4-8: 3'lü karışım dozun saatlere göre MCF-10A hücre hattındaki etkisinin kontrol hücreleri (doksuz) ile karşılaştırılması

Karışım Doz	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri	Ort.±SD	p değeri
25%	96,64 ± 39,98	0,9977	106,34 ± 36,15	0,9759	109,87 ± 11,93	0,8672
50%	83,85 ± 41,3	0,7131	104,04 ± 17,08	0,9972	80,8 ± 11,16	0,583
75%	66,11 ± 3,18	0,1346	94,43 ± 19,1	0,9849	33,39 ± 20,34	< 0,0001
100%	34,44 ± 13,68	< 0,0001	7,15 ± 6,59	< 0,0001	14,65 ± 12,71	< 0,0001

İstatistiksel analiz iki-yönlü Anova Testi ile yapılmıştır. Sonuçlar ortalama± Standart sapma (X±SD) olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık, p<0.05

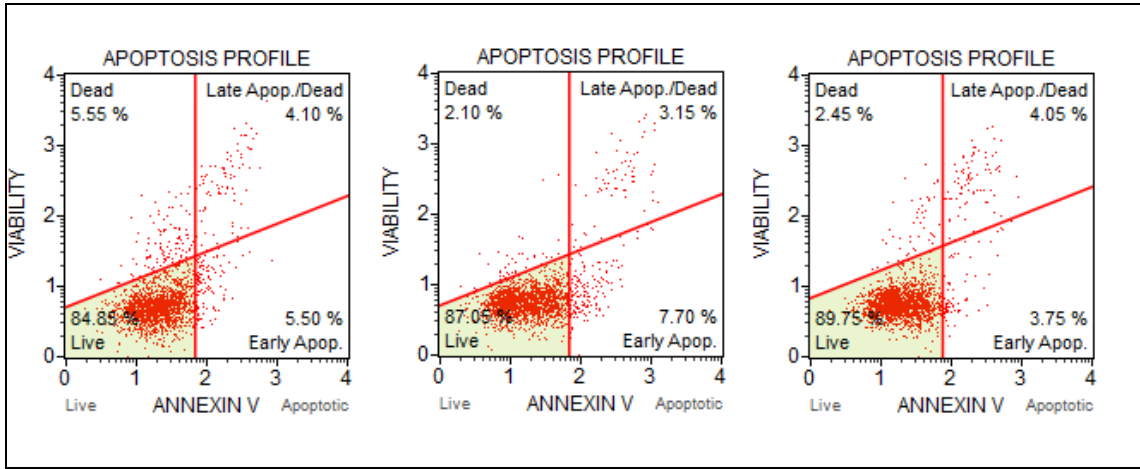
Yapılan tekli uygulamaların WST-1 deneyleri sonrasında IC50 değerleri tablo 4-9'da verilmiştir.

Tablo 4-9: Tekli madde uygulamaları sonrasında belirlenen IC50 değerleri (µg/ml)

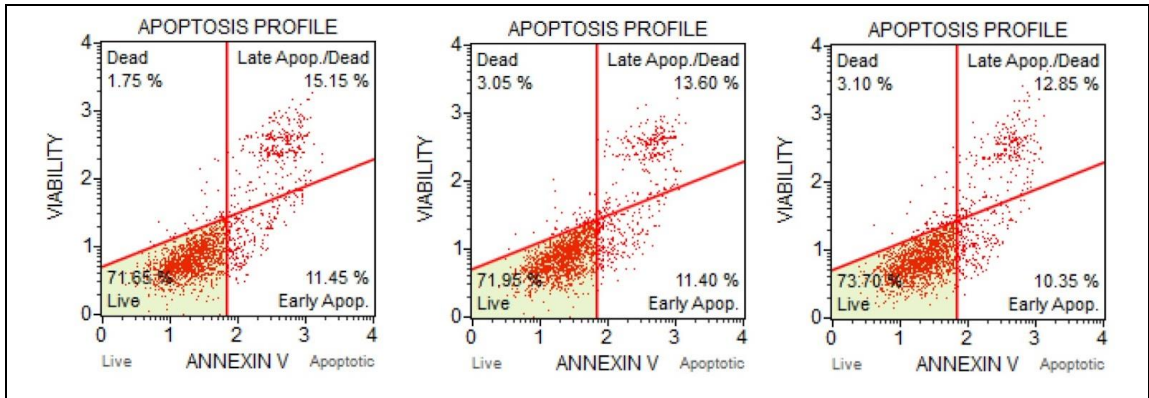
		MDA-MB-231	MCF10A
Karnosik asitten zengin bitki özütü uygulaması IC50 Değeri	24. Saat	19,54	13
	48. Saat	9,206	7,45
	72. Saat	11,89	14,96
Oleorupeinden zengin bitki özütü uygulaması IC50 Değeri	24. Saat	17,82	16,43
	48. Saat	16,31	14,88
	72. Saat	18,78	15,66
Salisilik Asit uygulaması IC50 değeri	24. Saat	13,07	19,65
	48. Saat	11,88	19,58
	72. Saat	13,07	18

4.2. Annexin V analizi bulguları

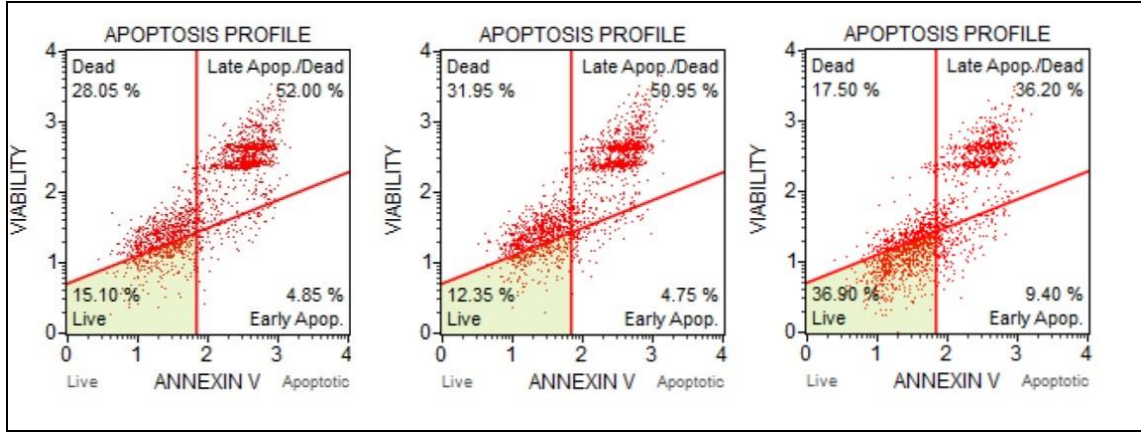
WST-1 analizi ile etkisi belirlenen 3'lü karışımın MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde daha etkin sitotoksik etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Annexin V boyaları kullanılarak bu sitotoksik etkisini apoptotik ve nekrotik yollaklardan hangisi üzerinden gösterdiği belirlenmek istenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında kontrol (doz verilmemiş) ile %50 ve %75 3'lü karışım dozu uygulanmış hücreler 48. Saatte incelenmiştir. Şekil 4-5, 4-6, 4-7 ve 4-8'de verilen sonuçlara göre sitotoksik etkinin apoptoz kaynaklı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,002$).



Şekil 4-5:MDA-MB-231 hücre hattında kontrol (doz verilmemiş) 3'lü karışım uygulanması apoptoz analizi sonuçları dot plot görüntüleri



Şekil 4-6: MDA-MB-231 hücre hattında %50 3'lü karışım uygulanması apoptoz analizi sonuçları dot plot görüntüleri

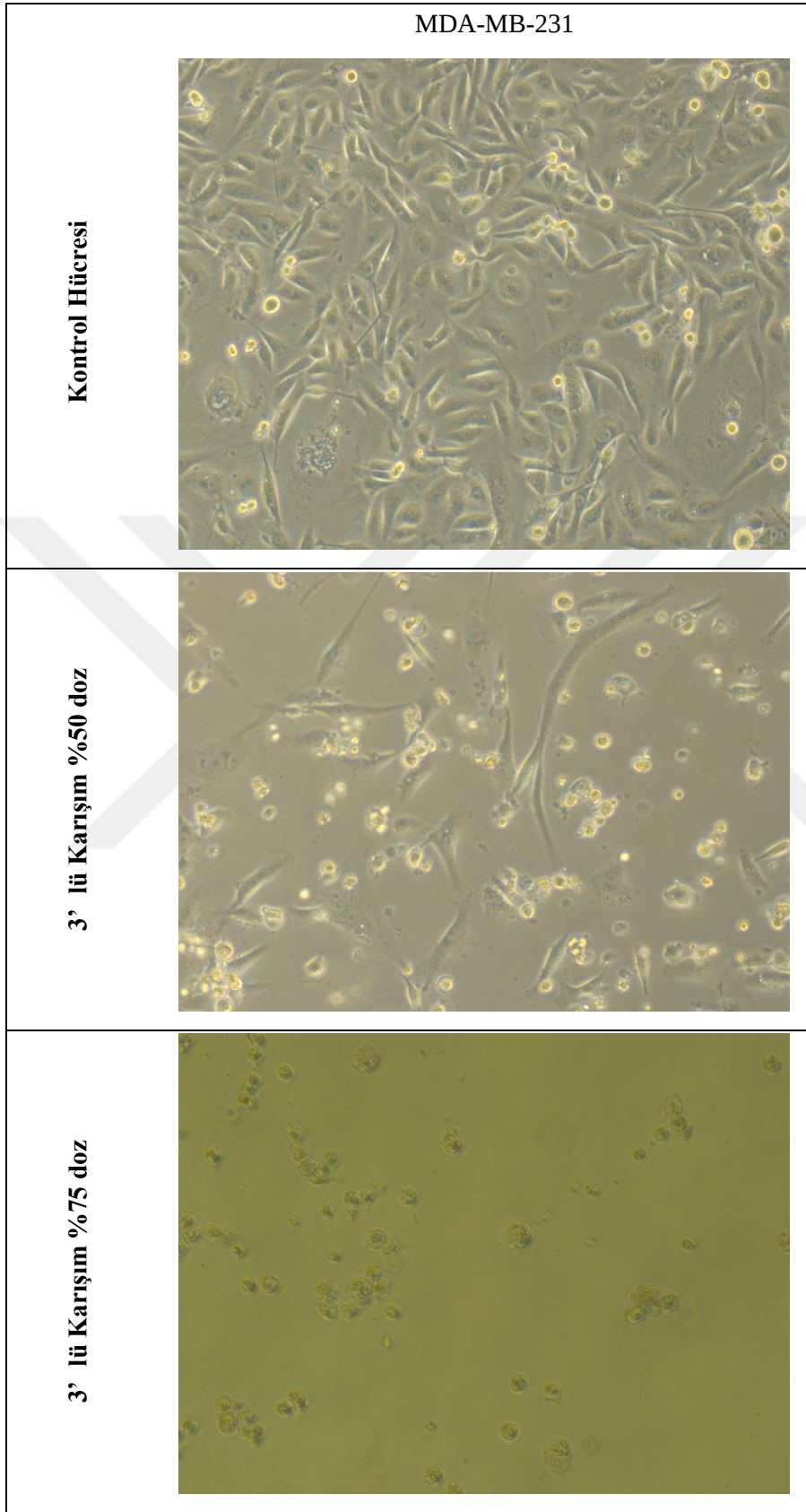


Şekil 4-7: MDA-MB-231 hücre hattında %75 3'lü karışım uygulanması apoptoz analizi sonuçları dot plot görüntüleri

Tablo 4-10: 3'lü karışım uygulanmış MDA-MD-231 hücrelerinin Annexin V analizi sonucunda belirlenen Ortalama ve p değerleri

MDA-MB-231	Ort. $\pm$ SD	Ort. $\pm$ SD	p değeri	Ort. $\pm$ SD	p değeri
	Kontrol (Dozsuz)	50 3'lü Karışım (%)	Kontrol vs. %50 3'lü Karışım	75 3'lü Karışım (%)	Kontrol vs. %75 3'lü Karışım
Canlı (%)	87,22 $\pm$ 2,45	72,43 $\pm$ 1,11	0,0023	21,45 $\pm$ 13,45	< 0,0001
Erken Apoptoz (%)	5,65 $\pm$ 1,98	11,07 $\pm$ 0,62	0,3301	6,33 $\pm$ 2,66	0,9801
Geç Apoptoz (%)	3,77 $\pm$ 0,53	13,87 $\pm$ 1,17	0,0377	46,38 $\pm$ 8,83	< 0,0001
Nekrotik (%)	3,37 $\pm$ 1,9	2,63 $\pm$ 0,77	0,9771	25,83 $\pm$ 7,48	< 0,0001
Total Apoptoz (%)	9,42 $\pm$ 1,53	24,93 $\pm$ 1,7	0,0014	52,72 $\pm$ 6,19	< 0,0001

İstatistiksel analiz iki-yönlü Anova Testi ile yapılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ Standart sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir. istatistiksel anlamlılık, $p < 0.05$



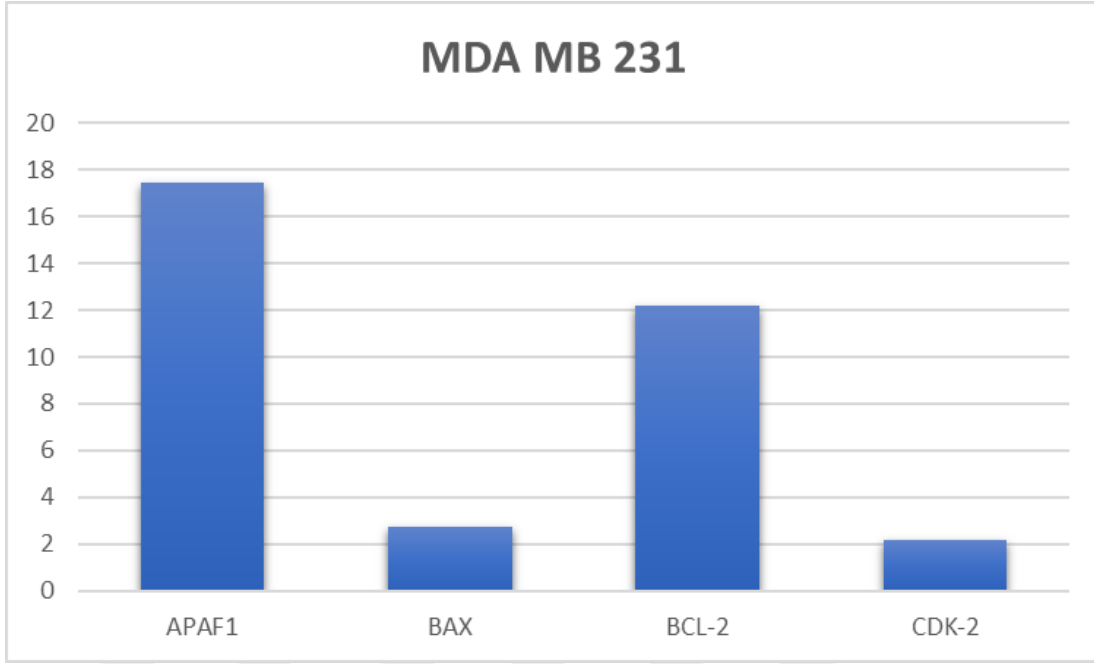
Şekil 4-8: 3'lü karışım uygulanmış MDA-MD-231 hücrelerinin morfolojik farklılıkları

4.3. PCR Bulguları

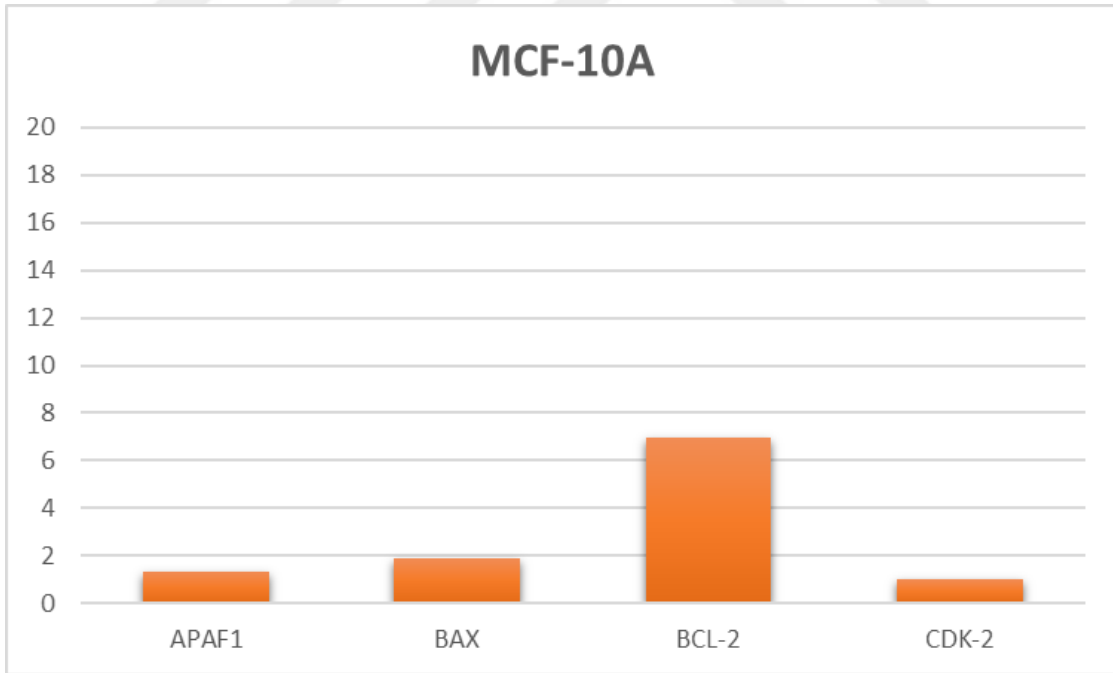
MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında dozsuz ve %50 dozda 3'lü karışımın 48. saatteki BAX, BCL-2 APAF-1 ve CDK-2'nin ekspresyon analizleri RT PCr ile yapılmış ve incelenmiştir. Ekspresyonel değişimler B2M endojen kontrolüne göre hesaplanmıştır. Değişim kat sayısı üzerinden belirtilmiş olup MDA-MB-231 hücre hattı için bütün bakılan değerlerde ekspresyon artışı gözlemlenmiştir (Tablo 4-11 ve Şekil 4-9). (1,5 üzeri anlamlı kabul edilmiştir.) MCF-10A hücre hattında ise BCL-2 ve BAX'da artış belirlenmiştir (Tablo 4-11 ve Şekil 4-10).

Tablo 4-11: MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 3'lü karışım uygulanan dozlu ve uygulanmayan (dozsuz) hücrelerdeki APAF-1, BAX, BCL-2 ve CDK-2 ekspresyon kat değişimi

Parametre	Kat değişimi (fold change)	
	MDA-MB-231	MCF-10A
APAF1	17,47	1,31
BAX	2,71	1,90
BCL-2	12,18	6,96
CDK-2	2,15	1,02



Şekil 4-9: MDA-MB-231 hücre hatlarında 3'lü karışım uygulanan dozlu ve uygulanmayan (dozsuz) hücrelerdeki APAF-1, BAX, BCL-2 ve CDK-2 ekspresyon kat sayı değişimi



Şekil 4-10: MCF-10A hücre hatlarında 3'lü karışım uygulanan dozlu ve uygulanmayan (dozsuz) hücrelerdeki APAF-1, BAX, BCL-2 ve CDK-2 ekspresyon kat sayı değişimi

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda Karnosik Asit ve Oleuropeinden Zengin Bitki Özütları ve Salisilik asit bireysel ve kombine olarak değışen doz/zaman aralıklarında MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarına uygulanmış ve kontrol hücrelere oranla özellikle düşük/orta dozlardan başlayarak sitotoksik etki gözlenmiştir ($p<0.0001$). 3'lü karışım MDA-MB-231 hücre hattında düşük dozlarda sitotoksik etki göstermiştir. Karışımın seçilmiş apoptoz ve hücre döngüsü belirteçlerinin ekspresyon düzeylerine etkisini belirlemek amacıyla IC50 dozunda (%50) madde karışımı uygulanmış ve uygulanmamış iki hücre hattında BAX, BCL-2, APAF-1 ve CDK2 için Real-time PCR ile ekspresyon analizi yapılmış ve kat değışimleri analiz edilmiştir (Tablo 5-1). MDA-MB-231 hücrelerinde 3'lü karışımın %50 ve %75 doz oranları uygulanarak yapılan Annexin V analizi hücre ölümünün apoptoz kaynaklı olduğunu göstermiştir ($p<0,005$).

Bitkiler fizyolojik süreçlerinde gerekli olan hücresel fonksiyonlarını devam ettirmek için çok sayıda ikincil metabolit üretirler. Son çalışmalar ile özellikle stres ve savunma tepkileri sebebi ile oluşan sinyallerin bu ikincil metabolitlerin üretimlerini etkilediğini gösteren kanıtlar artmaktadır. Bir bitki tarafından üretilen ikincil moleküllerin tipi ve konsantrasyonları, türleri, genotipi, fizyolojisi, gelişim aşaması ve büyüme sırasındaki çevresel faktörler tarafından belirlendiğı belirtilmektedir (Isah 2019). Bu metabolitlerle ilişkili nörodejeneratif hastalıklar , (Pohl ve Kong Thoo Lin 2018) inflamatuvar durumlar, (Serafini,ve ark 2010) çeşitli kanserler (Seca ve Pinto 2018) başta olmak üzere pek çok alanda çalışmalar yapılmış ve pek çok hastalık için potansiyel tedavi edici, semptom giderici etkilerine işaret eden sonuçlar elde edilmiştir (Dandawateve ark. 2016; Sharma,ve ark. 2017; Pivari ve ark.2019).

İkincil bitki metabolitleri farklı kanser tiplerinin tedavisi için doğal biyoaktif bileşikler olarak kullanılmaktadır. Çeşitli kimyasal yapıları sahip bu metabolitler, potansiyel çok hedefli antikanser ajanları olarak işlev görürler. Geleneksel ve alternatif tıbbi bitkiler, bu içerikleriyle yeni antikanser öncül yapıları ve öncül bileşikleri geliştirme imkânı sunmakta ve yeni antikanser ajanların keşfi için umut vermektedirler. Bu kapsamda fenolik bileşikler, terpenoidler, alkaloidler ve kükürt içeren bileşiklerle yapılan çalışmalar bu bileşikler sahip oldukları antikanser aktiviteleri olduğunu belirtmiştir (Fakhri ve ark. 2020). İkincil metabolit çeşitlerinden olan karnosik asit ilk

olarak adaçayında Linde tarafından keşfedilmiştir (Linde, 1964). Daha sonra Wenkert ve ark. biberiye yapraklarında çok daha yüksek seviyelerde karnosik asit saptamışlardır (Wenkert ve ark., 1965; Birtić ve ark 2014). Caco-2, HT29 ve LoVo hücre hatlarında Karnosik asitin apoptoz indüklediği, hücre göçü ve proteolitik enzim aktivitelerini azalttığı (Barni ve ark. 2012), başka bir çalışmada CaCo-2 (Colorectal adenocarcinoma) hücrelerinde H₂O₂ ilişkili oksidatif kaynaklı DNA hasarını ve görünür ışık kaynaklı oksidatif hasarı azaltarak, uzun ve kısa süreli antioksidan etkisi ile hücre kolonileşmesini azalttığı belirtilmiştir (Slamenov ve ark. 2002). SW480 (Colorectal adenocarcinoma) hücre hattında ise hücre bölünmesini azalttığı (Yi ve Wetzstein 2011), SW480 ve HT29 hücre hatlarının ikisi ile yapılan çalışmada hücre çoğalmasının SW480 hücre hattında HT29 hücre hattına oranla daha fazla azalttığı ve hücre döngüsünü durduğu belirlenmiştir (Valdés ve ark. 2013). SW620 ve DLD-1 kolorektal adenokarsinom hücre hatlarında yapılan çalışmada 5-fluorouracil (5-FU) ile birlikte kullanılan biberiye ekstraktının bu ajan ile sinerjik etki gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada ikisi birlikte PARP kesilmesini artırdığı, hücre çoğalmasını azalttığı, ayrıca apoptozu artırırken transformasyonu azalttığı bildirilmiştir (González-Vallinas ve ark. 2013). Yine aynı grubun aynı hücre hatları ile yapılan farklı bir çalışmada PARP kesilmesini ve GCNT3 artışı ve miR-15b gen ekspresyonunu azaltarak hücre canlılığında azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (González-Vallinas ve ark. 2014).

Karnosik asit ile tedavi edilen insan kolon kanseri hücrelerinin canlılığında bir azalma gözlenmiş ve ROS üretimi, p53 ve Bax artışı ile Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 aktivasyonu, PARP kesilmesi ve STAT3 sinyal yolu inhibisyonu yoluyla apoptozun tetiklendiği belirtilmiştir. Ayrıca karnosik asidin adipozite ile ilişkili kolon kanseri oluşumunun hızını yavaşlatabileceği önerilmiştir (Ibáñez ve ark. 2012; Dilas ve ark. 2012). Dekstran sodyum sülfat ile indüklenen bir fare kolit modelinde ve azoksimetanın neden olduğu kolon kanseri modelinde karnosik asit kullananlar ile kullanılmayanlar karşılaştırıldığında, Karnosik asit kullananların kolon tümörlerinde sayısal bir azalma ve dolaşımdaki leptin, adiponektin, insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 konsantrasyonlarında azalma gözlenmiş, ayrıca kolondaki leptin ve insülin reseptörleri, fosforile Akt ve ERK, Bcl-xL ve siklinD1 proteinlerinin ekspresyonlarının azaldığı belirtilmiştir (Bahria ve ark. 2016). Karnosik asitin Pankreas kanseri hücre hatlarında Bax'ı arttırdığı (Petiwalave ark 2014), Prostat adenokarsinom hücre hattında Kaspaz 8 Kaspaz 9, Bcl-2, Bid, IAP, fosforile Akt ve NF-KB azalttığı ayrıca Kaspaz 3, Kaspaz 7,

PARP kesilmesi ve Bax'ı arttırdığı belirtilmiştir (Kar ve ark. 2012). Biberiye ekstraktının MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyen birkaç çalışmadan biri olan çalışmada Biberiye ekstraktının MDA-MB-231 hücre proliferasyonunu ve sağkalımını önemli ölçüde inhibe ettiği, PARP parçalanma seviyelerini arttığı ve kanser hücresi proliferasyonunu ve sağkalımını kontrol eden Toplam Akt ve MTOR seviyelerinin önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir. (Jaglanian ve Tsiani 2020). Birkaç farklı bölgeden alınan biberiye ekstraktlarının MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisinin incelenmesi için yapılan çalışmada biberiye ekstraktının NF-KB'nin lokalizasyonunu etkilediği ve MAPK yolağını bozduğu belirtilmiştir (Brindisi ve ark. 2020).

Karnosik asitin, TRAIL aracılı apoptozu arttırdığı ve bunu proteazom aktivitesini arttırarak translasyon sonrası seviyelerde C-FLIP ve Bcl-2 ekspresyonunun aşağı regülasyonu ile etkilediği ayrıca sitosolik Ca^{2+} seviyelerinin yukarı regülasyonu ile de ER stresini indüklediği ardından CHOP ve ATF4 ekspresyonunun uyarılması izlediği belirtilmiştir. CHOP ve ATF4 ile DR5, BIM ve PUMA ekspresyonunun yukarı regülasyonu, karnosik asit ve TRAIL kaynaklı apoptozda önemli roller oynadığı ve MDA-MB-231 hücre hattı olmak üzere birçok kanser hücresi hattında TRAIL aracılı apoptozu duyarlı hale getirdiği rapor edilmiştir (Jung ve ark. 2015). Bir başka çalışmada hem iki hem üç boyutlu hücre kültürü sistemleri ile denenen karnosik asit ve doksorubisinin karşılaştırılmasında her iki hücre kültürü çeşidi için MDA-MB-231 hücre hattında karnosik asitin sitotoksik etkisi gösterilmiştir (Yildiz-Ozturk ve ark. 2017).

Zeytin yaprağında yoğun olarak bulunan Oleuropein ise ikincil metabolitlerin alt tipi olan flavonoidler grubunda yer almaktadır. MDA-MB-231 ve OVCAR-3 hücre hatlarında yapılan zeytin yaprağı özütü uygulaması sonucu apoptozun arttığı ve bunun mitokondriyal aracılı intrinsik apoptotik yolu tetikleyerek gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Benot-Dominguez ve ark. 2021). Oleuropeinin MCF-7 ve MDA-MD-231 meme kanseri hücre hatlarında hücre döngüsü ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan genlerin (p21, p53 ve TNFRS10b'nin yukarı regülasyonu ile BCL-2 ve MCL1'in ise kontrol hücrelerine kıyasla aşağı regülasyonu) ve mikroRNA'ların ekspresyonunu etkileyerek apoptozu indüklediği ayrıca tümör büyümesini ve metastazını önlediği gösterilmiştir (Asgharzade, ve ark. 2020). Yine aynı hücre hatlarında apoptozu NFKB

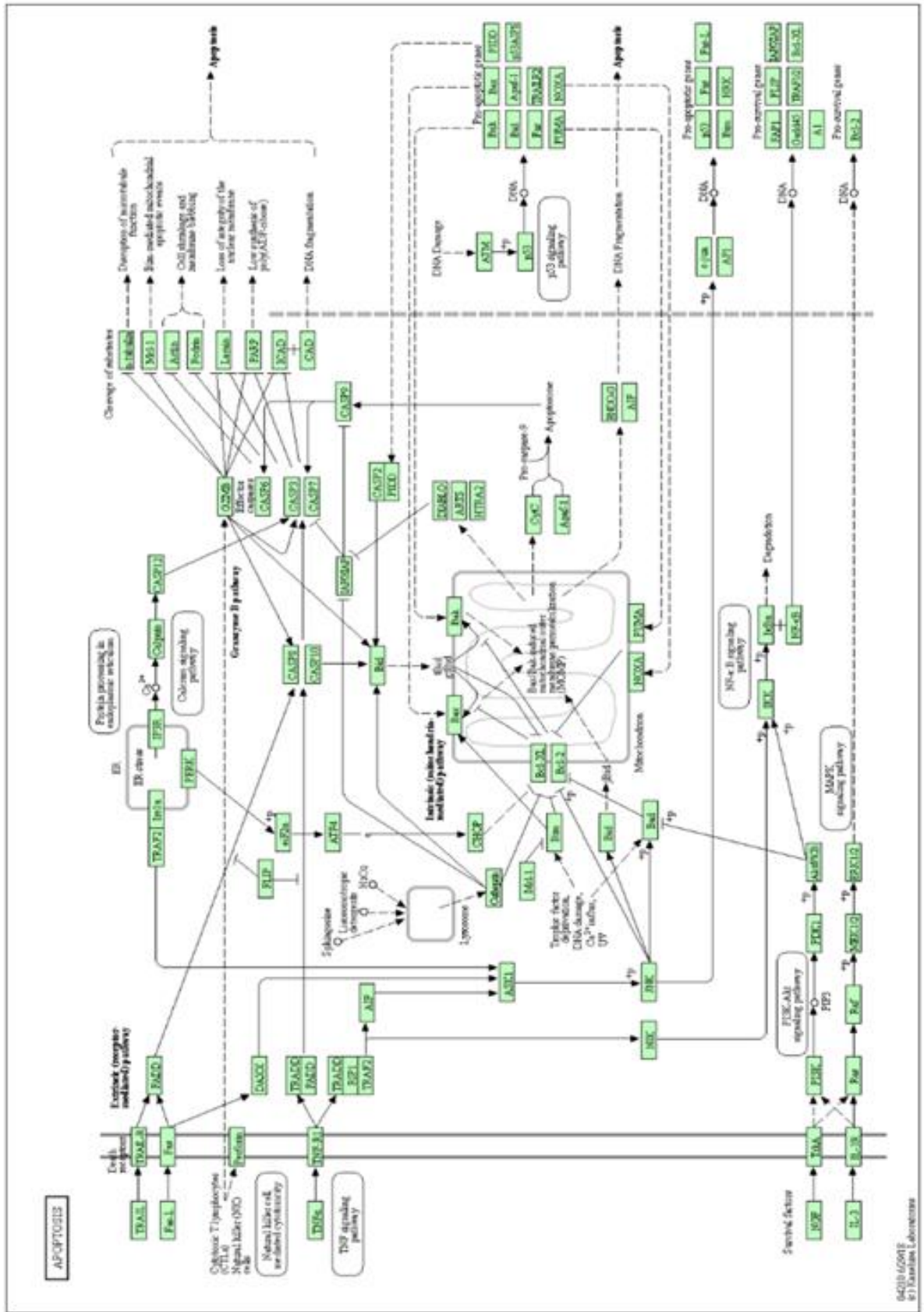
yolağı üzerinden tetiklediğı belirtilmiştir (Liu ve ark. 2018). Mazzei ve ark.nın çalışmasında Oleuropein'in tamoksifen dirençli MCF-7 ve MDA-MB-231 üçlü negatif hücre hatlarına uygulandığında G0/G1 hücre durmasını indüklediğı, CDK inhibitörü olan P21CIP/WAF1, p27, p53 ekspresyonunu hem mRNA hem de protein seviyelerinde azalttığı, siklin D/E ekspresyonunu arttırdığı ayrıca PARP, Kaspaz 3/8, Bax-BAD/BCL-2-BCL-XL oranlarının artışı ile apoptozda artış gözlemlendiğı rapor edilmiştir (Mazzei, ve ark. 2020). Oleuropeinle muamele edilen SKBR3 ve MCF7 hücrelerinde hücre canlılığının azaldığı ve apoptozun arttığı gözlenmiş ve Her2 aşırı ekspresyonu olan SKBR3 hücrelerinin Her2 negatif MCF-7 hücrelerine kıyasla 5 kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Aynı grubun çalışmalarında oleuropein ile birlikte kullanılan Transtuzumab'ın etkinliğinin 50 kat daha arttırdığı belirlenmiştir. (Menendez ve ark. 2007;2008). SKBR3 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde oleuropeinin FASN seviyelerini bastırdığı (Menendez ve ark. 2008), MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığının azalttığı, hücre çoğalmasının engellediğı, apoptozu indüklediğı ve G0/G1 fazındaki hücre sayısını arttırdığı belirtilmiştir (Han ve ark. 2009). Oleuropeinin ER negatif MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde (S fazı) ile ilişkili bir etkiyle hücre döngüsünü durdurarak hücre çoğalmasını önemli ölçüde inhibe ettiğı, p21'in yukarı regülasyonuna neden olduğu ve aynı zamanda aktif kaspase-3 formu ile Bax, Bcl-2 ve survivin proteinlerinin seviyelerini arttırdığı belirtilmiştir (Elamin ve ark. 2013). Benzer bir çalışmada ise MCF-7 hücrelerinde oleuropeinin p53 ve Bax'ı arttırarak ve Bcl-2 yi azaltarak apoptozu arttırdığı (Hassan ve ark. 2014), MDA-MB-231 hücrelerinde kanser hücrelerinin farklı dokulara metastazında rol oynayan MMPleri azaltırken, TIMPS arttırdığı önerilmiştir (Hassan ve ark. 2012). SKBR3 (ER negatif ve GPER pozitif) hücrelerinde Bax, PARP1, Kaspaz 3- 9, P21, P53 miktarının ve Erk 1/2 yollağının aktivasyonun arttığı ayrıca Bcl-2 ve Siklin D1in ise azaldığı tespit edilmiştir (Chimentove ark. 2014).

İnsan meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231'de aspirinin p53'ü asetilize ettiğı ve hedef genlerinin ekspresyonunu indüklediğini gösterilmiştir. (Alfonso ve ark. 2009) *Lactobacillus rhamnosus* GG ile kombine uygulandığında salisilik asitin insan kolon (HT-29) ve prostat (PC-3) kanser hücreleri üzerinde sitotoksik ve canlılık azaltıcı etkileri belirlenmiştir (Celebioglu 2021). Asprin kullanımının meme kanseri ile ilişkisini değerlendiren bir metaanalize göre meme kanseri riskinin %9 azaldığı gösterilmiştir (Cao ve Tan 2020).

Bir başka çalışmada ise salisilat ve aspirinin düz kas hücresi proliferasyonunun inhibisyonunu göstermektedir. Salisilat, RB fosforilasyonunu ve sikline bağımlı kinaz 2 aktivitesini ve ayrıca Siklin A seviyesini baskıladığı ve bununla birlikte, siklin bağımlı kinazlar, p21WAF1 ve P27KIP1'in yanı sıra p53 seviyelerini de arttırdığı belirtilmiştir. Ayrıca salisilatın düz kas hücrelerinde NF- κ B aktivasyonunu inhibe ettiği doğrulanmıştır (Marrave ark. 2000). İnsan kolon (HCT 116, HT-29, SW480); meme (MDA-MB-231, MCF7), deri (SK-MEL-28, SK-MEL-5); akciğer (NCI-H226); prostat (PC-3); over (OVCAR-3), ve fare deri melanoma (B16-F10) hücrelerinde Salisilik asitin ve aspirinin Siklin A2/CDK2 aşağı regülasyonu belirtilmiş ve çeşitli mRNAların seviyelerinde değişiklikler keşfedilmiştir. Bu sayede hücre döngüsü üzerine etkisi hakkında da bilgi edinilmiştir (Dachineni ve ark. 2016).

BCL-2 ailesinin proteinleri, içsel apoptoz yolunu kontrol eder. Pro-apoptotik BCL-2 proteinlerinden olan BAX, dış mitokondriyal membranı geçirgen hale getirir. Bu geçirgenlik sayesinde sitokrom c salınımı gerçekleşir. Bu salınım Apoptozom oluşumu için önemlidir (Edlich, 2018). BCL-2 ise antiapoptotik bir proteindir. Hücre ölümünü, mitokondri membranının geçirgenliğini kontrol ederek mitokondriden sitokrom c salınımını engeller ve ayrıca APAF-1'e bağlanarak kaspaz aktivitesini inhibe eder. BCL-2 BAD tarafından inhibe edilebilir. Eğer inhibe edilemez ise BAX ile etkileşime girerek BAX'ın mitokondri membranının geçirgenliğini arttırmasını engeller ki bu sitokrom salınımını engellemeye sebep olur (Bruey ve ark., 2007). Mitokondriden salınan sitokrom-C, APAF-1, kaspaz-9'a bağlanır ve böylece apoptozom oluşmuş olur. Apoptozom'un oluşması ise kaspaz kaskadını başlatır (Celepli ve ark. 2020). Apoptoz sinyal yolağı şekil 5-1'de belirtilmiştir.

Siklin / CDK kompleksleri, hücre döngüsünün farklı fazları sırasında oluşurlar. Bir dizi farklı hedef proteininin fosforilasyonunda yer alırlar. Siklinler esas olarak artış zamanına ve hücre döngüsünde işlevlerine dayanarak dört sınıfa ayrılabilir. Bu sınıflardan üçü G1 / S siklinleri, S siklinleri ve M siklinleri- hücre döngüsü olaylarının kontrolüne doğrudan katılırlar. Dördüncü sınıf olan G1 siklinleri, hücre dışı faktörlere yanıt olarak hücre döngüsü girişinin kontrolüne katkıda bulunur (Giacinti ve Giordano 2006). Siklin A/CDK2, siklin B/CDK2 ve siklin B/CDK1, G2/M geçişini düzenlenir. (Bornfeldt 2003; Lim ve Kaldis, 2013) CDK2, hücre döngüsünde S ve M fazlarına ilerlemesinde yer alır (Tadesse ve ark. 2018).



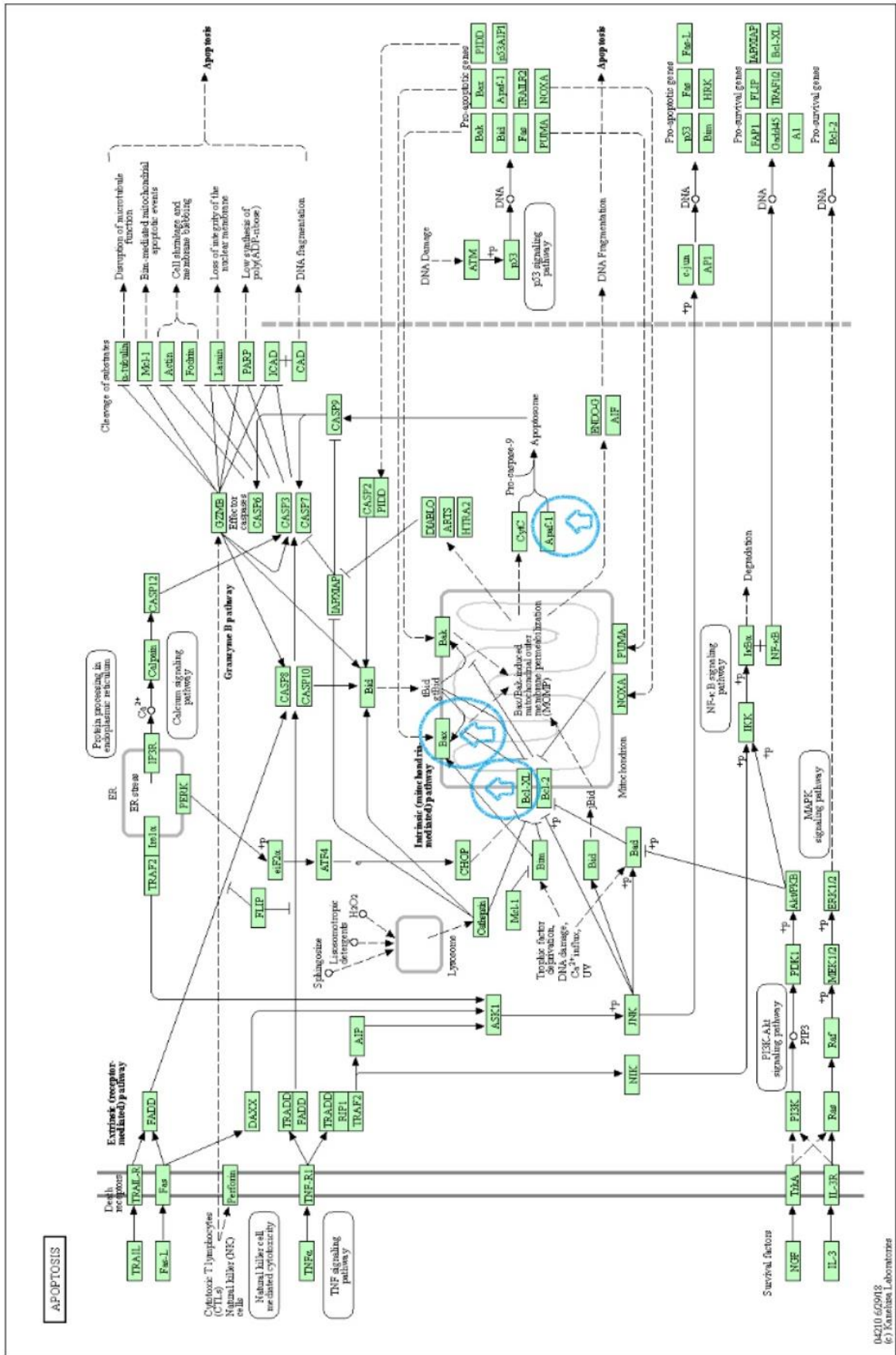
Şekil 5-1: Apoptoz Sinyal Yolağı

Yukarıda kapsamlı olarak açıkladığımız daha önce yapılan bu çalışmalar genel olarak tekli bitki özütü veya tekli madde uygulaması şeklindedir. Tez projesi kapsamında yaptığımız çalışmada öncelikle tekli olarak IC50 değerleri belirlenen özüt ve maddelerin bu değerleri baz alınarak bir kombin yapılmış olup bu kombinden %25, %50 %75 ve %100 dozlar uygulanmıştır. Uygulamamız sonucu MDA-MB-231 hücre hattı için %50 dozun üçlü karışım kombinin IC50 dozu olduğu belirlenmiş ve aynı doz uygulanan MCF10A ile doz uygulanmayan iki hücre hatları anti apoptotik BCL-2, BAX, hücre döngüsünü düzenleyen kinazlardan CDK2 ve apoptozu başlatan sitoplazmik protein olan APAF-1'in mRNA seviyeleri karşılaştırılmıştır. Ekspresyonel kat değişimi sonuçları tablo da verilmiştir. Bu karşılaştırma sonucu birçok çalışmanın aksine MDA-MB-231 hücre hattında kombin doz uygulanmış hücreler ile uygulanmamış hücreler karşılaştırıldığında BCL-2 ekspresyonunun 12 kat arttığı, CDK-2'nin 2 kat arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte öncesinde öngörülen 2,5 kat BAX artışı ve yüksek oranda (17 katın üzerinde) APAF-1 artışı gözlemlenmiştir (Tablo 5-1, Şekil 5-2).

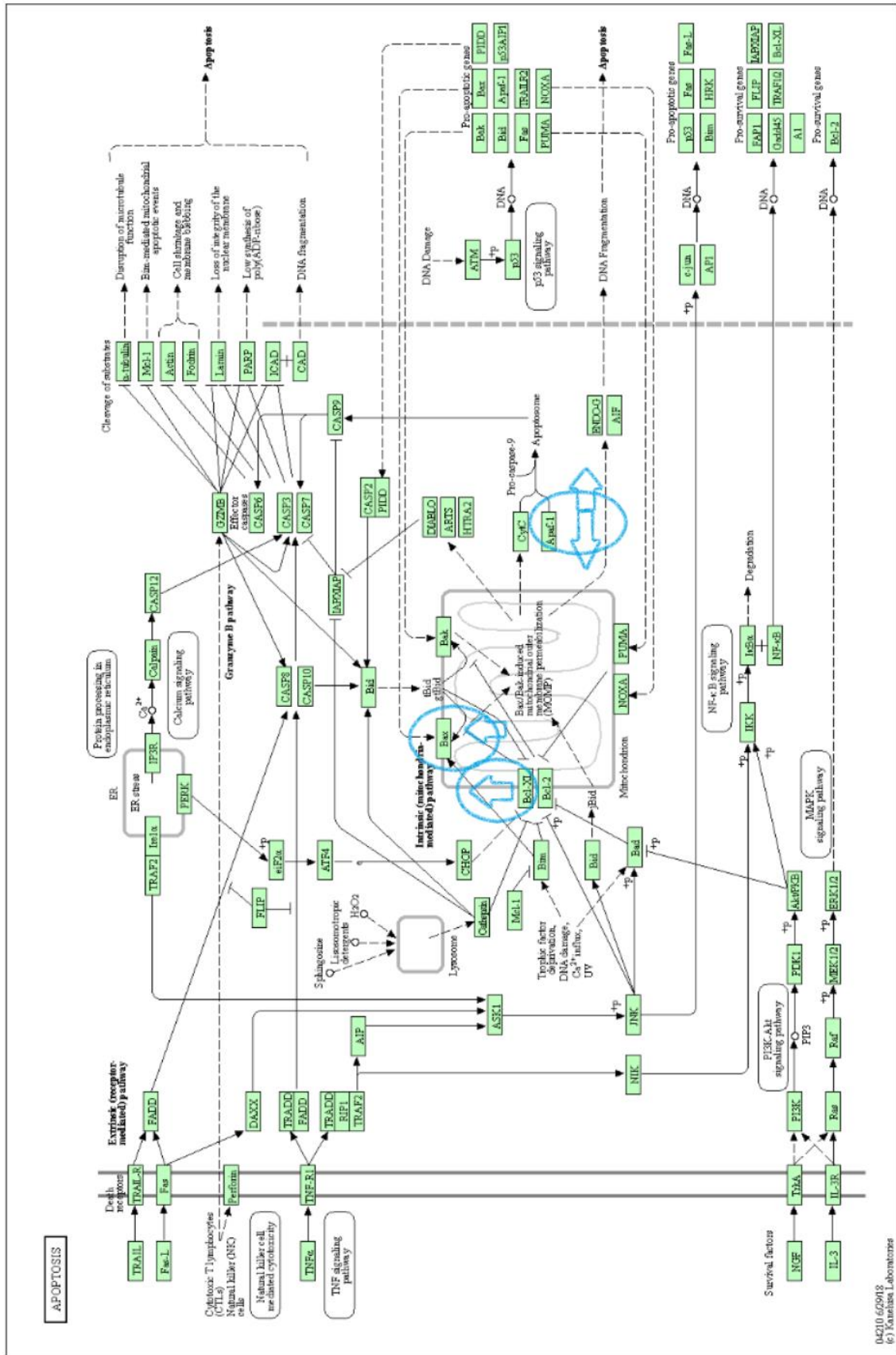
Tablo 5-1: 3'lü karışım uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında Ekspresyon kat değişim sonuçları

Parametre	Kat değişimi (fold change)	
	MDA-MB-231	MCF-10A
APAF1	17,47	1,31
BAX	2,71	1,90
BCL-2	12,18	6,96
CDK-2	2,15	1,02

MCF10A hücre hattına baktığımızda ise APAF-1 ve CDK2de değişiklik olmaz iken BCL-2 seviyesi 7 kat artmış ve BAX ise 1,9 kat artmıştır. Apoptoz yolağında oluşan artışlar Şekil 5-3'te belirtilmiştir. Bu mRNA seviyeleri ile birlikte apoptoz ve nekroz belirlemek için yapılmış olan apoptoz analizi sonuçları değerlendirildiğinde MDA-MB-231 hücre hattında kontrol hücrelere oranla canlı hücre sayısında azalma gözlenirken yüzde oranlarına bakıldığında ise toplam apoptoza uğrayan hücrelerin yüzdesi kontrol hücrelerine oranla anlamlı yüksek bulunmuştur. Gözlenen bu apoptoz artışı BCL-2 yüksekliği ile çelişmekte olup kanser hücrelerinin apoptozdan kaçış için yaptığı bir direnç mekanizması olarak düşünülebilir.



Şekil 5-2: MDA-MB-231 hücre hattında 3'lü karışımın apoptoz yolundaki etkileri



Şekil 5-3: MCF-10A hücre hattında 3'lü karışımın apoptoz yolağındaki etkileri

Benzer BCL-2 artış MCF10A da gözlemlenirken APAF-1 de hiçbir değişiklik olmaması yapılan hücre canlılığı analizi sonuçları ile de örtüşmektedir. Ancak BCL-2 kadar artmasa da MDA-MB-231 hücrelerinde BAX miktarının 2,7 kat yükselmesinin de mitokondri dış zar geçirgenliğinin sağlanması açısından önemli olduğu ve diğer proapoptotik BCL-2 protein ailesi üyelerinin de bu geçirgenliğin sağlanması için etkin olabileceği düşünülmüştür. Bir sonraki aşama olan Apoptozom oluşumu için görev alacak APAF1in yüksek seviyede artması hücrenin apoptozdan kaçışını engellemiş olabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca IC50 değerlerine bakıldığında aslında MCF10A hücre hattının MDA-MB-231 hücre hattına oranla karnosik asitten zengin bitki özütü ve oleorupinden zengin bitki özütü daha düşük dozda ulaşmasına rağmen Salisilik asitin etkin dozunun MCF10A da daha düşük olması ve belki de üçlü etki sebebi ile MCF10A hücre hattında %50 dozda sitotoksik etkinin çok az olduğu ve IC50 değerinin daha yüksek dozlarda olduğu üçlü karışım doz denemeleri sonucunda tespit edilmiştir.

Üçlü negatif MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı invazif, yüksek metastaz ve nüksetme potansiyeli olan kötü prognozlu bir kanser tipidir. Bu tümörler ER, PR ve HER2 ekspresyonundan yoksun olduğundan, endokrin tedavisine veya HER2 tedavisine duyarlı değildirler ve hala standartlaştırılmış etkin tedavileri mevcut değildir. Bu nedenle, bu agresif meme kanserinde etkili olabilecek yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi klinik açıdan çok önem taşımaktadır (Yin ve ark. 2020).

Sonuç olarak, üçlü negatif meme kanserini modelleyen agresif, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında bitki özleri ve salisilik asit kombinasyonunun sitotoksik etkiye- ki bu etkinin apoptotik olduğu gözlenmiştir- neden olduğuna işaret eden bulgularımız, hazırladığımız 3'lü kombinin tedavi etme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle 3'lü kombinin ve onun diğer özütlerle zenginleştirilmiş formunun hücre ölümünde etkin diğer yollardaki etkilerinin araştırıldığı gelecekteki çalışmalarımızın bu karışımın etkilerinin daha kapsamlı değerlendirilmesini sağlayacağı ve bu şekilde hem kemoterapötik hemde adjuvan olarak tedavi edici etkilerinden fayda sağlanabileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological research*, 50(1), 1-23.
- Acquaviva, R., Di Giacomo, C., Sorrenti, V., Galvano, F., Santangelo, R., Cardile, V. ve ark. (2012). Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *International journal of oncology*, 41(1), 31-38.
- Ahmad, A. (Ed.). (2019). Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi:10.1007/978-3-030-20301-6 p 55-56
- Ai, G., Dachineni, R., Kumar, D. R., Alfonso, L. F., Marimuthu, S. ve Bhat, G. J. (2016). Aspirin inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in HCT 116 cells through acetylation: Identification of aspirin-acetylated sites. *Molecular Medicine Reports*, 14(2), 1726-1732.
- Alfonso, L. F., Srivenugopal, K. S., Arumugam, T. V., Abbruscato, T. J., Weidanz, J. A. ve ark. (2009). Aspirin inhibits camptothecin-induced p21CIP1 levels and potentiates apoptosis in human breast cancer cells. *International journal of oncology*, 34(3), 597-608.
- Alfonso, L., Ai, G., Spitale, R. C., ve Bhat, G. J. (2014). Molecular targets of aspirin and cancer prevention. *British journal of cancer*, 111(1), 61-67.
- Asgharzade, S., Sheikhshabani, S. H., Ghasempour, E., Heidari, R., Rahmati, S., Mohammadi, M. ve ark. (2020). The effect of oleuropein on apoptotic pathway regulators in breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 886, 173509.
- Awtry, E. H., ve Loscalzo, J. (2000). Aspirin. *Circulation*, 101(10), 1206-1218.
- Bahri, S., Jameleddine, S., ve Shlyonsky, V. (2016). Relevance of carnosic acid to the treatment of several health disorders: Molecular targets and mechanisms. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 84, 569-582.
- Bahri, S., Jameleddine, S., ve Shlyonsky, V. (2016). Relevance of carnosic acid to the treatment of several health disorders: Molecular targets and mechanisms. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 84, 569-582.
- Baron, D. C., Marko, D. M., Tsiani, E., ve MacPherson, R. E. (2021). Rosemary extract increases neuronal cell glucose uptake and activates AMPK. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 46(2), 141-147

- Baran, Y. (Ed.). (2021). *Kanser Moleküler Biyolojisi*. Ankara: Hipokrat Yayıncılık.(2nd. ed.)
- Barni, M. V., Carlini, M. J., Cafferata, E. G., Puricelli, L. ve Moreno, S. (2012). Carnosic acid inhibits the proliferation and migration capacity of human colorectal cancer cells. *Oncology reports*, 27(4), 1041-1048.
- Barnum, K. J., ve O'Connell, M. J. (2014). Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Cell Cycle Control*, 29–40. doi:10.1007/978-1-4939-0888-2_2
- Baron, D. C., Marko, D. M., Tsiani, E., ve MacPherson, R. E. (2021). Rosemary extract increases neuronal cell glucose uptake and activates AMPK. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 46(2), 141-147.
- Begum A, Sandhya S, Syed Shaff ath A, Vinod KR, Swapna R, Banji D, 2013. An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae). *Acta scientiarum polonorum Technologia alimentaria.*, 12 (1): 61-74.
- Benot-Dominguez, R., Tupone, M. G., Castelli, V., d'Angelo, M., Benedetti, E., Quintiliani, M.ve ark. (2021). Olive leaf extract impairs mitochondria by pro-oxidant activity in MDA-MB-231 and OVCAR-3 cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 134, 111139.
- Bertoli, C., Skotheim, J. M.,ve de Bruin, R. A. M. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), 518–528.
- Birtić, S., Dussort, P., Pierre, F. X., Bily, A. C., ve Roller, M. (2015). Carnosic acid. *Phytochemistry*, 115, 9-19.
- Borjan, D., Leitgeb, M., Knez, Ž., ve Hrnčič, M. K. (2020). Microbiological and antioxidant activity of phenolic compounds in olive leaf extract. *Molecules*, 25(24), 5946.
- Bornfeldt, K. E. (2003). The cyclin-dependent kinase pathway moves forward. *Circulation research*, 92(4), 345-347.
- Bossio, S., Perri, A., Malivindi, R., Giordano, F., Rago, V., Mirabelli, M., ve ark. (2022). Oleuropein Counteracts Both the Proliferation and Migration of Intra-and Extragonadal Seminoma Cells. *Nutrients*, 14(11), 2323.
- Brindisi, M., Bouzidi, C., Frattaruolo, L., Loizzo, M. R., Tundis, R., Dugay, A. ve ark. (2020). Chemical profile, antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer effects of Italian *Salvia rosmarinus* Spenn. methanol leaves extracts. *Antioxidants*, 9(9), 826.

- The Brugge Lab; Media Recipes MCF10A Protokolü , Harvard Üniversitesi) <https://brugge.med.harvard.edu/system/files/protocols/MediaRecipesForMCF10ACells.pdf> Erişim:04.02.2022
- Cao, S., Zhu, X., ve Du, L. (2017). P38 MAP kinase is involved in oleuropein-induced apoptosis in A549 cells by a mitochondrial apoptotic cascade. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 1425-1435.
- Cao, Y.ve Tan, A. (2020). Aspirin might reduce the incidence of breast cancer: an updated meta-analysis of 38 observational studies. *Medicine*, 99(38).
- Cárdeno, A., Sánchez-Hidalgo, M., Rosillo, M. A., & de la Lastra, C. A. (2013). Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the proliferation of human colorectal cancer cell through downregulation of HIF-1 α . *Nutrition and cancer*, 65(1), 147-156.
- Carlberg, C. ve Valleuer, E. (2021) *Cancer Biology. How Science Work.* Springer Nature Switzerland AG, p-17
- Celebioglu, H. U. (2021). Effects of potential synbiotic interaction between *Lactobacillus rhamnosus* GG and salicylic acid on human colon and prostate cancer cells. *Archives of Microbiology*, 203(3), 1221-1229.
- Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P., ve Karagin, P. H. (2020). Apoptoz ve apoptotik yolların gözden geçirilmesi. Ankara: Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu.
- Chimento, A., Casaburi, I., Rosano, C., Avena, P., De Luca, A., Campana, C. ve ark.(2014). Oleuropein and hydroxytyrosol activate GPER/GPR 30-dependent pathways leading to apoptosis of ER-negative SKBR 3 breast cancer cells. *Molecular nutrition & food research*, 58(3), 478-489.
- Collier, J. G., ve Flower, R. J. (1971). Effect of aspirin on human seminal prostaglandins. *The Lancet*, 298(7729), 852-853.
- Dachineni, R., Ai, G., Kumar, D. R., Sadhu, S. S., Tummala, H., ve Bhat, G. J. (2016). Cyclin A2 and CDK2 as Novel Targets of Aspirin and Salicylic Acid: A Potential Role in Cancer Prevention Aspirin and Salicylic Acid Downregulate Cyclin A2/CDK2. *Molecular Cancer Research*, 14(3), 241-252.
- Dağdeviren, T. Programlı Hücre Ölümü; Apoptoz. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 13(3), 120-135.
- Dandawate, P. R., Subramaniam, D., Padhye, S. B. ve Anant, S. (2016). Bitter melon: a panacea for inflammation and cancer. *Chinese journal of natural medicines*, 14(2), 81-100.

- De Azambuja, E., Cardoso, F., de Castro, G., Colozza, M., Mano, M. S., Durbecq, V. ve ark. (2007). Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *British Journal of Cancer*, 96(10), 1504–1513. doi:10.1038/sj.bjc.6603756
- Dick, F. A., ve Rubin, S. M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(5), 297–306. doi:10.1038/nrm3567)
- Dilas, S., Knez, Ž., Četojević-Simin, D., Tumbas, V., Škerget, M., Čanadanović-Brunet, J. ve ark. (2012). In vitro antioxidant and antiproliferative activity of three rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract formulations. *International journal of food science & technology*, 47(10), 2052-2062.
- Ding, P., ve Ding, Y. (2020). Stories of salicylic acid: a plant defense hormone. *Trends in plant science*, 25(6), 549-565.
- Edlich, F. (2018). BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. *Biochemical and biophysical research communications*, 500(1), 26-34.
- Elamin, M. H., Daghestani, M. H., Omer, S. A., Elobeid, M. A., Virk, P. ve ark. (2013). Olive oil oleuropein has anti-breast cancer properties with higher efficiency on ER-negative cells. *Food and Chemical Toxicology*. 53, 310–316. Mar
- Eliyatkin, N., Yalcin, E., Zengel, B., Aktaş, S., ve Vardar, E. (2015). Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *Journal of Breast Health*, 11(2), 59–66.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Einbond, L. S., Wu, H. A., Kashiwazaki, R., He, K., Roller, M., Su, T ve diğerleri (2012). Carnosic acid inhibits the growth of ER-negative human breast cancer cells and synergizes with curcumin. *Fitoterapia*, 83(7), 1160-1168.
- Estrada-Muñiz, E., Guerrero-Palomo, G. ve Vega, L. (2006). Natural products: New anti-cancer agents derived from plants. *Toxicology*, 1.
- Fakhri, S., Moradi, S. Z., Farzaei, M. H. ve Bishayee, A. (2020, February). Modulation of dysregulated cancer metabolism by plant secondary metabolites: A mechanistic review. In *Seminars in cancer biology*. Academic Press.
- Fernández-Arroyo, S., Gómez-Martínez, A., Rocamora-Reverte, L., Quirantes-Piné, R., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Ferragut, J. A. (2012). Application of nanoLC-ESI-TOF-MS for the metabolomic analysis of phenolic compounds from

- extra-virgin olive oil in treated colon-cancer cells. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 63, 128-134.
- Fishbein, J. C., Heilman, J. M. (2016). *Advances in molecular toxicology*. Academic Press.
- Fragomeni, S. M., Sciallis, A., ve Jeruss, J. S. (2018). Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surgical Oncology Clinics*, 27(1), 95-120.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ve ark. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541.
- Gao, G., Bracken, A. P., Burkard, K., Pasini, D., Classon, M., Attwooll, C. ve ark. (2003). NPAT expression is regulated by E2F and is essential for cell cycle progression. *Molecular and cellular biology*, 23(8), 2821-2833.
- Gao, Q., Liu, H., Yao, Y., Geng, L., Zhang, X., Jiang, L.ve ark. (2015). Carnosic acid induces autophagic cell death through inhibition of the Akt/mTOR pathway in human hepatoma cells. *Journal of Applied Toxicology*, 35(5), 485-492.
- Giacinti, C., ve Giordano, A. (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene*, 25(38), 5220-5227.
- Goldsmith, C. D., Vuong, Q. V., Sadeqzadeh, E., Stathopoulos, C. E., Roach, P. D., ve Scarlett, C. J. (2015). Phytochemical properties and anti-proliferative activity of *Olea europaea* L. leaf extracts against pancreatic cancer cells. *Molecules*, 20(7), 12992-13004.
- Gonzalez-Vallinas, M., Molina, S., Vicente, G., de la Cueva, A., Vargas, T., Santoyo, S. ve ark. de Molina, A. R. (2013). Antitumor effect of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells. *Pharmacological research*, 72, 61-68.
- Gonzalez-Vallinas, M., Molina, S., Vicente, G., Zarza, V., Martin-Hernandez, R., Garcia-Risco, M. R. ve ark. (2014). Expression of microRNA-15b and the glycosyltransferase GCNT3 correlates with antitumor efficacy of Rosemary diterpenes in colon and pancreatic cancer. *PloS one*, 9(6), e98556.
- Guoqiang, A., Dachineni, R., Kumar, D. R., Alfonso, L. F., Marimuthu, S., & Bhat, G. J. (2016). Aspirin inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in HCT 116 cells through acetylation: Identification of aspirin-acetylated sites. *Molecular Medicine Reports*, 14(2), 1726-1732.

- Hajdu, S. I. (2011). A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*, 117(5), 1097-1102.
- Han, J., Talorete, T. P., Yamada, P., Isoda, H. (2009). Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*, 59(1), 45-53.
- Harashima, H., Dissmeyer, N., ve Schnittger, A. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in cell biology*, 23(7), 345-356.
- Hassan, Z. K., Elamin, M. H., Daghestani, M. H., Omer, S. A., Al-Olayan, E. M., Elobeid, M. A. ve ark.(2012). Oleuropein induces anti-metastatic effects in breast cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 13(9), 4555-4559.
- Hassan, Z. K., Elamin, M. H., Omer, S. A., Daghestani, M. H., Al-Olayan, E. S., Elobeid, M. A. ve ark. (2014). Oleuropein induces apoptosis via the p53 pathway in breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(11), 6739-6742.
- Hausman, H. (2019). What is Cancer?. *Perspectives in Biology and Medicine*, 62(4), 778-784.
- https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04210 erişim:11.08.2022
- Ibáñez, C., Simó, C., García-Cañas, V., Gómez-Martínez, Á., Ferragut, J. A. ve Cifuentes, A. (2012). CE/LC-MS multiplatform for broad metabolomic analysis of dietary polyphenols effect on colon cancer cells proliferation. *Electrophoresis*, 33(15), 2328-2336.
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological research*, 52.
- Jaglanian, A.,Tsiani, E. (2020). Rosemary extract inhibits proliferation, survival, Akt, and mTOR signaling in triple-negative breast cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 810.
- Jesinger, R. A. (2014). Breast anatomy for the interventionalist. *Techniques in vascular and interventional radiology*, 17(1), 3-9.
- Johnson, K. S., Conant, E. F., ve Soo, M. S. (2021). Molecular subtypes of breast cancer: a review for breast radiologists. *Journal of Breast Imaging*, 3(1), 12-24.
- Jung, K. J., Min, K. J., Bae, J. H., Kwon, T. K. (2015). Carnosic acid sensitized TRAIL-mediated apoptosis through down-regulation of c-FLIP and Bcl-2 expression at the post translational levels and CHOP-dependent up-regulation of DR5, Bim, and PUMA expression in human carcinoma caki cells. *Oncotarget*, 6(3), 1556.

- Kar, S., Palit, S., Ball, W. B. ve Das, P. K. (2012). Carnosic acid modulates Akt/IKK/NF- κ B signaling by PP2A and induces intrinsic and extrinsic pathway mediated apoptosis in human prostate carcinoma PC-3 cells. *Apoptosis*, 17(7), 735-747.
- Kerr, J. F. R. (1972). A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 20, 239-257.
- Khorsandi, K., Chamani, E., Hosseinzadeh, G. ve Hosseinzadeh, R. (2019). Comparative study of photodynamic activity of methylene blue in the presence of salicylic acid and curcumin phenolic compounds on human breast cancer. *Lasers in Medical Science*, 34(2), 239-246.
- Kim, D. H., Park, K. W., Chae, I. G., Kundu, J., Kim, E. H., Kundu, J. K., ve ark. (2016). Carnosic acid inhibits STAT3 signaling and induces apoptosis through generation of ROS in human colon cancer HCT116 cells. *Molecular Carcinogenesis*, 55(6), 1096-1110.
- Kontogianni, V. G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A. A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S. ve ark. (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food chemistry*, 136(1), 120-129.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Urban, M. O., Prášil, I. T. ve Renaut, J. (2018). Plant abiotic stress proteomics: the major factors determining alterations in cellular proteome. *Frontiers in plant science*, 9, 122.
- Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y. ve ark. (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384(6610), 644-648.
- Lim, S., ve Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 140(15), 3079-3093.
- Liman, R., Çoban, F., Ciğerci, I., Bulduk, İ., ve Bozkurt, S. (2017). Antiangiogenic and apoptotic effects of oleuropein on breast cancer cells. *Br. J. Pharm. Res*, 16, 1-10.
- Linde, H. (1964). Ein neues Diterpen aus *Salvia officinalis* L. und eine Notiz zur Konstitution von Pikrosalvin. *Helvetica Chimica Acta*, 47(5), 1234-1239.
- Liu, L., Ahn, K. S., Shanmugam, M. K., Wang, H., Shen, H., Arfuso, F., ve ark. (2019). Oleuropein induces apoptosis via abrogating NF- κ B activation cascade in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*, 120(3), 4504-4513.

- Liu, M., Wang, J., Huang, B., Chen, A., ve Li, X. (2016). Oleuropein inhibits the proliferation and invasion of glioma cells via suppression of the AKT signaling pathway. *Oncology reports*, 36(4), 2009-2016.
- Locksley, R. M., Killeen, N., ve Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487-501.
- Maria-Simona, C. H. I. Ș., Muste, S., Păucean, A., Man, S., Mureșan, V., ve Călian, I. D. (2017). A comprehensive review about anticancer and antimicrobial activities of rosemary oil (*Rosmarinus officinalis* L). *Hop and Medicinal Plants*, 25(1-2).
- Marra, D. E., Simoncini, T., ve Liao, J. K. (2000). Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by sodium salicylate mediated by upregulation of p21Waf1 and p27Kip1. *Circulation*, 102(17), 2124-2130.
- Martinon, F., Agostini, L., Meylan, E., ve Tschopp, J. (2004). Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Current Biology*, 14(21), 1929-1934.
- Mazzei, R., Piacentini, E., Nardi, M., Poerio, T., Bazzarelli, F., Procopio, A. ve ark.(2020). Production of plant-derived oleuropein aglycone by a combined membrane process and evaluation of its breast anticancer properties. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 908.
- Meggie, C. C., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., ... & Nielsen, T. O. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 101(10), 736-750.
- Menendez, J. A., Vazquez-Martin, A., Colomer, R., Brunet, J., Carrasco-Pancorbo, A., Garcia-Villalba, R. ve ark. A. (2007). Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC cancer*, 7(1), 1-19.
- Menendez, J. A., Vazquez-Martin, A., Garcia-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferraros, C., Fernandez-Gutierrez, A. ve ark. (2008). Anti-HER2 (erbB-2) oncogene effects of phenolic compounds directly isolated from commercial Extra-Virgin Olive Oil (EVOO). *Bmc Cancer*, 8(1), 1-23.
- Menendez, J. A., Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C., Garcia-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Fernandez-Gutierrez, A. ve ark. (2008). Analyzing effects of extra-virgin olive oil polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reverse-phase protein microarrays. *International journal of molecular medicine*, 22(4), 433-439.

- Mens, M. M., ve Ghanbari, M. (2018). Cell cycle regulation of stem cells by microRNAs. *Stem Cell Reviews and Reports*, 14(3), 309-322.
- Mitchell, J. A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R. J., ve Vane, J. R. (1993). Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24), 11693-11697.
- Moore, J., Yousef, M., ve Tsiani, E. (2016). Anticancer effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and rosemary extract polyphenols. *Nutrients*, 8(11), 731.
- Nediani, C., Ruzzolini, J., Romani, A., ve Calorini, L. (2019). Oleuropein, a bioactive compound from *Olea europaea* L., as a potential preventive and therapeutic agent in non-communicable diseases. *Antioxidants*, 8(12), 578.
- Norbury, C. J., ve Hickson, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 41(1), 367-401.
- Nounu, A., Richmond, R. C., Stewart, I. D., Surendran, P., Wareham, N. J., Butterworth, A. ve ark. (2021). Salicylic acid and risk of colorectal cancer: A two-sample mendelian randomization study. *Nutrients*, 13(11), 4164.
- Obied, H. K., Prenzler, P. D., Omar, S. H., Ismael, R., Servili, M., Esposto, S. Ve ark. (2012). Pharmacology of olive biophenols. In *Advances in molecular toxicology* (Vol. 6, pp. 195-242). Elsevier.
- Ortona, E., Margutti, P., Matarrese, P., Franconi, F., Malorni, W. (2008). Redox state, cell death and autoimmune diseases: a gender perspective. *Autoimmunity Reviews*, 7(7), 579-584.
- "Oxford Üniversitesi (2019). Number of Death by Cause, World, 2019: Erişim 30.05.2022, <https://ourworldindata.org/grapher/annual-number-of-deaths-by-cause>"
- Özören, N., ve El-Deiry, W. S. (2003, April). Cell surface death receptor signaling in normal and cancer cells. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 13, No. 2, pp. 135-147).
- Petiwalla, S. M., Berhe, S., Li, G., Puthenveetil, A. G., Rahman, O., Nonn, L. ve ark. (2014). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract modulates CHOP/GADD153 to promote androgen receptor degradation and decreases xenograft tumor growth. *PloS one*, 9(3), e89772.
- Pivari, F., Mingione, A., Brasacchio, C., & Soldati, L. (2019). Curcumin and type 2 diabetes mellitus: prevention and treatment. *Nutrients*, 11(8), 1837.

- Pohl, F. ve Kong Thoo Lin, P. (2018). The potential use of plant natural products and plant extracts with antioxidant properties for the prevention/treatment of neurodegenerative diseases: in vitro, in vivo and clinical trials. *Molecules*, 23(12), 3283.
- Poon, R. Y. (2016). Cell cycle control: a system of interlinking oscillators. *Cell Cycle Oscillators*, 3-19.
- Pubchem; National Library of Medicine. Salisilik Asit. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/338>) erişim:10.04.2022
- Provenzano, E., Ulaner, G. A., ve Chin, S. F. (2018). Molecular classification of breast cancer. *PET clinics*, 13(3), 325-338.
- Ruzzolini, J., Peppicelli, S., Bianchini, F., Andreucci, E., Urciuoli, S., Romani, A. ve ark. (2020). Cancer glycolytic dependence as a new target of olive leaf extract. *Cancers*, 12(2), 317.
- Salvesen, G. S., ve Riedl, S. J. (2008). Caspase mechanisms. Programmed cell death in cancer progression and therapy, 13-23.
- Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., ve Longacre, M. (2013). Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. *International journal of molecular sciences*, 14(10), 21087-21113.
- Seca, A., ve Pinto, D. (2018). Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 263. doi:10.3390/ijms19010263)
- Sepporta, M. V., Fuccelli, R., Rosignoli, P., Ricci, G., Servili, M., Morozzi, G., ve Fabiani, R. (2014). Oleuropein inhibits tumour growth and metastases dissemination in ovariectomised nude mice with MCF-7 human breast tumour xenografts. *Journal of functional foods*, 8, 269-273.
- Serafini, M., Peluso, I., ve Raguzzini, A. (2010). Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), 273-278.
- Shamshoum, H., Vlatcheski, F., ve Tsiani, E. (2017). Anticancer effects of oleuropein. *Biofactors*, 43(4), 517-528.
- Sharma, P., McClees, S., & Afaq, F. (2017). Pomegranate for Prevention and Treatment of Cancer: An Update. *Molecules*, 22(1), 177
- Sherif, I. O., ve Al-Gayyar, M. M. (2018). Oleuropein potentiates anti-tumor activity of cisplatin against HepG2 through affecting proNGF/NGF balance. *Life sciences*, 198, 87-93.

- Sirianni, R., Chimento, A., De Luca, A., Casaburi, I., Rizza, P., Onofrio, A. ve ark. (2010). Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Molecular nutrition & food research*, 54(6), 833-840.
- Slameňová, D., Kubošková, K., Horváthová, E. ve Robichová, S. (2002). Rosemary-stimulated reduction of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in mammalian cells treated with H₂O₂ or visible light-excited Methylene Blue. *Cancer letters*, 177(2), 145-153.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. ve ark. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Tadesse, S., Caldon, E. C., Tilley, W., ve Wang, S. (2018). Cyclin-dependent kinase 2 inhibitors in cancer therapy: an update. *Journal of medicinal chemistry*, 62(9), 4233-4251.
- Tsang, J., ve Tse, G. M. (2020). Molecular classification of breast cancer. *Advances in anatomic pathology*, 27(1), 27-35.
- Türkiye İstatistik Kurumu (2019). Ölüm ve Ölüm Nedeni İstatistikleri 2019: Erişim 30.05.2022, <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2019-33710>
- Valdés, A., García-Cañas, V., Rocamora-Reverte, L., Gómez-Martínez, Á., Ferragut, J. A., ve Cifuentes, A. (2013). Effect of rosemary polyphenols on human colon cancer cells: transcriptomic profiling and functional enrichment analysis. *Genes & nutrition*, 8(1), 43-60.
- Vane, J. O. H. N., ve Botting, R. (1987). Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *The FASEB journal*, 1(2), 89-96.
- Verma, R. S., ur Rahman, L., Mishra, S., Verma, R. K., Chauhan, A., ve Singh, A. (2011). Changes in essential oil content and composition of leaf and leaf powder of *Rosmarinus officinalis* cv. CIM-Hariyali during storage. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 5(2), 181.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., ve Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36(3), 131-149.

- Voss, A. K., ve Strasser, A. (2020). The essentials of developmental apoptosis. *F1000Research*, 9.
- Wenkert, E., Fuchs, A., & McChesney, J. D. (1965). Chemical artifacts from the family Labiatae. *The Journal of Organic Chemistry*, 30(9), 2931-2934.
- Winters, S., Martin, C., Murphy, D., ve Shokar, N. K. (2017). Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Approaches to Understanding Breast Cancer*, 1–32. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.07.002
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 30(1), 1-14.
- Wu, K. K. (2000). Aspirin and salicylate: an old remedy with a new twist. *Circulation*, 102(17), 2022-2023.
- Xiang, Q., Ma, Y., Dong, J., ve Shen, R. (2015). Carnosic acid induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction and Akt inactivation in HepG2 cells. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(1), 76-84.
- Yan, C. M., Chai, E. Q., Cai, H. Y., Miao, G. Y., ve Ma, W. (2015). Oleuropein induces apoptosis via activation of caspases and suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in HepG2 human hepatoma cell line. *Molecular Medicine Reports*, 11(6), 4617-4624.
- Yi, W. ve Wetzstein, H. Y. (2011). Anti-tumorigenic activity of five culinary and medicinal herbs grown under greenhouse conditions and their combination effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(10), 1849-1854.
- Yildiz-Ozturk, E., Gulce-Iz, S., Anil, M. ve Yesil-Celiktas, O. (2017). Cytotoxic responses of carnosic acid and doxorubicin on breast cancer cells in butterfly-shaped microchips in comparison to 2D and 3D culture. *Cytotechnology*, 69(2), 337-347.
- Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., ve Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*, 22(1), 1-13.
- Zhang, X., Chen, Y., Cai, G., Li, X., ve Wang, D. (2017). Carnosic acid induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via ROS-mediated mitochondrial pathway. *Chemico-Biological Interactions*, 277, 91-100.

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE KARNOSİK ASİT VE OLEUROPEİNDEN ZENGİN BİTKİ ÖZÜTLERİ VE SALİSİLİK ASİTİN SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% **17**
BENZERLİK ENDEKSİ

% **15**
İNTERNET KAYNAKLARI

% **4**
YAYINLAR

% **10**
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 5
2	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
5	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	acikerisim.sakarya.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
7	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
8	acikerisim.istinye.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1