



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DULSİTOL'ÜN ÇEŞİTLİ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE APOPTOTİK ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Betül YANIK

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ

ANKARA

2023

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DULSİTOL'ÜN ÇEŞİTLİ MEME KANSERİ
HÜCRELERİNDE APOPTOTİK ETKİ
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Betül YANIK

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü'nün 21L0237017 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2023

ETİK BEYAN FORMU

Ankara Üniversitesi,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Dulsitol'ün Çeşitli Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptotik Etki Mekanizmalarının Araştırılması” başlıklı tez, bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

KABUL VE ONAY FORMU

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında Betül YANIK tarafından hazırlanan “Dulsitol’ün Çeşitli Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptotik Etki Mekanizmalarının Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından doktora tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Prof. Dr.
Bilgehan DOĞRU
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Doç. Dr.
Filiz BAKAR ATEŞ
Ankara Üniversitesi
Raportör

İmza
Prof. Dr.
Aylin ÜSTÜNDAĞ
Ankara Üniversitesi
Üye

İmza
Prof. Dr.
Aymelek GÖNENÇ
Gazi Üniversitesi
Üye

İmza
Dr. Öğr. Üyesi
Mehmet CAN
Ankara Medipol Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1.Meme Kanseri	2
1.1.1.Meme Kanserinin İnsidansı	2
1.1.2. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi	4
1.1.3. Meme Kanserinin Sınıflandırılması ve Tanısı	5
1.1.4. Metastatik Meme Kanseri ve Özellikleri	6
1.1.5. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı Profili	8
1.1.6. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı Profili	9
1.2. Apoptoz	11
1.2.1. Apoptozun Tanımı	11
1.2.2. Apoptozun Regülasyonu	12
1.2.2.1.Bcl-2 Ailesi	12
1.2.2.2. p53	12
1.2.2.3. Kaspazlar	13
1.2.2.4. XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP	14
1.2.2.5. Smac/DIABLO	14
1.2.2.6. HtrA2 (Omi)	14
1.2.2.7. Sitokrom C	14
1.2.2.8. FAS(APO-1 veya CD-95	15
1.2.2.9. AIF(Apoptoz indükleyici faktör)	15
1.2.2.10. Endonükleaz G	15
1.2.3. Apoptozun Etki Mekanizması	15
1.2.3.1. Ekstrinsik Yolak	16
1.2.3.2. İntrinsik Yolak	17
1.3. Matriks Metalloproteinazlar	17
1.3.1.Matriks Metalloproteinazların Yapısı ve Sınıflandırılması	18
1.3.1.1.Kollajenazlar	20
1.3.1.2. Jelatinazlar	20
1.3.1.3. Stromelisinler	21
1.3.1.4. Matrilisinler	21
1.3.1.5. Membran Tipi MMP'ler	21
1.3.1.6. Diğer MMP'ler	21
1.3.2. Matriks Metalloproteinazlar ve Kanser	22
1.4. Doğal Kaynaklı Şeker Alkolleri	24
1.4.1. Dulsitol	26

2. GEREÇ VE YÖNTEM	27
2.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler	27
2.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Gereçleri	27
2.3. Hücre Kültürü	28
2.4. Hücre Canlılık Testi	28
2.5. Hücre Döngüsü Analizi	29
2.6. Apoptotik Etkinin Tayini	30
2.6.1. Annexin V Bağlanması	30
2.6.2. Floresan Görüntüleme	30
2.6.3. Kaspaz Enzim Düzeylerinin Tayini	31
2.6.4. Mitokondriyal Potansiyel Değişikliklerinin Tayini	31
2.7. DNA Hasarının Saptanması	32
2.8. MMP-2/-9 mRNA Ekspresyon Düzeyinin Saptanması	32
2.8.1. RNA İzolasyon Protokolü	33
2.8.2. cDNA Sentezi	34
2.8.3. Real-Time PCR Aşaması	34
2.9. İstatistiksel Analiz	35
3. BULGULAR	36
3.1. Hücre Canlılığı Analizi Bulguları	36
3.2. Hücre Döngüsü Analiz Bulguları	43
3.3. Annexin V Bağlanma Analiz Bulguları	45
3.4. Floresan Görüntüleme Bulguları	47
3.5. Kaspaz Düzeyi Analizi Bulguları	48
3.6. Mitokondriyal Membran Potansiyel Analiz Bulguları	50
3.7. DNA Hasarı Analiz Bulguları	51
3.8. MMP-2/-9 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Bulguları	52
4. TARTIŞMA	54
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
ÖZET	59
SUMMARY	60
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	68

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, doğal bir şeker alkolü olan ve bazı hücre hatları üzerinde, anti-kanser ve anti-enflamatuvar özelliği belirtilmiş olan dulsitolün, MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücreleri üzerindeki antikanser etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu araştırma ayrıca Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün 21L0237017 proje numarası ile desteklenmiştir. Bu proje ile söz konusu bileşiğin, meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkinliği araştırılmış, sitotoksikite sonuçları göz önüne alınarak apoptotik etki mekanizmaları araştırılmış ve antimetastatik etkinliği değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmaların ayrıca, MCF-10A sağlıklı meme epitel hücreleri üzerindeki etkinliği de değerlendirilerek sonuçları karşılaştırılmıştır.

Çalışmalar sırasında tecrübelerini, değerli görüşlerini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tezimi bilimsel standartlara uygun olarak tamamlamamı sağlayan Sayın Danışman Hocam Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ'e de teşekkürlerimi bir borç bilirim ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımnda desteğini esirgemeyen, çalışmalarım sırasında Araştırma Görevlisi olarak çalışan ancak şu anda bu görevi bırakmış olan arkadaşım Ecz.Nuri ÖZMEN'e ve ayrıca aynı dönemde birlikte doktora başlayarak yakın dönemlerde bitirmiş olduğumuz arkadaşım Dr. Ecz. Erva ÖZKAN'a da çok teşekkür ederim.

Son olarak bütün eğitim ve öğrenim hayatım boyunca yanımda olan, benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bu günlere gelmemi sağlayan annem, babam ve Cefair abime de şükranlarımı ve saygılarımı sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
HER2	Human Epidermal Growt Factor Receptor 2
MMP	Matriks Metalloproteinaz
MMK	Metastatik Meme Kanseri
PR	Progesteron Reseptör
ER	Östrojen Reseptör
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
ER- α	Östrojen Reseptör Alfa
RNA	Ribo Nükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
IAP	Apoptoz İnhibitörü Proteinler
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör
Endo G	Endo Nükleaz G
ECM	Ekstraselüler Matrix
MAPK	Mitokondriyal Aktive Edici Protein Kinase
DMSO	Dimetil Sülfoksit
7-AAD	7-Amino Aktinomisin D
ATM	Ataxiatelangiectasia Mutated Kinase

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Metastaz oluşum süreci	7
Şekil 1.2.	MDA-MB-231 hücre hattı mikroskop görüntüsü	9
Şekil 1.3.	MCF-7 hücre hattı mikroskop görüntüsü	10
Şekil 1.4.	Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik mekanizması	16
Şekil 1.5.	MMP'lerin genel yapısı	19
Şekil 1.6.	MMP'lerin yapısında bulunan C-terminali ile Zn iyonu yardımıyla katalitik alanla propeptit etkileşimi	20
Şekil 1.7.	Dulsitol'ün moleküler yapısı	26
Şekil 2.1.	MTT reaksiyonu	29
Şekil 3.1.	Dulsitol uygulanan MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi (24.saat)	36
Şekil 3.2.	Dulsitol uygulanan MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi (48. saat)	37
Şekil 3.3.	Dulsitol uygulanan MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi (72. saat)	37
Şekil 3.4.	Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi (24. saat)	38
Şekil 3.5.	Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi (48. saat)	39
Şekil 3.6.	Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi (72. saat)	39
Şekil 3.7.	Dulsitol uygulanan MCF-10A hücrelerinde hücre canlılığına etkisi. (24. saat)	40
Şekil 3.8.	Dulsitol uygulanan MCF-10A hücrelerinde hücre canlılığına etkisi. (48. saat)	41
Şekil 3.9.	Dulsitol uygulanan MCF-10A hücrelerinde hücre canlılığına etkisi. (72. saat)	41
Şekil 3.10.	Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsü analizine ait plot görüntüleri	43

Şekil 3.11.	Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkisi	44
Şekil 3.12.	Dulsitol bileşiği uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde Annexin V bağlanması analizi plot görüntüleri	45
Şekil 3.13.	Dulsitol bileşiği uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin Annexin V bağlanma analizi bulguları	46
Şekil 3.14.	Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde Annexin V-FITC floresan görüntüleri	47
Şekil 3.15.	Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde kaspaz düzeyi analizi plot görüntüleri	48
Şekil 3.16.	Dulsitol bileşiği uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin kaspaz düzeyleri	49
Şekil 3.17.	Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin mitokondriyel membran potansiyeli analizi plot görüntüleri	50
Şekil 3.18.	Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin mitokondriyel membran potansiyeli bulguları	50
Şekil 3.19.	Dulsitol bileşiği uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen DNA hasarı plot görüntüleri	51
Şekil 3.20.	Dulsitol bileşiği uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonu analizi	52

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Meme kanseri risk faktörleri	4
Çizelge 1.2.	Kaspazlar ve Fonksiyonları	13
Çizelge 3.1.	Dulsitol uygulanan MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığı sonuçları	38
Çizelge 3.2.	Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığı sonuçları	40
Çizelge 3.3.	Dulsitol uygulanan MCF-10A hücrelerinde hücre canlılığı sonuçları	42
Çizelge 3.4.	Dulsitol bileşiği uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkisi	44
Çizelge 3.5.	Dulsitol bileşiği uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin Annexin V bağlanması	46
Çizelge 3.6.	Dulsitol bileşiği uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin kaspaz düzeyleri	49
Çizelge 3.7.	Dulsitol bileşiği uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin tespit edilen mitokondriyel membran potansiyeli	51
Çizelge 3.8.	Dulsitol bileşiği uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonu düzeyleri	52

1. GİRİŞ

Kanser günümüzde, kardiyovasküler hastalıklar ve inmeden sonra dünya genelinde meydana gelen ölümlerin en önemli nedenlerinden biridir (Ferlay ve ark., 2018). 2015 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verileri değerlendirildiğinde kanser sebebiyle olan ölümlerdeki oranlarda, kanserin 172 ülkenin 91'inde 70 yaşından önce birinci veya ikinci ölüm nedeni olduğu ve 22 ülkede üçüncü veya dördüncü sırada yer aldığı belirtilmektedir (Bray ve ark., 2018). 2018 yılı verileri değerlendirildiğinde ise meme kanseri, tüm kanserler içerisinde %11,6 olan ölüm oranı ve 2.088.849 milyon yeni vaka ve 626.679 ölümlerle dünya çapında kadınlar arasında en yaygın kanser türü ve kanser ölümlerinin birincil nedeni olarak kabul edilmiştir (Bray ve ark., 2018). Kadınlar ve erkekler için istatistikler değerlendirildiğinde ise meme kanseri, akciğer kanserinden sonra en fazla görülen kanser türü ve kanserden ölümlerin ikincil nedeni olduğu ifade edilmektedir (Bray ve ark., 2018).

Meme kanseri'nin tedavisinde uygulanan geleneksel tedavi yöntemleri olan cerrahi, radyoterapi, hormon tedavisi ve mevcut kemoterapi seçenekleri de dahil olmak üzere tedavide kullanılan yöntemlerin etkinliği çok yüksek olmayıp, çeşitli yan etkileri bulunmaktadır. Tüm bu sorunlar nedeniyle meme kanserinin tedavisinde yeni ajanlar geliştirmenin önemini giderek arttırmaktadır (Dhankhar ve ark., 2010).

Dulsitol (galaktitol), galaktozun metabolik olarak aldoz redüktaz ile katalizasyonu sonucu oluşan, Asya tıbbında geniş ölçüde kullanılan *enanymus alatus* adı verilen bir bitkiden elde edilebilen, doğal organik bir şeker alkolü olan heksitoldür (Lin ve ark., 2020). Yapılan çeşitli çalışmalarda, doğal kaynaklı bir bileşik olan dulsitolün, anti-kanser, anti-enflamatuvar etkinliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Kobayashi ve ark., 1997). Son yıllarda doğal kaynaklı bileşiklerin kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerinde etkili olduklarının gösterilmesi ile bu etkinliğe yönelik mekanizmaların araştırılma çalışmaları hız kazanmıştır. Bu tez çalışmasında, dulsitolün, MCF-7 ile MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde antiproliferatif, apoptotik ve antimetastatik etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Söz konusu çalışma, dulsitolün meme kanseri hücreleri üzerindeki etkinliğinin değerlendirildiği

ilk çalışma olması bakımından önem taşımakta olup, elde edilen bulguların literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

1.1. Meme Kanseri

Günümüzde oldukça önemli bir hastalık olan meme kanserinin medikal geçmişi 3500 yıl öncesine dayanır ve bu hastalığı ilk tanımlayan uygarlık Eski Mısırlılardır. Edwin Smith cerrahi papirüsünde meme kanserinin, tanımlaması ilk kez ifade edilmiş ve tedavisinin olmadığı belirtilmiştir (Ebeid ve ark., 1999; Akram ve ark., 2012). Hipokrat ise M.Ö. 460' da, meme kanserini humoral bir hastalık olarak tanımlamış ve Yunanca bir kelime olan crab/cancer için karcinos terimini kullanmıştır (Akram ve ark., 2012).

1.1.1. Meme Kanserinin İnsidansı

Meme kanseri, kadın popülasyonları içerisinde en sık görülen kanserdir ve kanser sebebiyle meydana gelen ölümlerin en önde gelen nedenidir (Momenimovahed ve Salehiniya 2019). Meme kanserinin insidansı dünya çapında 100.000'de 46.3'tür ve meme kanseri vakalarının sayısının artarak 2030 yılında 3 milyona ulaşması beklenilmektedir (Bray ve ark., 2018; Ginsburg ve ark., 2017). Bununla birlikte, meme kanseri yalnızca kadınlarla da sınırlı değildir. Erkeklerde meme karsinomu tüm meme kanserlerinin %0.8 ile %1'ini oluşturmaktadır (Nounou ve ark., 2015).

Meme kanserinin insidansı ırk ve etnik kökene göre değişkenlik göstermekle birlikte dünyanın farklı bölgelerinde farklı oranlarda görülmektedir (Momenimovahed ve Salehiniya 2019). Meme kanserinin görülme sıklığı gelişmiş ülkelerde daha yüksektir (DeSantis ve ark., 2014). Meme kanserinin görülme sıklığı Orta Afrika ve Doğu Asya'da 100.000 kişide 27 iken Kuzey Amerika'da 100.000 kişide 92 oranında olduğu ifade edilmektedir (Momenimovahed ve Salehiniya 2019). Tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %24'ü Asya- Pasifik bölgesinde meydana gelir ve en yüksek

oranlar Çin, Japonya ve Endonezya’da görülmektedir (Youlden ve ark., 2014; Ghoncheh ve ark., 2016).

Türkiye bileşik veri tabanı 2015 yılı verinde ise meme kanserinin kadın popülasyonu içerisinde en yüksek insidansa sahip kanser türü olduğu görülmekte ve kadın popülasyonu içerisinde teşhis konulan her 4 vakadan 1’inin meme kanseri olduğu gözlenmektedir. Türkiye’de meme kanseri teşhisi konulan kadınların %44,5 oranında 50-69 yaş bandında yer aldığı, %40,6 oranında ise 25-49 yaş bandında yer aldığı belirtilmektedir (Türkiye kanser istatistikleri, 2017).



1.1.2. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi

Meme kanseri oluşumunda epidemiyolojik çalışmalara göre pek çok risk faktörü yer almaktadır ve bu risk faktörleri; genetik yatkınlık, erken menarş, ileri yaşta çocuk sahibi olma, emzirme dönemlerinin kısa olması, kontraseptif kullanımı, menopoz sonrası hormon tedavisi, sedanter yaşam tarzı, aşırı kilo ve obezite, alkol tüketimi olarak belirtilmiştir (Fazel ve ark., 2019).

Çizelge 1.1. Meme kanseri risk faktörleri (Momenimovahed ve Salehiniya 2019).

Risk Faktörleri		Koruyucu	Yatkınlaştıran	Tartışmalı
Demografik	Kadın Cinsiyeti		√	
	Yaş		√	
	Kan grubu			√
Üreme	Menarş yaşı			√
	Geç menopoz yaşı		√	
	Tam süreli gebelik	√		
	Kürtaj			√
	Yumurtlama-adet döngüsü	√		
	Hamilelik özellikleri	√	√	
	Hormonal kontraseptif yöntemler		√	
Hormonal	Ovulasyon uyarıcı ilaçlar			√
	Postmenopozal hormon tedavisi		√	
Kalıtsal	Genetik Faktörler		√	
	Ailedeki meme kanseri öyküsü		√	
Meme ilişkili	Az emzirme süresi			√
	Fazla meme yoğunluğu			√
	İyi huylu meme hastalıkları		√	
Yaşam Tarzı	Obezite ve fazla kilo		√	
	Alkol tüketimi		√	
	Sigara		√	
	Kahve			√
	Diyet		√	
	Fiziksel aktivite	√		
	D vitamini	√		
	Uyku süresi			√
Diğer	Hava kirliliği		√	
	Gece çalışma		√	
	Sosyoekonomik durum		√	
	Diyabet		√	
	Radyasyon		√	

Meme kanseri oluşumu ve tedavi süreci, tüm dünyada insanlara maddi-manevi, sosyolojik ve psikolojik pek çok yük getirmektedir. Meme kanserinin insidansında **Çizelge 1.1.**'de de görüldüğü gibi pek çok risk faktörünü yer almakta ve bu risk faktörlerinin meme kanserinin oluşumunda önemli olduğu görülmektedir (Momenimovahed ve Salehiniya 2019).

1.1.3. Meme Kanserinin Sınıflandırılması ve Tanısı

Meme kanseri'nin sınıflandırılması günümüzde histolojik, patolojik ve moleküler olmak üzere temel anlamda üçe ayrılmaktadır. Histolojik olarak sınıflandırma, kanserin hangi yapıdan oluştuğuna ve yayılma şekline göre yapılmaktadır (Öztemur ve ark., 2015).

Patolojik olarak sınıflandırma, çeşitli reseptörlerin bulunup bulunmamasına göre yapılmakta olup, bu reseptörlerden östrojen, progesteron ve HER2 reseptörlerini içerdiği durumda pozitif, aksi halde negatif olarak isimlendirilmektedir. Üç reseptör çeşidini de içermiyorsa triple negatif olarak adlandırılmaktadır. Bu nedenle patolojik anlamda; ER+, ER-, PR+, PR-, HER2+, HER2- ve triple negatif olmak üzere 7 grupta değerlendirilmektedir (Öztemur ve ark., 2015).

Moleküler olarak sınıflandırmanın yapılmasında ise, temel anlamda Perou ve arkadaşlarının 2000 yılında yapmış oldukları kapsamlı ve oldukça önemli olan gen ifade analizi çalışmasına göre, luminal hücre benzeri, bazal hücre benzeri, normal epitel benzeri ve HER2+ grup olarak yapılmaktadır (Perou ve ark., 2000). Daha sonra yapılan çalışmalarda luminal tipin luminal A ve luminal B olarak ayrılması ve Ca++ bağımlı hücre-hücre adezyon glikoproteini olan E-cadherin ile ilişkili Klaudin-düşük (claudin low)'un eklenmesiyle altı alt tipe ayrılmıştır (Sorlie ve ark., 2003; Herschkowitz ve ark., 2007).

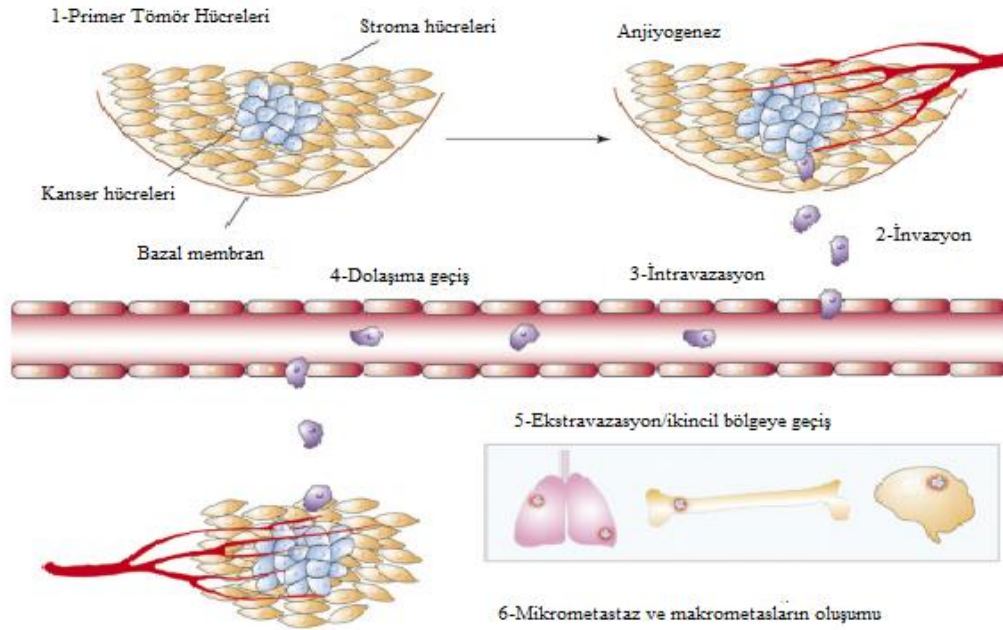
Meme kanserinin tanısı için mevcut olarak günümüzde, mamografi, manyetik rezonans görüntüleme, moleküler meme görüntüleme, meme biyopsisi ve çeşitli biyobelirteçler tercih edilmektedir (Nounou ve ark., 2015). Bu yöntemler içerisinde

meme kanserini tespit etmede en kesin yöntem meme biyopsisidir (Palmer ve ark., 1993). Meme kanserinin kompleks yapıda olması ve heterojenite göstermesi farklı alt tiplere sınıflandırılmasına ve tedavide çeşitli rejimlerin uygulanmasına neden olmuştur (Nounou ve ark., 2015). Meme kanseri'nin tedavisi için uygulanan geleneksel tedavi yöntemleri olan cerrahi, radyoterapi, hormon tedavisi ve mevcut kemoterapi seçenekleri de dahil olmak üzere tedavide kullanılan yöntemlerin etkinliği çok yüksek olmayıp, çeşitli yan etkileri bulunmaktadır (Dhankhar ve ark., 2010).

1.1.4. Metastatik Meme Kanseri ve Özellikleri

Metastatik meme kanseri, tümör hücrelerinin bazal bölgelerinden ayrılması ve daha uzak bölgelere yayılması ile sonuçlanan, tümör hücreleri ile konakçı hücreler arasında pek çok etkileşimi içeren, çok aşamalı bir oluşum sürecini ifade etmektedir.

Metastaz süreci, tümör hücreleri ile tümör mikroçevresindeki konakçının hücreleri arasında geçen ve etkileşimli olan döngüsel bir süreci ifade etmekte olması sebebiyle pasif olmayan bir süreçtir (McGee 2010). Bu süreç dokularda primer tümörü oluşturan malign hücrelerin bazal membranı aşmasıyla başlar. Daha sonra bu hücreler lenf ve kan damarları yardımıyla dolaşım sistemine girerler. Trombositler tarafından korunan kanser hücreleri dolaşımdan ayrılıp çoğalabilmek amacıyla uygun ortam koşulları buldukları ikincil bölgeye yerleşirler. Bu evrede, hücreler ya uyku durumunda kalırlar ya da ekstraselüler evresini gerçekleştirerek, klinik olarak belirlenebilen makrometastazlar oluşturduğu Şekil 1.1'de de gösterilmiştir. Malign hücrelerin bazal memranı aşması için proteolitik olarak parçalanması gerekmektedir. Aktif olarak gerçekleşen bu proteoliz, matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) tarafından sağlanır. Ekstraselüler matriksin parçalanması ile kanser hücrelerin metastaz sürecinde bu sebeple MMP'lerin oldukça önemli olduğu görülmektedir (Vu ve Werb 2000).



Şekil 1.1. Metastaz oluşum süreci (Ma ve Weinberg 2008).

Metastatik meme kanseri (MMK), yeni tanı alan tüm meme kanserlerinin % 3 - % 7' sini oluşturmaktadır (Singletary ve ark., 2006).

MMK tedavisi toksisite riski, hastanın tedavi tercihleri, tümörün yükü ve hormon reseptör durumu, tümörün karakterizasyonu, yaş, önceki tedavi öyküsü, komorbiditeler gibi belirli faktörlere göre değişmektedir.

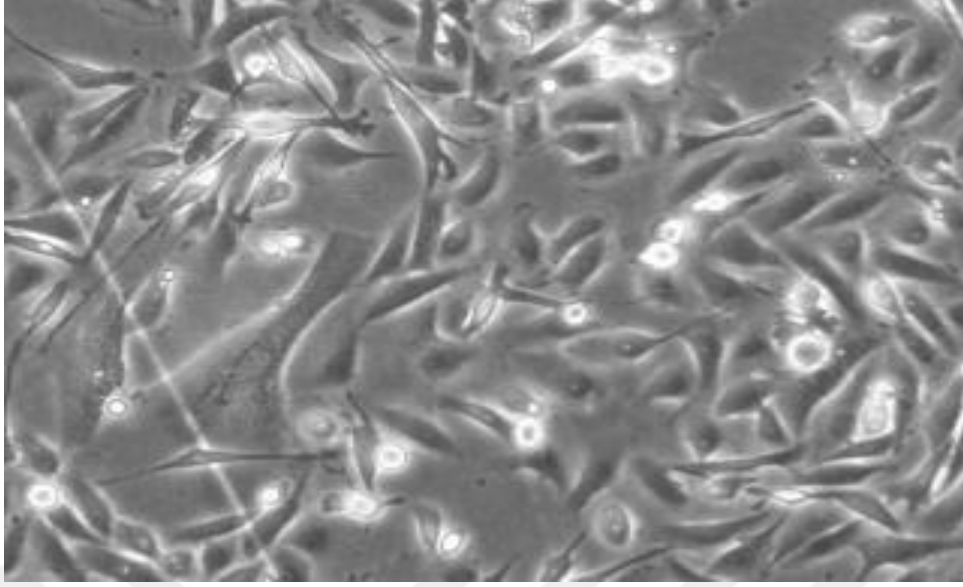
Meme kanserinde metastaz tedavisinin amacı, sağkalımı uzatmak, semptomları hafifletmek ve hastalığın ilerlemesini engellemektir. Metastatik meme kanserinin tedavisi ise genel olarak cerrahi, kemoterapi ve hormonal tedavi olmak üzere üç kategoriye ayrılmaktadır (Al-Mahmood ve ark., 2018).

1.1.5. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı Profili

MDA-MB-231 hücre hattı, metastaz özellik gösteren meme adenokarsinomu teşhisi konulan 51 yaşındaki bir kadından plevral efüzyonu aracılığıyla elde edilen epitelyal, insan meme kanseri hücre hattıdır (Cailleau ve ark., 1978). Bu hücre hattı, tıbbi araştırma laboratuvarlarında en sık tercih edilen insan meme kanseri hücre hatlarından birisidir.

MDA-MB-231, östrojen (ER) ve progesteron (PR) reseptörlerinin ekspresyonlarının yanı sıra, HER2 (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü)'nün amplifikasyonunun olmaması ile ayrıca oldukça agresif, invaziv ve zayıf farklılaşma yeteneği olan triple negatif meme kanseri (TNBC) hücre dizisidir. Triple negatif meme kanseri (TNBC), meme kanserlerinin %15 ila %20'sini oluşturur (Schmadeka ve ark., 2014). Diğer istilacı kanser hücre hatlarına benzer şekilde, MDA-MB-231 hücrelerinin istilasına, ekstraselüler matrisin proteolitik parçalanması aracılık eder (Liu ve ark., 2003; Chavez ve ark., 2010).

ER ve PR ekspresyonu ve HER2 amplifikasyonunun olmaması nedeniyle, hücre hattı başlangıçta bir 'bazal' meme kanseri hücre hattı olarak gruplandırılmıştır. Bununla birlikte, claudin-3 ve claudinin-4'ün down regülasyonu, Ki-67 proliferasyon belirtecinin düşük ekspresyonu, epitelyal-mezenkimal geçiş ile ilişkili belirteçler için zenginleştirmeyi sergilediği için ve CD44+CD24-/düşük fenotip gibi meme kanseri kök hücreleri ile bağlantılı özelliklerin ifadesi ile şimdi claudin-düşük moleküler alt tipine ait olduğu kabul edilmektedir (Holiday ve ark., 2011). 3D kültürde, hücre hattı endotel benzeri morfoloji gösterdiği Şekil 1.2'de görülmektedir ve invaziv fenotipi ile ayırt edilir (Harrell ve ark., 2014). Ayrıca genellikle birden fazla hücre kolonisini birbirine bağlayan yıldız şeklinde çıkıntılara sahiptir (Kenny ve ark., 2007).



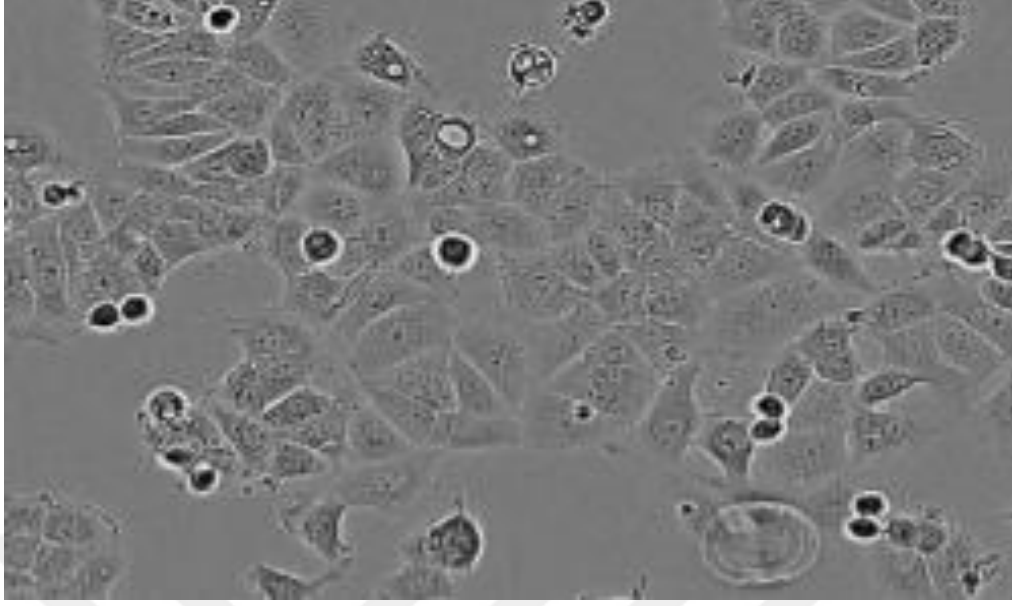
Şekil 1.2. MDA-MB-231 hücre hattı mikroskop görüntüsü

Triple negatif meme kanseri, tedavi seçenekleri açısından kısıtlı olan agresif bir meme kanseri çeşitidir. Triple negatif meme kanserinin moleküler yapısını anlamak, tedavide etkin yeni bir ajan geliştirebilmek için önemlidir.

1.1.6. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı Profili

MCF-7 hücre hattı, meme adenokarsinomunu taşıyan 69 yaşındaki bir kadından alınan plevral efüzyondan elde edilmiştir (Soule ve ark., 1973). İsmini tespit edildiği vakıf olan, Michigan Kanseri Vakfı'nın kısaltmasından (MCF) almıştır ve dünyada çalışmalarda en çok tercih edilen insan meme kanseri hücre dizisidir (Lee ve ark., 2015).

MCF-7 hücreleri, meme epiteline benzer morfolojik özellik göstermektedir. Hücre hattı, hücre kabı ile hücre tabakası arasında sıvı birikmesi nedeniyle tek tabakalar kubbe benzeri (**Şekil 1.3**) yapıları oluşturur (Lippman ve ark., 1975; Brooks ve ark., 1973).



Şekil 1.3. MCF-7 hücre hattı mikroskop görüntüsü

Östrojen reseptörü alfa ($ER-\alpha$) eksprese eden birkaç meme kanseri türünden olmakla beraber hücreler aynı zamanda androjen, progesteron ve glukokortikoid reseptörlerini de eksprese etmekte ve bu özellikleri nedeniyle çalışmalarda dikkat çekerek önem arz etmektedirler (Horwitz ve ark., 1975).

Hücre hattının pasajlanması sonucu elde edilen hücreler, farklı laboratuvarlarda belirli süre sonra farklı özellik göstermiş ve genetik olarak kararsız olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kök hücre fraksiyonu tanımlanarak, hücresel alt tipleri yeniden oluşturabildiği ve kültürlerde hücresel alt popülasyonların varlığı belirlenmiştir (Comşa ve ark., 2015).

MCF-7 hücre hattı, meme kanseri biyolojisini incelemek için önemli bir in vitro model olarak kullanılır. Mevcut varyantların olması nedeniyle, kemoterapötik ilaçların geliştirilmesinde ve ilaç direncinin anlaşılmasında önemli uygulamaları vardır (Comşa ve ark., 2015).

1.2. Apoptoz

1.2.1. Apoptozun Tanımı

Hücrelerin proliferasyonu ve ölümü arasında önemli bir denge bulunmakta olup çeşitli hücresel mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir. Hücre ölüm mekanizmalarından biri olan apoptoz, genel anlamda programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan, çeşitli genlerle regülasyonu sağlanan, RNA, protein sentezi ve enerji gereksinimi olan, organizmada homeostazı sağlayan hücresel bir süreçtir (Guo ve ark., 2016). Apoptoz, yunanca apo; ayrı ptozis: düşme kelimelerinin birleşmesinden oluşmuştur. Apoptoz terimi, ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından ifade edilmiştir (Kerr ve ark., 1972).

Apoptoz ile ilgili yürütülen çalışmalarda genellikle çok basit yapıda, çok hücreli özellikteki *Caenorhabditis elegans* nematodu tercih edilmiştir. 1994 yılında Horvitz, Sulston ve Brenner *Caenorhabditis elegans* nematodunun ebriyonik gelişimi sırasında sahip olduğu 1090 hücreden 131'inin spesifik olarak programlı bir şekilde öldüğünü ve bu durumun belirli genler aracılığıyla düzenlendiğini kanıtlamışlardır (Hengartner ve ark., 1992; Andrew ve ark., 2001).

Apoptoz'un canlılarda temel işlevi ve amacı çevresinde bulunan hücrelere zarar vermeden ve onları kötü yönde etkilemeden belirlenen hücreleri yok etmektir. Bu şekilde canlılarda;

- a) Ebriyo gelişimi, başkalaşımı ve doku atrofisi sırasında organizmanın şeklinin oluşturulması,
- b) Organizmanın toplam hücre sayısının düzenlenmesi,
- c) Tümör hücrelerinin, virüsle kontamine olmuş hücrelerin, otoimmün hücrelerin yok edilmesi gibi önemli fizyolojik süreçlerin gerçekleşmesi sağlanmaktadır (Gültekin ve ark., 2008).

1.2.2. Apoptozun Regülasyonu

Apoptozun düzenlenmesinde genel olarak kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler görev alır (Guo ve ark., 2016).

Apoptozun regülasyonu, hücre içi ve hücre dışı kaynaklı olmak üzere çeşitli faktörler tarafından sağlanmaktadır. Bu faktörlerden apoptozu tetikleyerek başlatanlara “pro-apoptotik”, hücre ölümünü engelleyerek baskılayanlara ise “anti-apoptotik” faktör adı verilir (Dasgupta ve ark., 2016).

1.2.2.1. Bcl-2 Ailesi

Apoptozun düzenlenmesinde oldukça önemli rolü olan ve 20 üyeden oluşan önemli bir protein ailesidir. Bu ailenin üyeleri birbirine zıt iki gruptan oluşmaktadır. Bunlardan apoptozun indüklenmesinde görev alan üyeleri ‘proapoptotik’ olarak adlandırılırken apoptozun inhibisyonunda görev alan üyeleri ise ‘antiapoptotik’ olarak adlandırılır.

Proapoptotik üyeler içerisine bad, bax, BclXs, bid, bim, puma, noxa girer ve sitozolde yer alırlar.

Antiapoptotik üyeler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1’dir. Bu proteinler de mitokondrinin dış membranında, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarında yer almaktadır (Adams ve ark., 2001). Bcl-2 ailesi üyeleri temelde, mitokondriyal membran permeabilitesinin regülasyonunu sağlayarak apoptozun düzenlenmesinde görev almaktadır (Gültekin ve ark., 2008).

1.2.2.2. p53

Hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde hücre siklusunun G1 fazında durmasını sağlayarak hücreye DNA tamiri için süre tanıyan önemli bir transkripsiyon proteinidir. p53 proteininin bir başka görevi de, DNA hasarı onarılamayacak durumda olduğunda, Bcl-2 ailesinin üyeleri olan Bax, Puma, Noxa gibi pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonlarını arttırarak hücrelerin apoptoza sürüklenmesini

kolaylaştırmaktır (Vousden ve ark., 2002). Pek çok farklı kanser türünün %50'sinde p53'ün mutasyona uğradığı veya ikinci kopyasının yok olduğu belirtilmiştir (Whibley ve ark., 2009). Bu nedenle son 20 yıldır p53'ün gen tedavisi yöntemleriyle kanserli dokulara kazandırılmasını amaçlayan çalışmalar önemli yer tutmaktadır (Chen ve ark., 2010).

1.2.2.3. Kaspazlar

Apoptozda görev alan ve Sistein Aspartat Spesifik Proteaz (Cystein Aspartat Spesifik Protease) şeklinde ifade edilen önemli bir proteaz enzim grubudur. Adlandırılması aspartik asit kalıntılarının hemen ardından kesmek için sistein kalıntılarını kullanmaları nedeniyle almışlardır. Kaspazlar hedef hücrede inaktif prokaspaz veya zimojen şeklinde bulunurlar. Kaspazların zimojen yapısı apoptozun indüklenmesinden sonra kesilerek etkin forma dönüştürülmektedir (Alenzi ve ark., 2010).

Kaspazlar apoptozun oluşumunda rol alan 40'tan fazla proteazın aktifleşmesine yol açmaktadırlar (Kartlaşmış ve ark., 2016). İnsanlarda 14 ayrı kaspaz tanımlanmıştır ve Çizelge 1.2'de de gösterilmekle birlikte, fonksiyonlarına göre başlatıcı kaspazlar, efektör kaspazlar ve inflamatuvar kaspazlar şeklinde üç gruba ayrılmaktadır (Alenzi ve ark., 2010).

Çizelge 1.2. Kaspazlar ve fonksiyonları (Kartlaşmış ve ark., 2016).

	Kaspaz Türü	Kaspaz Fonksiyonu
Başlatıcı kaspazlar	Kaspaz 2,8,9,10	Apoptotik uyarı ile meydana gelen ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletir.
Efektör kaspazlar	Kaspaz 3,6,7	Başlatıcı kaspazlar ile etkileşerek apoptozda görevli ilgili proteinleri parçalayıp apoptotik hücre morfolojisinin oluşumunu düzenler.
İnflamatuvar kaspazlar	Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14	Patojenlere karşı immün yanıtın oluşumunda görev alır.

1.2.2.4. XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP

Apoptoz inhibitörü proteinler (IAP) olarak ifade edilen, omurgalı ve omurgasız canlılarda antiapoptotik etki göstererek apoptozun negatif yönde düzenlenmesini sağlayan regülatör proteinlerdir. Apoptoz inhibitor proteinleri, genellikle efektör kaspazlar olan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 ye doğrudan bağlanarak söz konusu proteinleri inhibe ederek etkilerini göstermektedir (Vande Walle ve ark., 2008).

1.2.2.5. Smac/DIABLO

Çekirdekdeki genler tarafından kodlanan apoptozun gerçekleşmesini takiben sitoplazmaya salınan mitokondriyal bir proteindir. Smac/DIABLO proteinleri kaspazların çalışmasını engelleyen IAP'lere bağlanarak kaspazları kesim ve aktivasyona açık hale getirmekte ve apoptozun hızını arttırmaktadır (Augelo ve ark., 2009).

1.2.2.6. HtrA2 (Omi)

Olgun serin proteaz HtrA2 (Omi) kaspaz aktivatörü şeklinde ifade edilmektedir. HtrA2 mitokondriyal membranların arasında bulmakta ve sağlıklı hücrelerde proteolitik hasarı inhibe etmektedir. Apoptotik uyarı sonucunda mitokondriyal bütünlüğün kaybıyla sitozolik translokasyon oluşmakta ve kaspaz-9 ile XIAP (X'e bağımlı IAP) etkileşimini bozmaktadır (Vande Walle ve ark., 2008).

1.2.2.7. Sitokrom C

Mitokondriyal iç membranın periferik bir proteini olan Sitokrom c, solunum zincirinin kompleks III ve kompleks IV'ü arasında bir elektron mekiği olarak işlev göstermektedir ve yaşamın sürdürülebilmesi için sitokrom c aktivitesi gereklidir. Farelerde, somatik sitokrom c geninin bozulmasının embriyonik letaliteye neden olduğu bildirilmiştir (Garrido ve ark., 2006).

Apoptoz anında sitokrom c, smac proteini ile birlikte mitokondriden salınır. Sitokrom c, kaspaz-9 ve 3'ün aktivasyonunda rol alır ve IAP'lerin kaspazlara bağlanmasını engelleyerek apoptozda rol oynar (Kartlaşmış ve ark., 2016).

1.2.2.8. FAS (APO-1 veya CD-95)

TNF reseptör ailesinin üyesi olmakla birlikte FAS-L'nin ilk tespit edilen reseptörüdür. FAS geni insanda, NF-kB ve p53 proteinleri tarafından kontrol edilmektedir (Nagata 1999). FAS proteini hücre yüzeyinde bulunan kendi reseptörüne bağlanarak reseptörün trimerizasyonunu gerçekleştirir. Aktive edilen reseptörler FADD reseptör molekülü ile birleşerek FAS reseptörünün karboksil ucuna yakın bölge aktif hale getirilir ve prokaspazların aktivasyonu ile apoptozun uyarılması gerçekleşir (Curtin ve ark., 2003).

1.2.2.9. AIF (Apoptoz indükleyici faktör)

Apoptoz sırasında mitokondriden salınan proapoptotik bir protein olup kromatin yoğunlaşmasına ve DNA fragmentasyonuna yol açmaktadır (Kartlaşmış ve ark., 2016).

1.2.2.10. Endonükleaz G

Mitokondriye spesifik bir nükleaz olup apoptoz anında çekirdeğe transloke olur. Kaspazlardan bağımsız yolla rol oynayarak DNA'yı parçalara ayırmada görev almaktadır (Kartlaşmış ve ark., 2016).

1.2.3. Apoptozun Etki Mekanizması

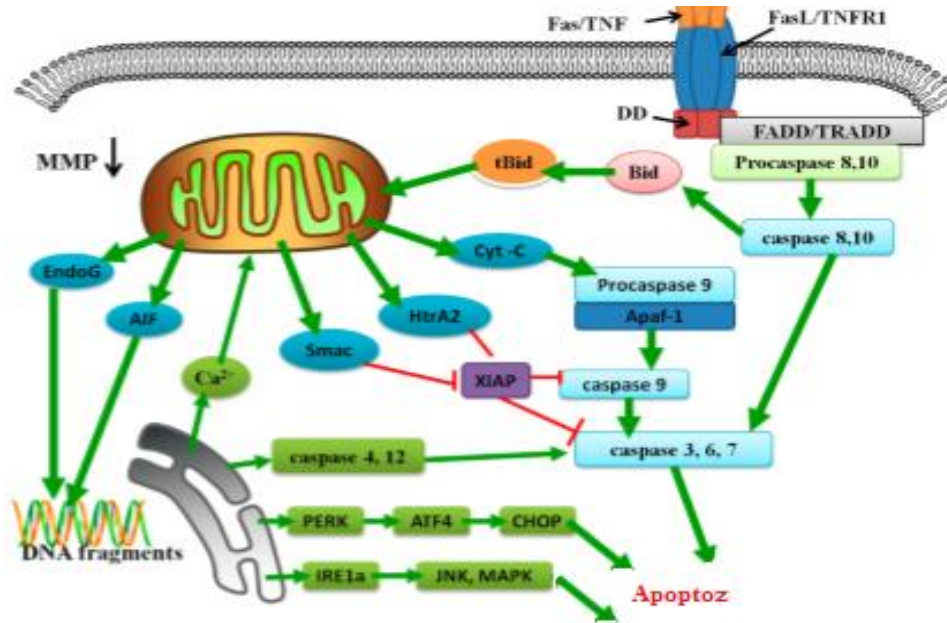
Apoptoz hücrede iki farklı yolla aracılığıyla gerçekleşmektedir:

- I) Ekstrinsik yolla
- II) İntrinsik yolla (Mitokondriyal yolla)

Apoptozun meydana gelmesine neden olan hücre içi sinyaller, DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} düzeyinin değişmesi, metabolik ve/veya hücre döngüsü bozuklukları ve hipoksidir.

Büyüme ve üreme faktörlerinin yetersiz oluşu, ölüm reseptörlerinin uyarılması, sitotoksik T lenfosit ve dış faktörler (iskemi, toksinler, UV, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon) ise hücre dışı sinyaller olarak etki göstermektedir.

Hücre içi sinyaller intrinsik apoptoz yolağını aktifleştirirken, hücre dışı sinyaller ekstrinsik apoptoz yolağını aktifleştirmektedir.



Şekil 1.4. Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik mekanizması (Guo ve ark., 2016).

1.2.3.1. Ekstrinsik Yolak

Apoptozun ekstrinsik yolak ile aktive olması, bu yolda yer alan transmembran reseptör aracılı etkileşimleri içermektedir. Ekstrinsik yolda, ölüm ligandının (FASL/TNFR1) ölüm reseptörüne (FAS/TNF) bağlanması ile reseptör trimerik yapı kazanarak aktive olmaktadır. Bunun ardından FAD/TRADD ve prokaspaz 8 kombinasyonu etkileşmekte ve aktifleşen kaspaz 8, yolağın devamında yer alan

efektör kaspazları ve bid proteinini aktifleştirmektedir. Aktifleşen bid, mitokondri porlarından geçip, mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasına neden olarak mitokondri aracılı apoptozu (intrinsik apoptozu) başlatmaktadır (Guo ve ark., 2016).

1.2.3.2. İntrinsik Yolak

İntrinsik yolakta, mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması sonucunda Şekil 1.4'de de gösterildiği üzere mitokondri iç zar boşluğundan sitoplazmaya sitokrom c, Smac, HtrA2, AIF ve Endo G salınımı gerçekleşmektedir. Sitoplazmik sitokrom c, prokaspaz-9 ve Apaf1'in etkileşmesini sağlayarak apoptozom kompleksini oluşturmakta ve daha sonra kaspaz 9'u aktifleştirmektedir. Aktif kaspaz 9, kaspaz-3, -6 ve -7'yi aktifleştirerek apoptozun indüklenmesini sağlar. Smac ve HtrA2, apoptoz inhibe edici proteinler ile etkileşerek apoptozu yardımcı olmaktadır. AIF ve Endo G salınımı ile kaspaz bağımsız mitokondri yolağı aktifleştirilmektedir (Guo ve ark., 2016).

1.3. Matriks Metalloproteinazlar

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler), çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol alan çinko bağımlı endopeptidazlardır (Alaseem ve ark., 2019). Yapılan araştırmalar Matriks metalloproteinazlar (MMP) gibi hücre dışı matris proteinazların, karsinogenez sırasında mikro çevre üzerindeki değişikliklerin ana parçaları olduğunu ortaya koymuştur (Kessenbrock ve ark., 2010; Page-McCaw ve ark., 2007).

Matriks metalloproteinazların katalitik aktivitelerinin tanımlanması ilk kez 1962 yılında metamorfoz geçiren kurbağa yavrusunun kuyruğundaki bir kolajenazın aktivitesinin belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir (Gross ve Lapierre 1962). O tarihten bu zamana kadar geçen süre içinde MMP araştırma alanı kapsamlı dönüşümlerden geçmiştir.

İnsan MMP ailesi, metzincin süper ailesine ait olan 24 üyeli Zn^{+2} ye bağımlı endopeptidazları içermektedir. Bu ailenin üyeleri esas olarak proteolitik aktiviteleri kataliz etmekte ve böylece hücre büyümesi ile morfogenez için uygun ortamın sağlanmasında önemli olan proteolitik aktivasyon aracılığı ile hücre dışı matriksin

(ECM) parçalanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Vandenbroucke ve Libert 2014). MMP'ler latent formda eksprese edilmekte ECM'ye karşı proteolitik aktivitelerini gerçekleştirmek için daha sonra aktive olmaktadır (Ozkan ve Bakar-Ateş, 2020). Normal fizyolojik koşullar altında MMP'lerin aktiviteleri, transkripsiyon, öncü zimojenlerin aktivasyonu, spesifik ECM bileşenleri ile etkileşim ve endojen inhibitörler tarafından düzenlenir (Visse ve Nagase 2003).

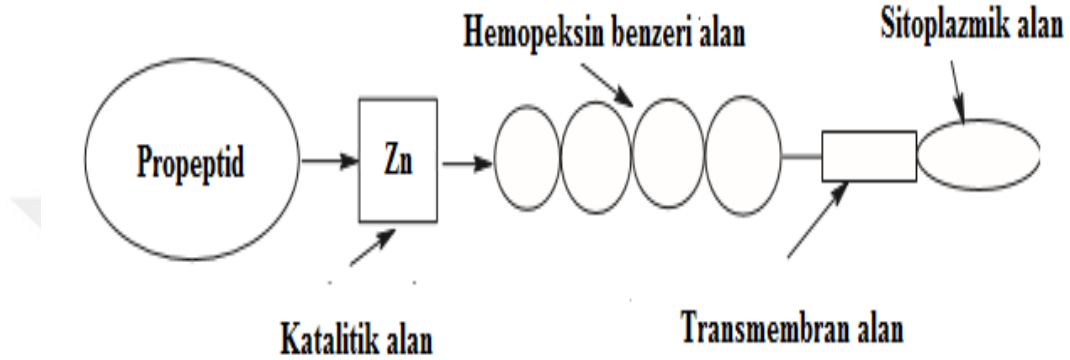
MMP enzimleri normalde, embriyonik gelişim, yara iyileşmesi, uterus ve meme gelişimi, plasenta gelişimi sırasında endometrial stroma içerisine trofoblast invazyonu gibi çeşitli proseslerde, ihtiyaç duyulduğunda eksprese olmaktadır (Woessner 1991). Aynı zamanda, periodontitis, romatoid artrit ve tümör hücresinin invazyonu ve metastazı gibi patolojik koşullarda MMP enzimlerinin anormal eksprese olduğu saptanmıştır (Shapiro, 1998; Parks ve ark., 2004; Egeblab ve Werb 2002; Nagase ve ark., 2006).

MMP'ler hücre çoğalması, göç ve farklılaşması ECM'nin yeniden yapılandırılması, doku invazyonu ve vaskülarizasyonu gibi birçok biyolojik süreçte önemli rol oynamaktadır. Bu biyolojik süreçler normal gelişim ve organogenez sırasında birçok kez gerçekleşmekte olup, uygun şekilde dengelenmezse kanser, tümör progresyonu ve doku metastazı gibi zararlı patolojik durumlara da yol açabilmektedir (Chang ve Werb 2001). Bununla birlikte MMP'ler meme, prostat, karaciğer ve akciğer kanserleri de dahil olmak üzere önemli sayıda solid tümörlerde eksprese edilmektedir. Benzer şekilde, solid olmayan tümörlerde MMP'lerin anormal ekspresyonunun rollerini değerlendiren bazı çalışmalar da bulunmaktadır (Alaseem ve ark., 2019).

1.3.1. Matriks Metalloproteinazların Yapısı ve Sınıflandırılması

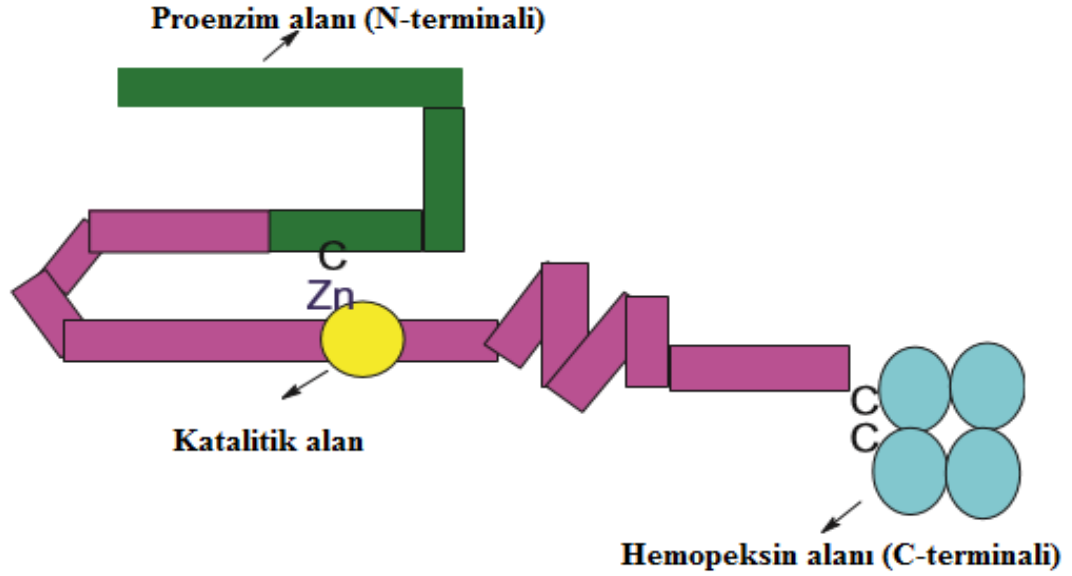
MMP'ler latent formda farklı yapısal bölgelere sahip ve büyük ölçüde birbirlerine benzer proteinlerdir. Temel olarak MMP'lerin protein yapısı Şekil 1.5'de ifade edildiği üzere propeptit, katalitik ve hemopeksin benzeri alanlardan oluşmaktadır.

Propeptit alanı yaklaşık olarak 80 amino asitten oluşur ve MMP'leri inaktif durumda tutmakla görevli olup sistein yapısı içerir. Katalitik alan ise propeptit alanından sonra gelir ve yaklaşık olarak 170 amino asit uzunluğundadır. MMP'lerin ortak özelliklerinden biri de katalitik tarafta Zn^{+2} molekülünün gerekmesidir, ayrıca bu enzimler inaktif zimojenler olarak sentezlenir ve katalitik aktiviteleri için proteolitik bozunmaya ihtiyaç duyarlar (Alaseem ve ark., 2019).



Şekil 1.5. MMP'lerin genel yapısı (Sekhon, 2010).

MMP'lerin yapısında, hemopeksin benzeri alan adı verilen bir bölge bulunmaktadır. Hemopeksin benzeri alan Şekil 1.6'da gösterilmekle birlikte, karboksil ucunda yaklaşık 200 amino asit içerir ve prolin açısından zengin menteşe bölgesi adı verilen alan ile katalitik alana bağlanır. Bu alan katalitik olmayan aktivitelerin gerçekleştirilmesinden sorumludur. MMP ailesi üyelerinden MMP-7 ve MMP-26'da bu yapı bulunmamaktadır (Brinckerhoff ve Matrisian 2002).



Şekil 1.6. MMP'lerin yapısında bulunan C-terminali ile Zn iyonu yardımıyla katalitik alanla propeptit etkileşimi (Sekhon 2010).

Bazı MMP'ler ise furin ile aktive edilmiş yapı içermektedir ve bu yapının aktivasyonu hücre içi serin proteaz aktivasyonu için gereklidir. Furin ile aktive olan MMP'ler membran tipi MMP'ler ile salgılanan MMP'lerden MMP-11, MMP-21 ve MMP-28'i kapsamaktadır.

MMP'ler yapısal olarak birçok benzer özellik göstermesine karşın substrat özgüllüğü, sekans benzerliği ve domain içeriğine göre değerlendirildiğinde altı sınıfa ayrılmaktadır (Nagase ve ark., 2006).

1.3.1.1. Kollajenazlar

Bu enzimlerin temel özelliği, intersitsyel kollajen I-II ve III'ü N terminalinden belirli oranda parçalayabilme yetenekleridir. MMP ailesi üyelerinden MMP-1, MMP-8, MMP-13 ve MMP-18 bu grupta yer almaktadır (Visse ve Nagase 2003).

1.3.1.2. Jelatinazlar

Bu grupta Jelatinaz A (MMP-2) ve Jelatinaz B (MMP-9) yer almakta olup, denatüre kollajenleri ve jelatinleri kolaylıkla parçalayabilme özelliğine sahiptirler (Allan ve ark., 1995).

1.3.1.3. Stromelisinler

Stromelisin 1 (MMP-3) ve stromelisin 2 (MMP-10)'nin her ikisi de benzer substrat özgüllüğü göstermektedir; ancak, MMP-3'ün daha yüksek bir proteolitik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. MMP-3, ECM bileşenlerini parçalamanın yanı sıra, bir dizi pro-MMP'yi de aktiveleştirmektedir (Visse ve Nagase 2003).

1.3.1.4. Matrilisinler

Matrilisinlerin temel özelliği bir hemopeksin alanının olmamasıdır. Endometaz şeklinde de isimlendirilen matrilisin-1(MMP-7) ve matrilisin-2(MMP-26) bu grubun üyeleridir. MMP-7, ECM bileşenlerinin yanı sıra pro- α -defensin Fas-ligand, TNF- α ve E-cadherin gibi hücre yüzey moleküllerine de etki etmektedir (Visse ve Nagase 2003).

1.3.1.5. Membran tipi MMP'ler

Membran tipi MMP (MT-MMP)'ler altı üyeden oluşmaktadır. Bunların dört tanesi tip 1 transmembran protein olup MMP-14, MMP-15, MMP-16 ve MMP-24 bu grup içerisinde yer alırken kalan iki üye olan MMP-17 ve MMP-25 glikosilfosfatidilinositol (GPI) bağlantılı proteinlerdir. MT4-MMP dışındaki bütün membran tipi MMP'ler pro-MM2'yi aktive edebilmektedir. Ayrıca MT1-MMP tip I, II ve III kollajenler üzerinde kollajenolitik aktiviteye sahiptir (Visse ve Nagase 2003).

1.3.1.6. Diğer MMP'ler

MMP ailesi içerisinde yer alan yedi MMP yukarıdaki sınıflandırılmaya dahil edilememiştir. Metalloestelaz (MMP-12) esas olarak makrofajlarda eksprese edilir ve makrofaj göçü için gereklidir. Elastinin yanı sıra bir dizi proteini parçalayabilmektedir.

MMP-19, karaciğerden cDNA klonlanması yolu ile romatoid artiritli hastalardan T-hücrelerinden türetilmiş bir otoantijen olarak tanımlanmıştır.

Enamelisin (MMP-20) diş minesinin gelişiminde rol oynayan amelogenin proteininin parçalanmasından sorumludur. Kusurlu mine oluşumu ile sonuçlanan genetik bir bozukluk olan Amelogenin imperfecta, MMP-20 bölünme bölgelerindeki mutasyondan kaynaklanmaktadır.

MMP-22 ilk olarak tavuk fibroblastlarında klonlanmıştır ve bir insan homoloğu EST sekansları temelinde tanımlanmıştır.

MMP-23 esas olarak üreme dokularında eksprese edilir ve aynı zamanda sistein dizisi MMP olarak da adlandırılır. MMP-23 hemopeksin benzeri alandan yoksundur. Propeptid kısmında furin tanıma alanına sahip olduğu için golgide bölünmekte ve ekstraselüler hücre boşluğuna aktif bir enzim olarak salınmaktadır (Visse ve Nagase 2003).

1.3.2. Matriks Metalloproteinazlar ve Kanser

Tümör ilerlemesi ve metastazında yer alan patolojik süreçlerle ilgili çalışmalar, matriks metalloproteinazları tümör mikro ortamını şekillendirmede ve kanser ilerlemesini ve metastazını tetiklemede rol oynayan önemli moleküller olarak ortaya çıkarmıştır (Kessenbrock ve ark., 2010; Radisky ve ark., 2007 ; Radisky ve ark., 2010).

MMP enzimleri çok sayıda kanser tipi ve kanser evresi için potansiyel teşhis ve prognoz biyomarkırı olarak kabul edilmektedir (Roy ve ark., 2009). MMP'lerin kanserin terapötik hedefi olmaları fikri, yaklaşık 40 yıl önce, çeşitli kanserlerin metastatik potansiyellerinin, kanser hücrelerinin temel membranı degrade etme yeteneği ile orantılı olduğunun bulunması ile birlikte ortaya çıkmıştır (Liotta ve ark., 1980). Sonraları, çok sayıda MMP inhibitörleri (MMPI) geliştirilmiş ve çeşitli klinik denemeler ile değerlendirilmiştir. Karsinogenezisin gelişimi sırasında, tümör hücreleri, tümör mikroçevresi (ECM, büyüme faktörleri, ECM ile ilişkili sitokinler ve endotel hücreler, fibroblastlar, makrofajlar, adipositler gibi çevredeki hücreler) ile çeşitli etkileşimlerde bulunmaktadır (Murphy, 2008; Deryugina ve ark., 2006). Kanserin, migrasyon, invazyon, metastaz ve anjiogenezis evrelerini kapsayan dört aşaması, kanserin geliştiği bölgenin mikroçevresine bağlıdır. MMP enzimleri, çeşitli hücre adezyon moleküllerini degrade etmek yolu ile, hücre-hücre ve hücre-ECM

etkileşimlerini module ettiklerinden, bu proseslerdeki kritik moleküller olarak kabul edilmektedirler.

Yapılan araştırmalarda, MMP-2 baskılanmış farelerin herhangi bir anormallik olmadan gelişmesine rağmen insan MMP-2'nin aktif enzimatik eksikliğiyle sonuçlanan mutasyonların (Itoh ve ark.,1997), etkilenen kemiklerin yıkıma uğraması nedeni ile nadir bir genetik bozukluk olan osteoliz ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Bu durum, insanlarda MMP-2'nin osteogenez için önemli olduğunu göstermektedir (Martignetti ve ark., 2001).

Düğüm(nod)-negatif meme kanseri olan hastalarla gerçekleştirilen 270 hastanın değerlendirildiği bir klinik çalışmada, immüno histokimyasal yöntemler ile MMP-2 ve -9 boyaması yapılmış ve her iki jelatinazın da öncelikle tümör hücreleri tarafından eksprese edildiği ve her ikisinin de daha kısa nüksüz sağ kalım için prognostik olduğu ifade edilmiştir (Li ve ark., 2004).

Meme kanserinde rol oynayan en kapsamlı MMP'lerden birisi de Jelatinaz B olarak da isimlendirilen MMP-9'dur. Meme kanseri olan 421 hasta ile gerçekleştirilen bir çalışmada, stromal hücrelerde meydana gelen yüksek MMP-9 ekspresyonunun kötü rekürrensiz sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Pellikainen ve ark., 2004). Yine 175 meme kanseri hastası ile gerçekleştirilen bir çalışmada MMP-9 ve MMP-14 ekspresyonları ayrı ayrı değerlendirildiğinde, stromal MMP-9'un relapsız sağ kalım ve genel sağkalım ile önemli ölçüde ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Mylona ve ark., 2007). Ayrıca MMP-9'un çoğunlukla triple negatif olan meme kanserinin bazal benzeri moleküler alt tipindeki tümörlerde daha yüksek oranda eksprese edildiği belirtilmiştir (Mehner ve ark., 2014; Yousef ve ark., 2014)

Rocca ve arkadaşları tarafından yapılan, MMP-2 ve MMP-9'un serum formlarının jelatinolitik düzeylerini zimografik analizlerle incelemek ve verileri mevcut klinikopatolojik verilerle değerlendirmek için yapmış oldukları çalışmada; 80 hastanın serum değerlerinin zimografik analizleri karşılaştırılmış ve sonuç olarak MMP-2 ve MMP-9 proenzim formlarına karşılık gelen keskin belirgin litik bantları sergilediğini göstermiştir. Dansitometrik analizlerde ise, meme kanseri hastalarında dolaşımdaki MMP-2 ve MMP-9'un ortalama aktivite seviyelerinin kontrol

serumlarından ($P<0.0001$), önemli ölçüde yüksek olduğunu gösterdi ve MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinin serum ölçümlerinin meme kanseri hastalarının alt gruplarını ayırt etmede tanınal değere sahip olduğunu ifade etmişlerdir (Rocca ve ark., 2004).

1.4. Doğal Kaynaklı Şeker Alkolleri

Polioller gıda endüstrisinde tatlandırıcılar, lezzet arttırıcılar, nemlendiriciler, koyulaştırıcılar olarak kullanımları ile oldukça tercih edilmektedirler. Hem tatlı tadının olması hem de fiziksel özelliklerinin şekerlere benzemesi ile de düşük kalorili tatlandırıcılar olarak kullanımlarını sağlamıştır. Poliollerin sıklıkla gıda formülasyonlarında kombinasyon olarak kullanımları mevcuttur. Bu bileşiklerin, endüstriyel üretimleri olmakla birlikte çeşitli mikroorganizma türleri, mantar, liken ve yüksek yapılı bitkilerde doğal kaynaklı olarak da üretilmeleri mümkündür. Doğal kaynaklı olarak çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen poliollere baktığımızda ise karşımıza mannitol, sorbitol, eritritol ve ksilitol çıkmaktadır (Rice ve ark., 2019).

Doğal kaynaklı bir şeker alkolü olan mannitolün kullanım alanları ve etkilerini değerlendirdiğimizde çeşitli literatür taramaları ve araştırmalar sonucunda; cerrahide beyin şişmesini azaltmak ve böbrek yetmezliğini tedavi etmek için kullanımı mevcuttur. Bu bileşik antikanser ilaçların beyne girmesine ve beyin tümörlerinin tedavisinde ve ayrıca kan-beyin bariyerini açmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Cancer.gov., 2022).

Glusitol olarak da bilinen sorbitol, altı karbonlu bir şeker alkolüdür ve sebze, meyve, tütün ve deniz yosunu gibi ürünlerde doğal olarak bulunur (Fang ve ark., 2020). Sorbitol önemli bir hammadde olarak ilaç, kimya ve gıda endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sorbitolün ayrıca diürez dehidrasyon özelliğinden dolayı beyin ödemi ve glokomu ve normal kalp fonksiyonunun ödemli oligürisini tedavi etmek için kullanımı mevcuttur. Bir dizi çalışma, sorbitolün p38 MAPK sinyal iletim yolunu aktive edebileceğini ve tümör hücrelerinin apoptozunu indükleyebileceğini göstermiştir. Ayrıca kolorektal kanser hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada sorbitolün, kaspaz-3 ve PARP aktivasyonunun eşlik ettiği apoptotik hücre ölümünü indüklediğini göstermiştir. Bu çalışma ile sorbitolün kolorektal kanser tedavisi için

yeni kemoterapötik ajanların geliştirilmesinde umut verici olabileceği öngörülmüştür (Lu ve ark., 2014).

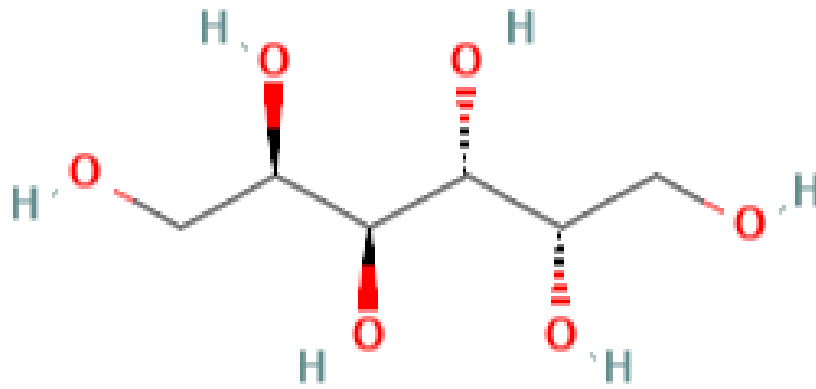
Şeker alkollerinden beş karbonlu bir yapıda olan ksilitol, ilk olarak 20. yüzyılda Finlandiya'daki Huş ağaçlarından elde edilmiştir. Şeker yerine yaygın olarak kullanılmaktadır ve doğal olarak birçok meyve ve sebzenin liflerinde bulunur. Ksilitol, diş çürümelerini önlemek için sakızlarda yapay tatlandırıcı olarak da kullanılmaktadır. Ksilitolün etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada in vivo ve in vitro olarak anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir. Gerçekleştirilen bir çalışmada ksilitolün, MMP-2 hem de MMP-9'un mRNA ifadesini azaltmış olduğu görülmüş ve ayrıca NF- κ B ve Akt sinyal yolunu inhibe ederek anjiyogenezi inhibe ettiği belirlenmiştir (Yi ve Kim 2013). Ksilitol'ün antikanser etkinliğinin değerlendirildiği akciğer kanser hücre hattı A549 ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada; ksilitolün hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve A549 hücrelerinin otofajisini indüklediği ortaya koyulmuştur. Böylelikle ksilitolün, akciğer kanserine karşı tedavi potansiyeline sahip bir bileşik olabileceği tespit edilmiştir (Park ve ark., 2015).

Eritritol (ERT), plazma seviyesi $\sim 9.8 \mu\text{M}$ olan ve tüm insan hücrelerinde glukozdan pentoz fosfat yoluyla endojen olarak üretilen basit bir dört karbonlu şeker alkolüdür. Yapay tatlandırıcı olarak eksojen yolla diyetlerden elde edilebilir. Hidroksil grubu taşıması ile antioksidan özellik gösterirler. Eritritol'ün beyin tümörü hücre hattı üzerine sitotoksik etkisinin incelendiği bir çalışmada; konsantrasyona bağlı olarak eritritol'ün beyin kanseri gelişiminde ve hidrojen peroksit regülasyonunda önemli rol oynadığı belirlenmiştir. ERT normal olarak insan plazmasında bulunduğundan, ERT konsantrasyonunun kontrol edilmesi ERT'ye beyin kanseri tedavisi için terapötik olarak güçlendirici bir ajan hatta prognoz için bir biyobelirteç olarak çalışma olanağı tanınabileceği düşünülmektedir (Nassani ve ark., 2021).

1.4.1. Dulsitol

Dulsitol (galaktitol), galaktozun metabolik olarak aldoz redüktaz ile katalizasyonu sonucu oluşan, Asya tıbbında geniş ölçüde kullanılan *enanymus alatus* adı verilen bir bitkiden elde edilebilen, doğal organik bir şeker alkolü olan heksitoldür (Lin ve ark., 2020).

Dulsitol'ün IUPAC isimlendirilmesi (2 *r*,3 *s*,4 *r*,5 *s*) -heksan-1,2,3,4,5,6-heksol'dür. Galaktitol olarak da isimlendirilmektedir. Moleküler ağırlığı 182,17 g/mol'dür. Dulsitol hafif tatlı bir tada sahiptir ve beyaz kristal toz görünümündedir (Pubchem, 2023).



Şekil 1.7. Dulsitol'ün moleküler yapısı (Pubchem, 2023).

Yapılan bu tez çalışmasında, doğal kaynaklı bir şeker alkolü olan dulsitolün, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde antiproliferatif, apoptotik ve antimetastatik etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Maddeler

- Dulcitol: Sigma Aldrich, ABD
- DMSO: Sigma Aldrich, ABD
- Dulbecco's Modified Eagle Medium: Biowest, ABD
- Bovin Serum Albumin: Biowest, ABD
- Glutamin-L-glutamin Solüsyonu: Biowest, ABD
- Fetal Bovin Serum: Biowest, ABD
- Tripsin-EDTA: Biowest, ABD
- MCF-7: American Type Culture Collection®, Almanya
- MCF-10A : American Type Culture Collection®, Almanya
- MDA-MB-231: American Type Culture Collection®, Almanya
- MTT: Sigma Aldrich, ABD
- Annexin V kit: Merck Milipore, Almanya

2.2. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Gereçleri

- CO2 İnkübatörü: Thermo Scientific, ABD
- Laminar akımlı kabin: Esco Class II, ABD
- Santrifüj: Beckman Coulter, ABD
- Mikroskop: Leica DM IL, Almanya
- Mikropipet (1000, 200, 100, 10 µL): Mettler Toledo, ABD
- Muse® Cell Analyzer: Merck Milipore, Almanya
- Terazî: Uni bloc Shimadzu, Japonya
- Hücre sayım cihazı: Biorad TC20, ABD
- Spektrofotometre cihazı: Thermo Scientific, MultiScan Go, Almanya

2.3. Hücre Kültürü

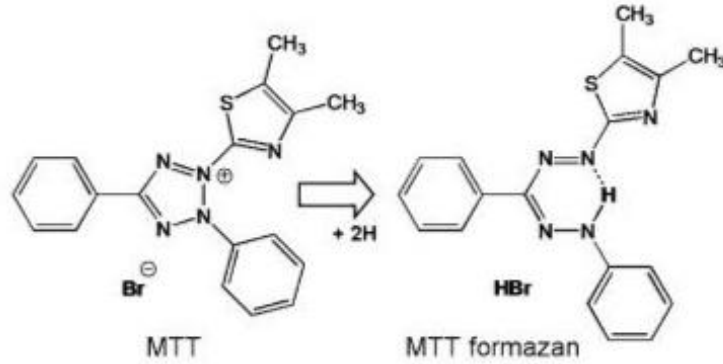
Dulsitol'un meme kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi açısından American Type Culture Collection®'dan temin edilen insan meme kanseri hücre hatları olan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları kullanıldı. Ayrıca dulsitolün sitotoksik etkinliği, insan meme epitel hücreleri olan MCF-10A hücreleri üzerinde de değerlendirildi.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri nemlendirilmiş 37°C'de %5 CO₂ salınım şartlarını sağlayan inkübatör ortamında, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 glutamin içeren DMEM besiyerinde kültüre edildi.

MCF-10A hücre hattı ise nemlendirilmiş 37°C'de %5 CO₂ salınım şartlarını sağlayan inkübatör ortamında, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, insülin, hidrokortizon, insan epidermal büyüme faktörü ve %1 glutamin içeren DMEM-F12 besiyerinde kültüre edilmiştir. Hücrelerin besiyeri, 3 günde bir taze besiyeri ile değiştirildi ve 6-7 günde bir pasajlama çalışmaları yapıldı.

2.4. Hücre Canlılık Testi

Hücre canlılığını değerlendirmek için MTT yöntemi kullanıldı. MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid), hücre içerisinde enzimlerin etkinliğini değerlendirmek için kullanılan bir kolorimetrik yöntemdir. Bu yöntemde tetrazolyum boyası indirgenerek mor renkli suda çözünmeyen formazan bileşiğini oluşturmaktadır. Daha sonra suda çözünmeyen mor formazan bileşiğini çözmek üzere (dimetil sülfoksit, asitlendirilmiş bir etil alkol çözeltisi ya da seyreltilmiş hidroklorik asit içinde deterjan sodyum dodesil sülfat çözeltisi) çözücü olarak eklenir. Oluşan renkli çözelti ürünün absorbansı spektrofotometrede 500-600 nm'de ölçümü gerçekleştirilir. Maksimum absorbans çözücünün bileşiği çözme kapasitesine bağlı olarak değişmektedir (Mosmann 1983).



Şekil 2.1. MTT reaksiyonu (Stockert ve ark., 2012)

Hücre canlılığını değerlendirmek amacıyla MTT testi MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında uygulandı.

Hücre canlılığının belirlenmesinin tayininde önceden pasajlanan MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri 96'lık plaklara 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Daha sonra dulsitolün 1, 2,5, 5, 7,5, 10 ve 15mM konsantrasyonları, kontrol grubu için DMEM de dahil olmak üzere 20 μ l/kuyucuk olacak şekilde dörder tekrarlı uygulandı ve 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda MTT ajanı gerekli miktar tartılıp besi yerinde çözöldü ve 20 μ l /kuyucuk olacak şekilde eklenerek 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında meydana gelen formazan kristalleri 100 μ l saf DMSO ilave edilerek çözöldü ve spektrofotometre cihazında 540 nm'de ölçüm yapıldı.

2.5. Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsü analizi çalışmaları kapsamında, Muse Cell Cycle Assay Kit kullanıldı. Bu kit ile, hücrelerin G0/G1, S ve G2/M faz dağılımları tanımlanmıştır.

MDA-MB-231 hücreleri, plaklara ekildi ve 5, 7,5, 10 ve 15 mM dulsitol uygulandı. İnkübasyonun ardından, tripsin ile muamele edilen plaktaki hücreler (200 μ l) eppendorf tüplere alındı ve 300 x g'de 5 dk santrifüjlendi. PBS ile yıkanan hücreler üzerine buzda soğutulmuş %70 etanol ilave edildi. 3 saat -20 °C'de inkübasyon yapıldı. İnkübasyonun ardından hücreler yeniden 5 dk 300xg'de santrifüj edildi ve

PBS ile yıkandı. Tüplere 200 µl Muse Cell Cycle reagent eklendi ve 30 dk karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Ardından hücre analiz cihazında ölçüm işlemi yapıldı. Cihazda G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki hücre popülasyonu yüzdesel olarak elde edildi. Elde edilen hücre popülasyonları grafiğe geçirilmek ve istatistik programında analiz edilmek suretiyle değerlendirilerek veriler elde edildi.

2.6. Apoptotik Etkinin Tayini

Apoptotik etkinin belirlenmesi için MDA-MB-231 hücrelerine Annexin V bağlanma analizi uygulandı. Apoptotik hücre popülasyonunu değerlendirmek amacıyla akım sitometri prensibi ile analiz yapan Muse cihazı kullanılarak analiz yapıldı.

2.6.1. Annexin V Bağlanması

Dulsitol'un meme kanseri hücrelerindeki apoptotik etkinliği akım sitometri tekniği ile Annexin V-FITC apoptoz belirleme kiti kullanılarak değerlendirildi. İzlenen deney protokolü şu şekildedir: 96 kuyucuklu plaklarda kültüre edilen hücre serileri (2×10^6 ml/kuyucuk), 5, 7,5, 10, ve 15 mM dulsitol uygulandı ve 24 saat inkübe edildi. PBS ile muamele edilen hücreler, FITC-bağlı Annexin V ve propidium iyodür (PI) ile üretici firmanın talimatlarına göre boyandı. Hücreler, ışısız ortamada 25°C'de 15 dk beklemeye bırakıldı. Örnek başına minimum 2.000 hücre Muse Cell Analyzer cihazı ile tespit edildi ve floresan yoğunlukları belirlendi.

2.6.2. Floresan Görüntüleme

Annexin V bağlanma analizi ile nicel olarak saptanan apoptotik hücre popülasyonu, floresan boyama yöntemi ile de gösterildi. Bu kapsamda, Annexin V-FITC floresan mikroskop kiti kullanıldı.

MDA-MB-231 hücreleri slaytlar içine ekildi ve 5, 7,5, 10 ve 15 mM dulsitol uygulandı. 24 saat inkübasyonun ardından hücreler 1x PBS ile ve ardından Annexin V-FITC bağlama solusyonu ile yıkandı. Sonrasında, 1:10 dilue edilmiş Annexin V-FITC ile oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Tekrar hücreler 1x bağlama solusyonu ile yıkandı ve floresan mikroskop altında görüntü kaydedildi.

2.6.3. Kaspaz Enzim Düzeylerinin Tayini

Kaspazlar (sisteinil-aracılı aspartate spesifik proteazlar), proapoptotik sinyallere yanıt olarak programlı hücre ölümünün (apoptozun) gerçekleşmesinde merkezi rol oynayan sistein proteaz enzimleridir.

Tez çalışmasında sentezlenmesi planlanan formülasyonların hücre hatlarında, çeşitli kaspaz düzeyleri üzerindeki etkilerinin ölçülmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, kaspaz düzeyleri, Muse Multicaspase Assay Kit kullanılarak tayin edilmiştir.

İzlenen protokol valide kitin kullanıcı talimatlarına göre şu şekildedir: Hücreler, pozitif ve negative kontroller, 5, 7,5, 10, ve 15 mM dulsitol ile 24 saat inkübe edildi. Kuyucuklardan alınan hücreler, kaspaz tampon ile karıştırıldı ve 50 µl hücre üzerine, 5 µl kaspaz çalışma solusyonu eklendi. Tüpler, 37 °C’de 30 dk inkübe edildi. 150 µl 7-AAD çözeltisi eklendi ve karıştırılarak Muse hücre analiz cihazında ölçüm yapıldı. Ölçüm sonucunda, hücrelerdeki kaspaz aktivitesi ve ölü hücre miktarı değerleri elde edildi.

2.6.4. Mitokondriyal Potansiyel Değişikliklerinin Tayini

Mitokondriyal potansiyelin ölçülmesi apoptozun belirlenmesinde önemli bir basamaktır. Bu amaçla, Muse Mitopotential Assay kit kullanılmıştır. Böylece, hem mitokondriyal potansiyeldeki değişiklikler hem de hücrel plazma membran geçirgenliği değerlendirilmiştir.

İzlenen protokol valide kitin kullanıcı talimatlarına göre şu şekildedir: Hücreler, pozitif ve negative kontroller, mitokondriyal membran depolarizasyonunun uyarılması için 24 saat 5, 7,5, 10, ve 15 mM dulsitol ile inkübe edildi. Kuyucuklardan alınan hücreler 1:1 oranında assay tampon ile dilue edildi. Her tüpe, 95 µl Mitopotential çalışma solusyonu eklendi. Tüp içeriğinin 100 µl’si ayrı tüplere aktarıldı ve 20 dk 37 °C’de inkübe edildikten sonra 5 µl 7-Aminoaktinomisin (7-AAD) solusyonu eklendi. 5 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapıldıktan sonra Muse hücre analizör cihazında ölçüm yapıldı. Elde edilen kantitatif veriler (% ve konsantrasyonlar) dört farklı hücre popülasyonuna ait değerleri yansıtmaktadır: canlı, depolarize, depolarize/ölü, ölü hücreler.

2.7. DNA Hasarının Saptanması

DNA hasarına neden olan sinyal yollarının saptanması kanser araştırmalarında önemli bir yer tutmaktadır. Memeli hücrelerinde, DNA hasarına yanıt olarak, hücre döngüsü arresti, ya da apoptoz gibi önemli sinyal yolları etkilenmektedir. Çift iplikli DNA kırıklarına yanıt olarak, aktive olan temel kinaz, IP3K ile ilişkili Ser/Tre protein kinaz ailesinin bir üyesi olan ATM (Ataxiatelangiectasia mutated kinase)'dir. DNA hasarının gerçekleşmesi durumunda aktive olan ATM, DNA hasarının önemli bir indikatörü olan H2A.X adlı histon varyantını fosforillemektedir. Bu yöntem ile Multi Color DNA damage kit kullanılarak DNA hasarı flow sitometrik olarak analiz edilmiştir.

İzlenen protokol valide kitin kullanıcı talimatlarına göre řu şekildedir: Analiz için 5, 7,5, 10, ve 15 mM dulsitol ile 24 saat muamele edilen hücreler, 300xg'de 5 dk santrifüj edildi ve fiksasyon tampon ile 10 dk fikse edildikten sonra PBS ile yıkandı. Hücreler buz üzerinde 10 dk boyunca permeabilize edildikten sonra, 90 µl, 1X assay tampon ile hazırlanmış antikor kokteyli eklendi ve 30 dk karanlıkta bekletildi. 300xg'de 5 dk santrifüj ve yıkama işleminin ardından, 200 µl 1X assay tampon ile suspanse edilen hücreler, flow sitometri tabanlı muse cell analyzer cihazında analiz edildi. Analiz ile, ATM aktivasyonu, H2A.X aktivasyonu, DNA çift zincir kırıkları ve hasar oluşmamış hücre popülasyonu saptandı.

2.8. MMP-2/-9 mRNA Ekspresyon Düzeyinin Saptanması

Dulsitol'ün MMP2/9 sinyal yolağı üzerinden antimetastatik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır. Söz konusu etkinin çok yönlü olarak araştırılabilmesi amacı ile, hem MMP ile ilişkili olduğu bilinen apoptotik etkinin, hem de MMP2/9 gen ekspresyonu çalışmaları yapılmıştır.

Gen ekspresyonu için kullanılan primer dizileri:

MMP-2 forward 5'-CATGTCGCCCCCTAAAACAGA-3';

MMP-2-reverse, 5'-CCATCAAACGGGTATCCATC-3';

MMP-9 forward 5'-CCTGGAGACCTGAGAACCAATCT-3';

MMP-2-reverse, 5'-CCACCCGAGTGTAACCATAGC-3'

GAPDH-forward, 5'-CCCATCACCATCTTCCAG-3';

GAPDH-reverse, 5'-CAGTCTTCTGGGTGGCAGT-3'.

2.8.1. RNA İzolasyon Protokolü

RNeasy Plus Mini Kit kullanılmıştır. RNA izolasyon protokolü şu şekilde uygulanmıştır; 1,5ml lik ependorf tüplere 1ml Cell Lysis Buffer eklendi. Üzerine 500 µl hücre örneği eklendi ve pipetle karıştırıldı. 10 dk oda sıcaklığında otomatik çalkalayıcı üzerinde çalkalandı. 5 dk 500x g de santrifüj yapıldı. Supernatant kısmı pipetle uzaklaştırıldı ve üzerine 1ml Cell Lysis Buffer eklendi. Pellet kalkması için pipetleme yapıldı. 3 dk 500x g de santrifüj yapıldı. Daha sonra supernatant uzaklaştırıldı ve 200 µl PBS eklendi. Pellet hafifçe vurarak süspanse edildi. 400 µl Lysis/-Binding Buffer (yeşil kapak) eklendi ve 15sn vortekslendi. Örnek sayısı kadar toplama ve filtreli tüpler çıkarıldı, filtreli tüpler toplama tüplerine geçirildi. Tüm karışım filtreli tüplere aktarıldı. (700 µl) 15sn 8000 x g de santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı döküldü ve filtreli tüp tekrar aynı toplama tüpüne geçirildi. Aynı bir 1,5ml lik eppendorfa her örnek için 90 µl DNase Incubation Buffer (beyaz kapak) ve 10 µl DNase eklendi ve pipetle karıştırıldı. Ve her tüpe 100 µl dağıtıldı. 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Her tüpe 500µl yıkama tamponu eklendi ve 15sn 8000x g de santrifüj yapıldı. Toplama tüpü döküldü ve filtreli tüp aynı toplama tüpüne geçirildi. Her tüpe 500 µl yıkama tamponu eklendi ve 15 sn 8000xg de santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı döküldü ve filtreli tüpe geçirildi. Her tüpe 200 µl yıkama tamponu eklendi ve 2dk max hızda (13000xg de) santrifuj yapıldı. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler 1.5ml'lik steril ependorflara alındı. Her tüpe 50 µl elüsyon tamponu eklendi. 1dk 8000xg de santrifüj yapıldı. Filtreli tüpler atıldı. Ependorf tüpte RNA elde edildi. Bu şekilde -80 °C'de saklanabilir. İzolasyonun ardından RNA konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanslarının ölçülmesiyle belirlendi. İzole edilen RNA'ların saflığı 260 nm ve 280

nm'deki absorbanslarının oranı ile kontrol edildi, ideal saflıktaki kaliteli RNA'nın A260/A280 absorbans oranının 1,8-2,0 olması beklendi.

2.8.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. Her örnek için RNA+H₂O'dan 11 µl konuldu ve 2 µl Random hexamer primer (vial 6) eklendi. Tüpler thermalcycler a yerleştirildi. 65 °C' de 10 dk RNA lar denatüre edildi.

Bu arada mastermix hazırlandı. (Bu miktarlar örnek sayısı ile çarpılarak hazırlandı). Tek reaksiyon için hazırlanacak karışım için; Reaction Buffer (vial 2) 4µl, Protector RNase Inhibitor (vial 3) 0,5 µl, Deoxynucleotide Mix (vial 4) 2 µl, Transcriptor Reverse Transcriptase (vial 1) 0,5 µl hacimlerde konuldu ve her bir örnek için toplam 7 µl karışım elde edildi. Daha sonra thermalcycler'dan alınan örnekler soğutma kabına yerleştirildi. Her tüpe 7 µl hazırlanan karışımdan dağıtıldı ve pipetle 3-4 kez karıştırıldı. Tüpler thermal cyclers a yerleştirildi ve program çalıştırıldı.

2.8.3. Real-Time PCR Aşaması

Elde edilen cDNA 'lar, 96 lık plakaya daha önceden yerleştirilmiş olan spesifik primer ve problemler ile reaksiyona girerek amaçlanan RNA ekspresyon seviyesini belirlemede kullanıldı. RealTime Ready panel plakalar RNA kalitesini kontrol etmek için 3 tane RT pozitif ve 2 tane RT Negatif kontrol kullanıldı. RT pozitif kontroller reverse transkripsiyon aşamasının kalitesini, RT Negatif kontroller ise RNA'da genomik DNA kalıntısının olup olmadığını kontrol etmek için kullanıldı. Tek bir cDNA örneği için birçok gen ekspresyonunun bakılabildiği RealTime Ready panel plakalarda gerçekleştirilecek çalışma için reaksiyon başına cDNA ile birlikte final hacmi 25 µl olacak şekilde, bir kuyucuk için reaksiyon karışımına şu maddeler; ddH₂O 6.5 µl, Sybr Green Rox Fast Master Mix 12.5 µl, Primer 1 µl, cDNA, 5 µl/well eklendi ve karışım oluşturuldu.

Hazırlanan bu karışım dikkatle pipetlendi. Hiçbir şekilde vorteks yapılmadı. Elde edilen cDNA, konsantrasyonu 5ng-5 µg/plate olacak şekilde en az 480 µl'ye sulandırıldı. Dilüe edilmiş cDNA örneği RNA negatif kontrol olan H12 kuyucuğu

hariç tüm kuyucuklara 5'er ul dağıtıldı. H12 kuyucuğuna negatif kontrol olarak 5 µl RNA eklendi. Plaka sealing foil ile kapatıldı ve kuyucukların kenarına yapışmış olabilecek damlacıkların inmesi için 1500g'de 2 dakika santrifüj edildi. RealTime Ready panelin çalışabilmesi için gerekli olan PCR koşulları aşağıda belirtilmiştir.

Denaturasyon 1 döngü, 95°C 10 dakika, Amlifikasyon 45 döngü, 95°C 10 saniye, 60°C 30 saniye, 72°C 1 saniye, Cooling 1 döngü, 40°C 30 saniye Her 720°C de single floresan okuma yapıldı.

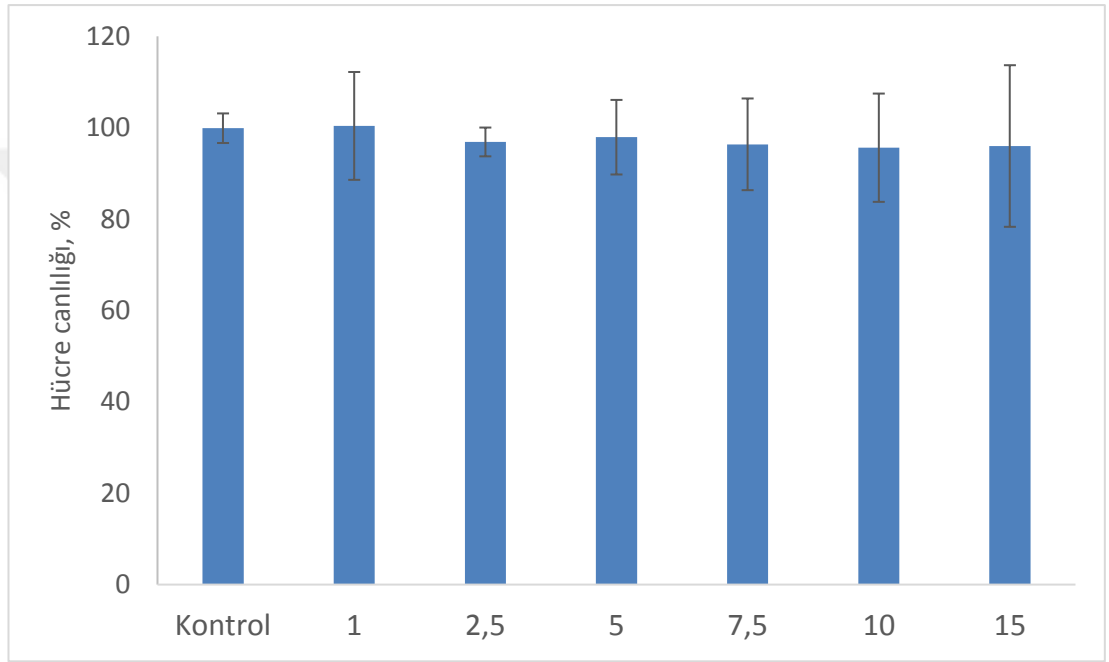
2.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz, GraphPad Prism 6.0 sürümü kullanılarak yapılmıştır. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir ve çoklu karşılaştırmalar için One-way ANOVA testi uygulanmıştır.

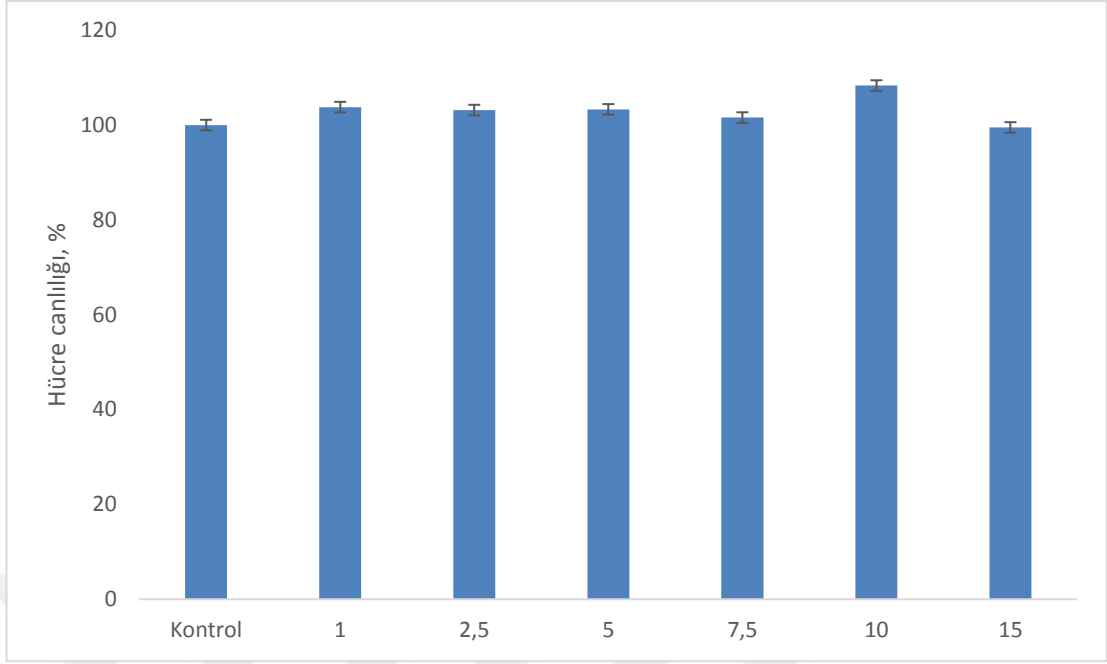
3. BULGULAR

3.1. Hücre Canlılığı Analizi Bulguları

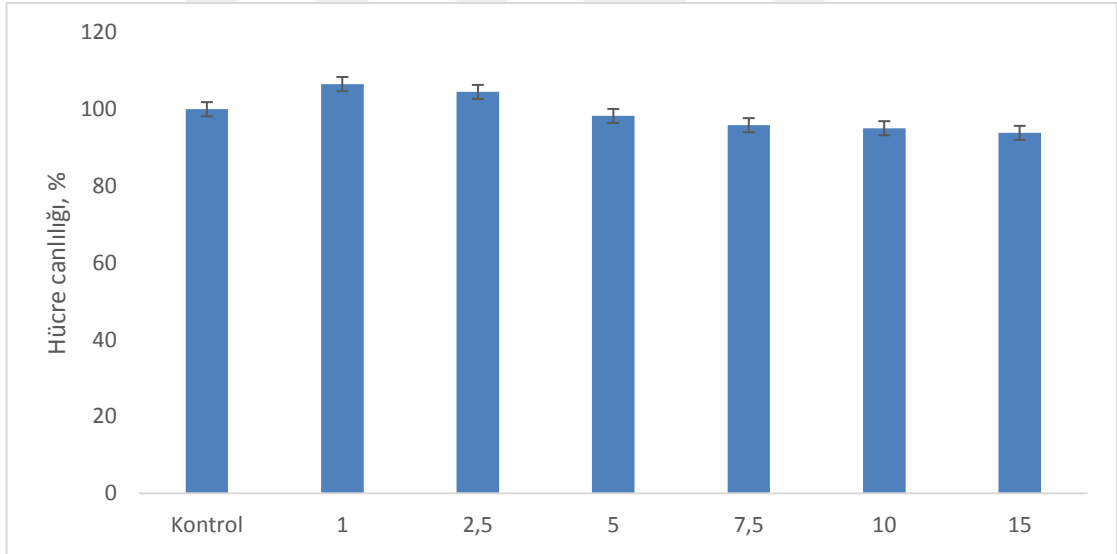
Dulsitol'ün 1, 2,5, 5, 7,5, 10 ve 15 mM konsantrasyonlarında MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri üzerine sitotoksik etkisi 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il),2,5-difeniltetrazolium bromür (MTT) testi ile saptanmıştır.



Şekil 3.1. Dulsitol uygulanan MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi (24. saat). Hücre popülasyonu (%) canlılık ortalama± standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.



Şekil 3.2. Dulcitol uygulanan MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi (48. saat). Hücre popülasyonu (%) canlılık ortalama± standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.

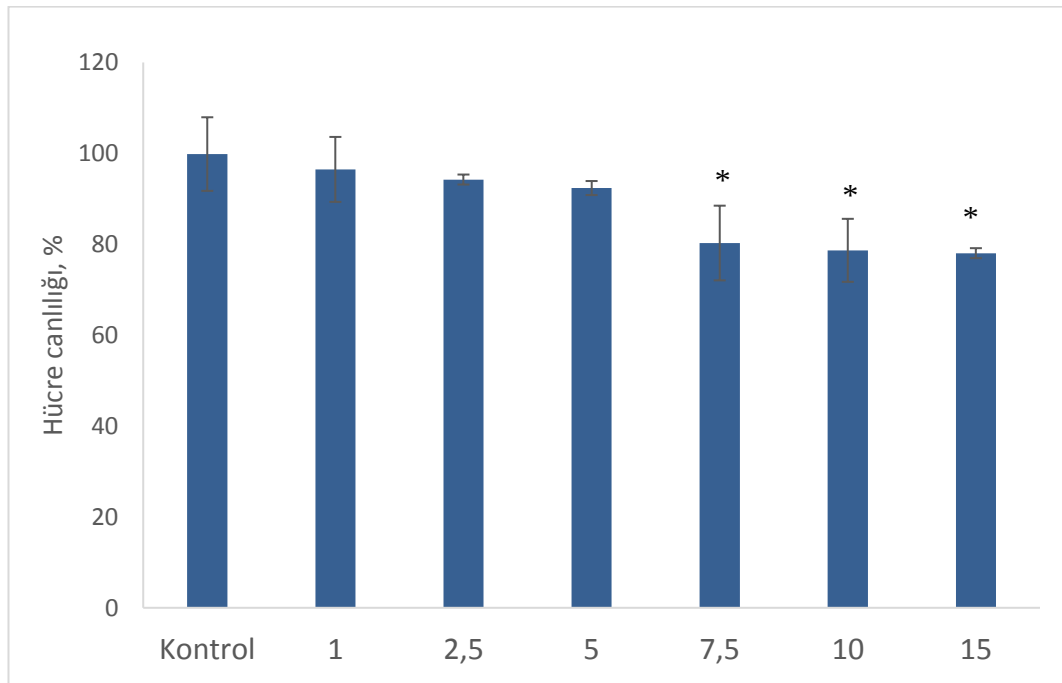


Şekil 3.3. Dulcitol uygulanan MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi (72. saat). Hücre popülasyonu (%) canlılık ortalama± standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.

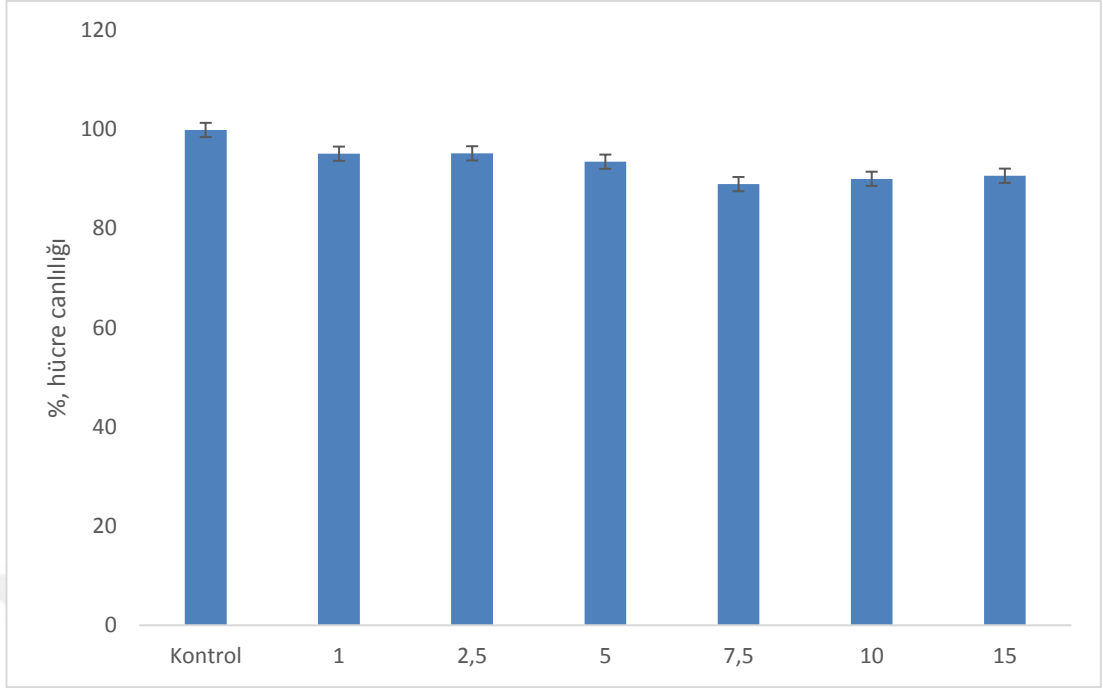
Çizelge 3.1. Dulsitol uygulanan MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığı analiz sonuçları. Hücre popülasyonu (%) canlılık ortalama± standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.

Konsantrasyon	Hücre Canlılığı (%)		
	24.saat	48.saat	72.saat
Kontrol	99,89±3,24	100±5,69	100±9,61
1 mM	100,39±11,81	103,78±6,52	106,54±8,22
2,5 mM	96,88±3,15	103,16±7,89	104,49±7,27
5 mM	97,92±8,16	103,30±11,79	98,24±8,83
7,5 mM	96,36±10,04	101,58±6,46	95,83±2,49
10 mM	95,62±11,85	108,33±4,06	95,05±4,91
15 mM	95,99±17,69	99,50±13,51	93,83±7,68

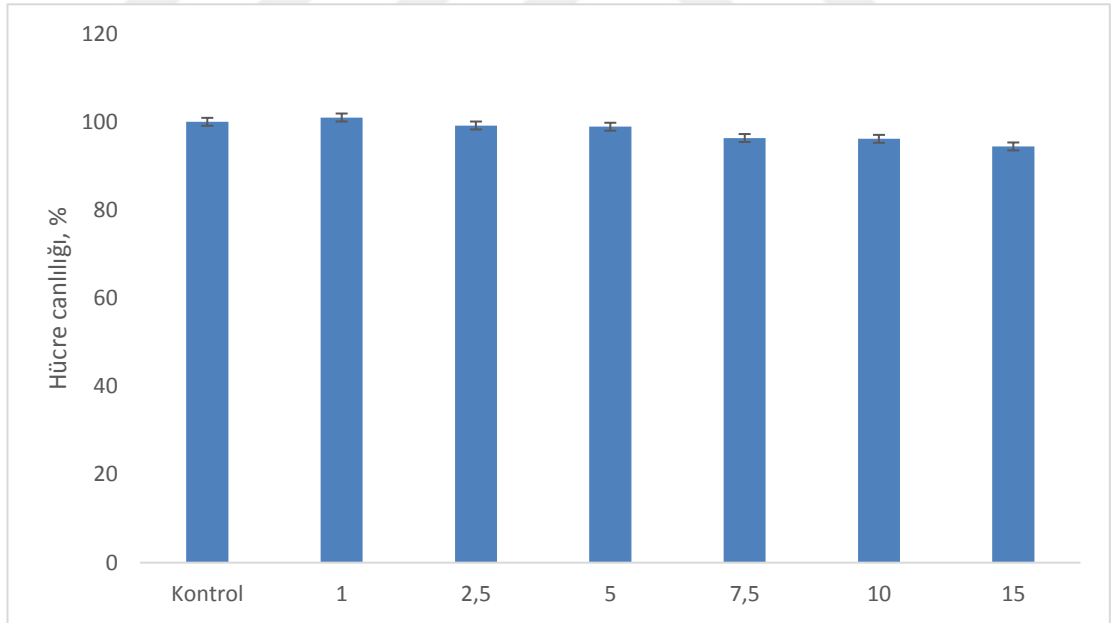
MCF-7 hücrelerinde dulsitol uygulaması sonrasında elde edilen canlılık değerlerinde anlamlı bir değişme saptanmamış olup, bu değerler (%) canlılık ortalama± standart sapma şeklinde, Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3’de gösterilmiş ve Çizelge 3.1’de ifade edilmiştir. Tez çalışması kapsamında çalışılan konsantrasyonlarda hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir değişim olmaması nedeni ile MCF-7 hücreleri için apoptotik etkinin değerlendirildiği ileri çalışmalar gerçekleştirilmemiştir.



Şekil 3.4. Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi (24. saat). Hücre popülasyonu (%) canlılık ortalama± standart sapma şeklinde ifade edilmiştir,* p<0.05, kontrole göre anlamlılık.



Şekil 3.5. Dulcitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi (48. saat). Hücre popülasyonu (%) canlılık ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.

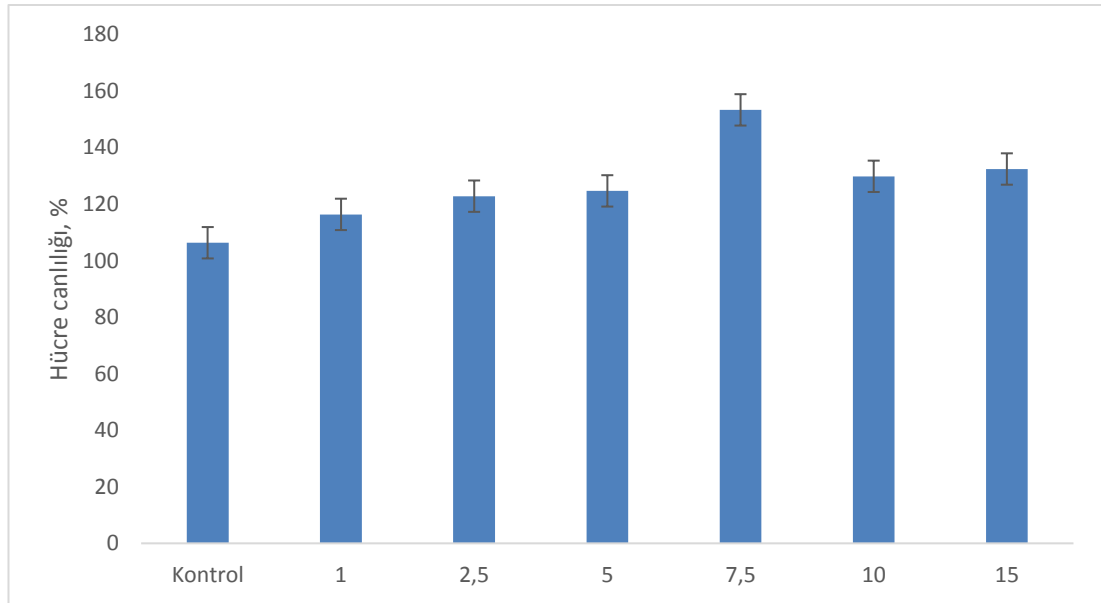


Şekil 3.6. Dulcitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi (72. saat). Hücre popülasyonu (%) canlılık ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.

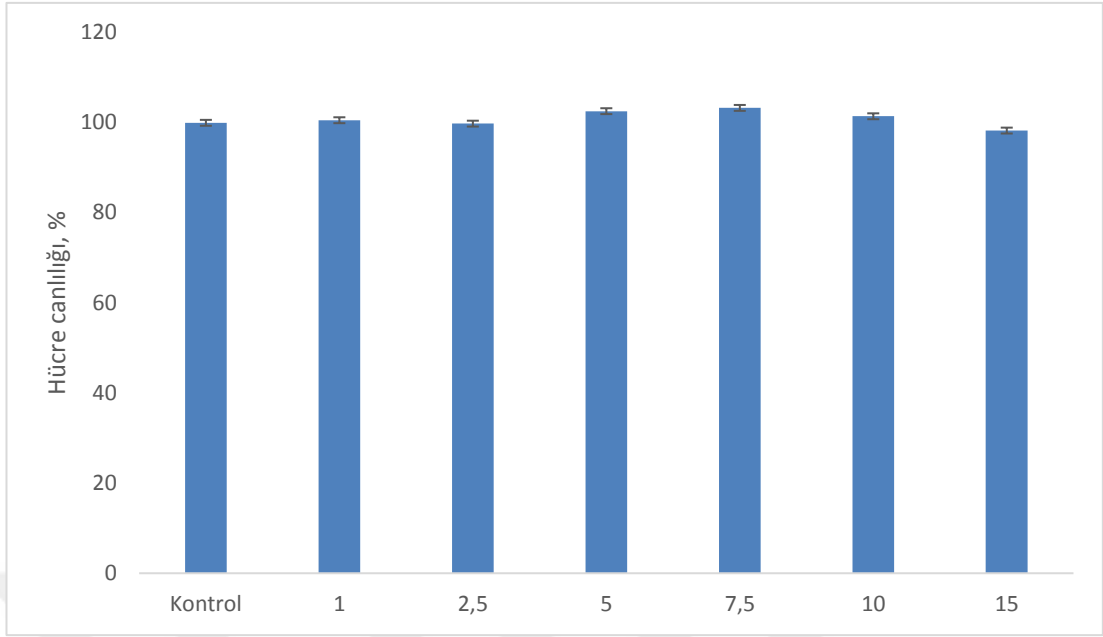
Çizelge 3.2. Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığı analiz sonuçları. Hücre popülasyonu (%) canlılık ortalama± standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.

Konsantrasyon	Hücre Canlılığı (%)		
	24.saat	48.saat	72.saat
Kontrol	99,84 ± 8,10	99,89 ± 9,50	100 ± 5,15
1 mM	96,47 ± 7,15	95,10 ± 1,73	100,98 ± 6,32
2,5 mM	94,24 ± 1,10	95,17 ± 4,55	99,16 ± 2,37
5 mM	92,37 ± 1,54	93,49 ± 10,26	98,88 ± 12,26
7,5 mM	80,27 ± 8,22	88,97 ± 0	96,32 ± 1,43
10 mM	78,66 ± 6,93	90,04 ± 1,86	96,14 ± 6,37
15 mM	78,04 ± 1,10	90,65 ± 7,01	94,41 ± 0,20

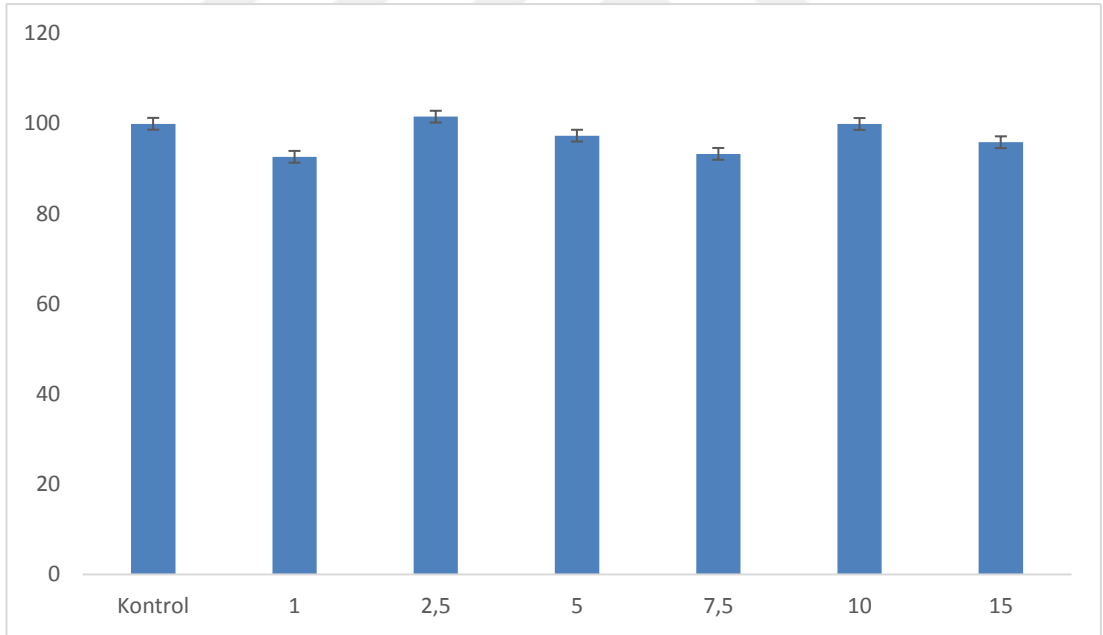
MDA-MB-231 hücrelerinde ise dulsitolün 7,5 mM ve üzeri konsantrasyonlarında 24. saatte anlamlı sitotoksik etki gözlenmiş olup bu değerler (%) canlılık ortalama± standart sapma şeklinde, Şekil 3.4’de gösterilmiş ve Çizelge 3.2’de ifade edilmiştir. Buna göre; MDA-MB-231 hücrelerinde dulsitolün, 7,5 mM’daki hücre canlılığı (%) 80,27 ± 8,22 olduğu, 10 mM’daki hücre canlılığı (%) 78,66 ± 6,93 olduğu ve 15 mM’daki hücre canlılığı ise (%) 78,04 ± 1,10 şeklinde olduğu saptanmıştır.



Şekil 3.7. Dulsitol uygulanan MCF-10A hücrelerinde hücre canlılığına etkisi (24. saat). Hücre popülasyonu (%) canlılık ortalama± standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.



Şekil 3.8. Dulcitol uygulanan MCF-10A hücrelerinde hücre canlılığına etkisi (48. saat). Hücre popülasyonu (%) canlılık ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.



Şekil 3.9. Dulcitol uygulanan MCF-10A hücrelerinde hücre canlılığına etkisi (72. Saat). Hücre popülasyonu (%) canlılık ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

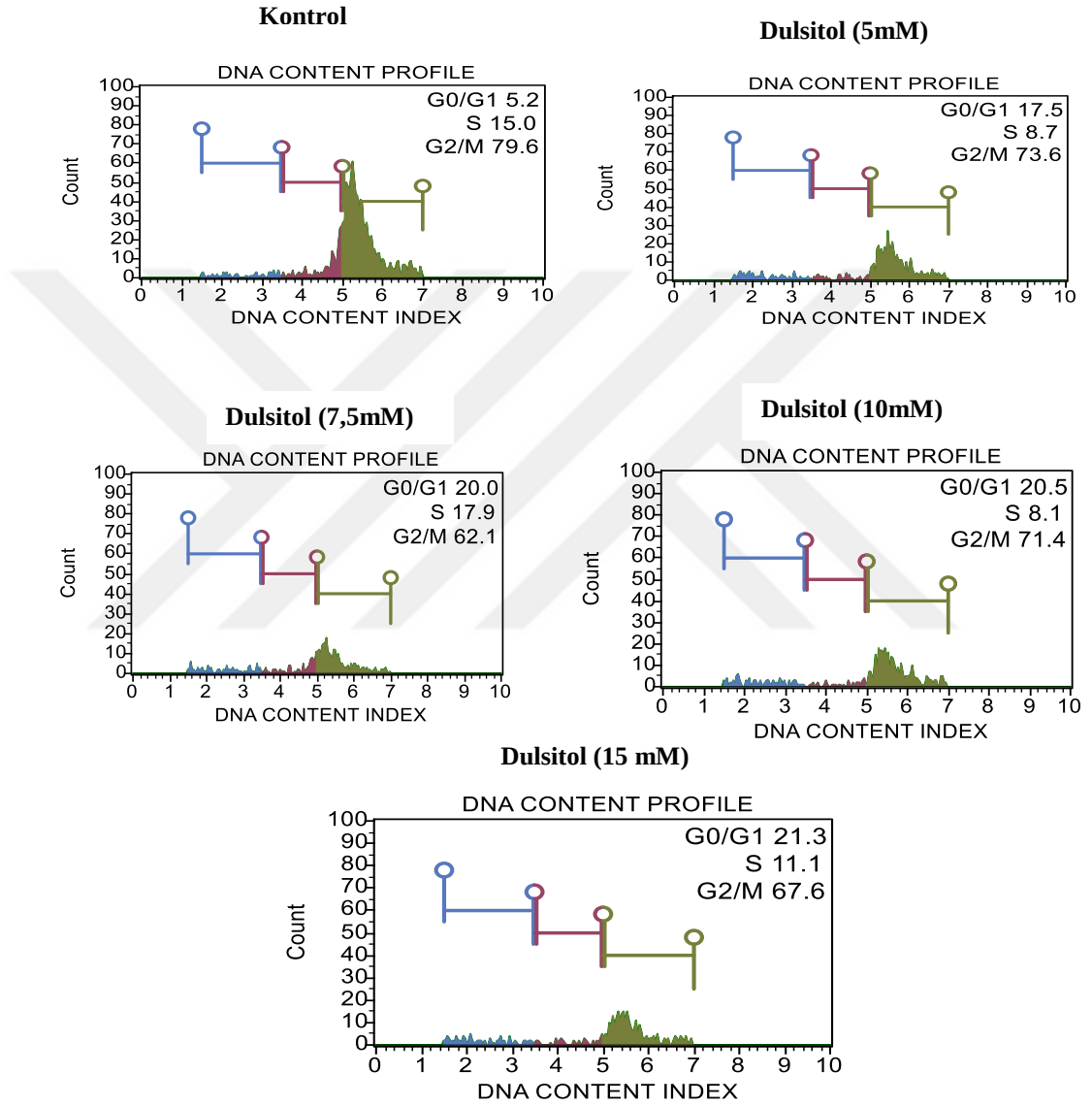
Çizelge 3.3. Dulsitol uygulanan MCF-10A hücrelerinde hücre canlılığı analiz sonuçları. Hücre popülasyonu (%) canlılık ortalama± standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.

Konsantrasyon	Hücre Canlılığı (%)		
	24.saat	48.saat	72.saat
Kontrol	106,30 ± 16,88	99,91 ± 15,51	99,96 ± 13,30
1mM	116,33 ± 5,07	100,48 ± 4,53	92,63 ± 2,26
2,5mM	122,78 ± 29,25	99,73 ± 8,84	101,53 ± 6,73
5mM	124,64 ± 17,42	102,49 ± 16,83	97,32 ± 11,28
7,5mM	153,30 ± 38,29	103,22 ± 19,73	93,28 ± 7,10
10mM	129,80 ± 31,00	101,36 ± 4,47	99,91 ± 2,04
15mM	132,38 ± 15,60	98,19 ± 7,43	95,86 ± 14,44

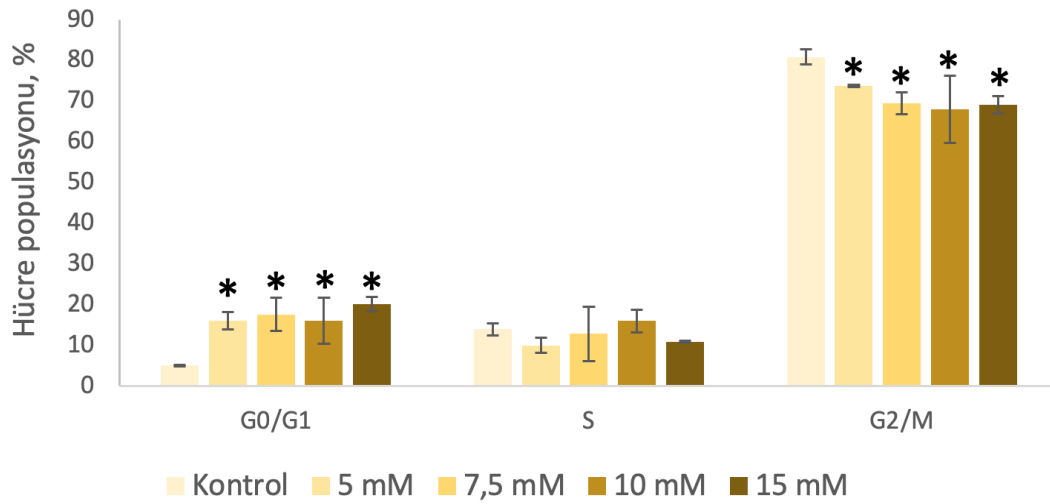
MCF-10A hücrelerinde dulsitolün 1, 2,5, 5, 7,5, 10 ve 15 mM konsantrasyonları 24, 48 ve 72. saat muamele edilmiş ve hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiş olup, bu değerler (%) canlılık ortalama ± standart sapma şeklinde, Şekil 3.7, Şekil 3.8 ve Şekil 3.9’de gösterilmiş ve Çizelge 3.3’de ifade edilmiştir.

3.2. Hücre Döngüsü Analiz Bulguları

Dulsitol'un hücre döngüsü üzerindeki etkisi Muse Cell Cycle Kit (Millipore, Almanya) aracılığıyla belirlenmiştir. MDA-MB-231 hücreleri 5, 7,5, 10 ve 15 mM dulsitol ile muamele edilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir.



Şekil 3.10. Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsü analizine ait plot görüntüleri.



Şekil 3.11. Dulcitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsü analiz bulguları. G0/G1, S ve G2/M evelerindeki hücre popülasyonu (%) ortalama±standart sapma şeklinde ifade edilmiştir, * p<0.05, kontrole göre anlamlılık.

Çizelge 3.4. Dulcitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsü analizine ait % hücre popülasyon değerleri.

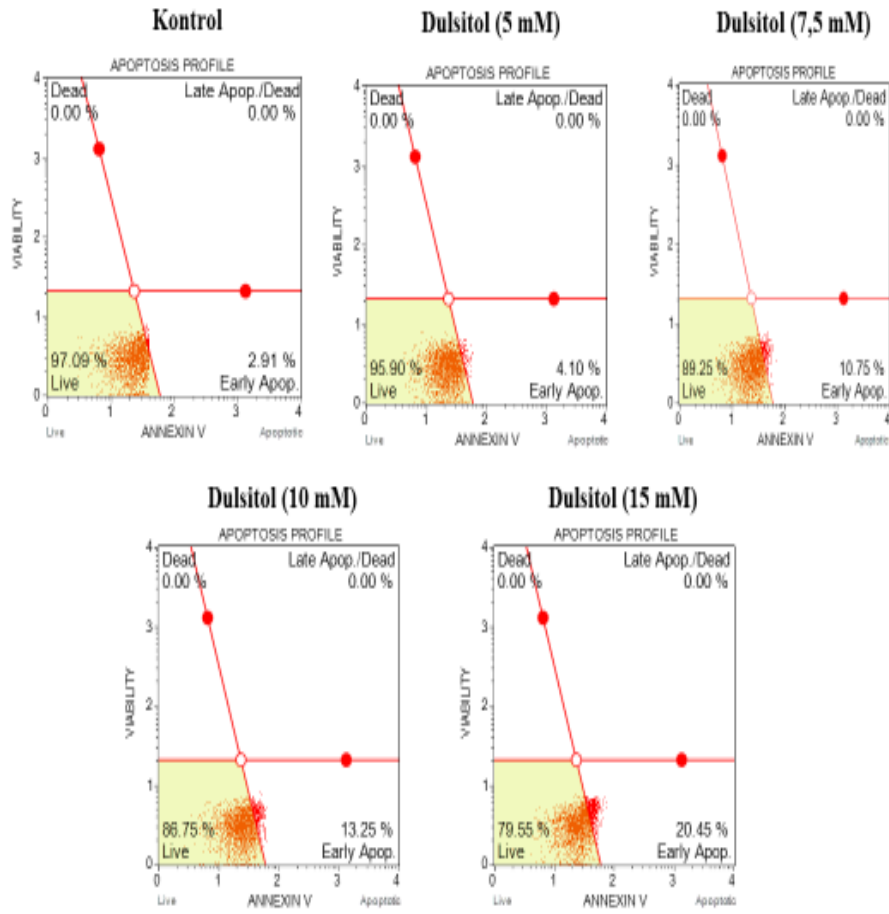
Hücre popülasyonu (%)			
	G0/G1	S	G2/M
Kontrol	5,05 ±0,21	13,95±1,48	80,9±1,84
5 mM	16,05 ±2,05	10±1,84	73,8±0,28
7,5 mM	17,6 ±4,10	12,85±6,72	69,5±2,69
10 mM	16,05 ±5,59	15,95±2,76	68±8,34
15 mM	20,05 ±1,77	10,85±0,35	69,1±2,12

MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsü analizlerinde G0/G1 fazında, kontrol grubu hücre popülasyonu (%) 5,05 ±0,21 olduğu saptanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla dulcitolün 5, 7,5, 10, ve 15 mM konsantrasyonlarında G0/G1 fazındaki hücre popülasyonunda (%), konsantrasyona bağlı artışın gerçekleştiği Şekil 3.10, Şekil 3.11 ve Çizelge 3.4’de ifade edilmiş olup; hücre popülasyonu (%), 5 mM’da 16,05 ±2,05 olduğu, 7,5 mM’da 17,6 ±4,10 olduğu, 10 mM’da 16,05 ±5,59 olduğu ve 15 mM’da 20,05 ±1,77 olduğu saptanmıştır.

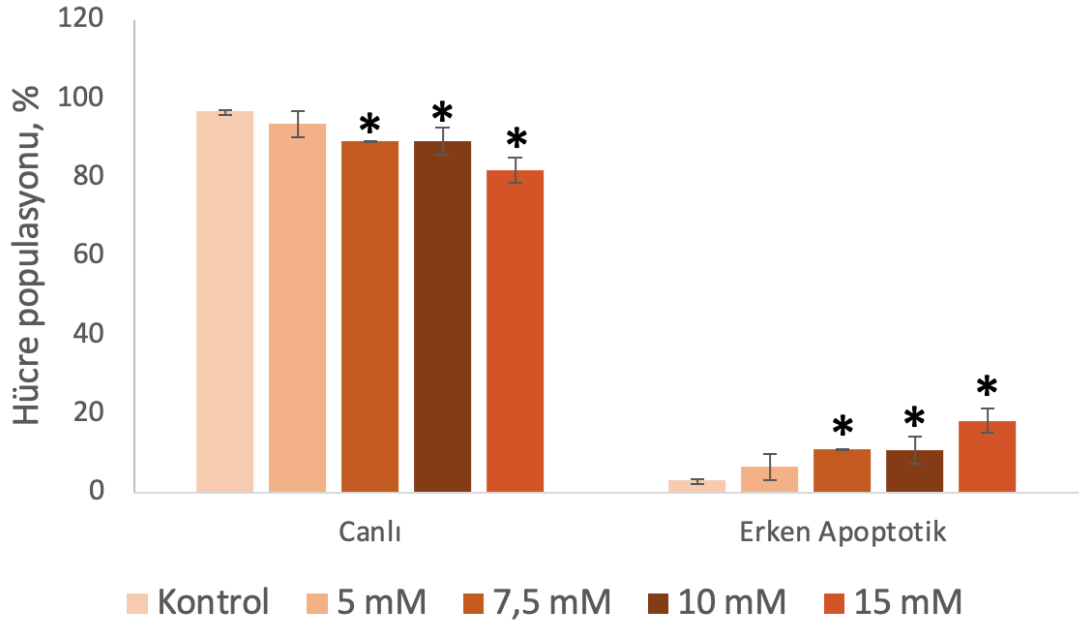
Sonuç olarak dulcitolün MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsünü G0/G1 fazında anlamlı olarak inhibe ettiği belirlenmiştir.

3.3. Annexin V Bağlanma Analizi Bulguları

Dulsitolün meme kanseri hücrelerindeki apoptotik etkinliği akım sitometri tekniği ile Annexin V-FITC apoptoz saptama kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler 5-15 mM konsantrasyon aralığında dulsitol ile muamele edilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen plotlar Şekil 3.12’de gösterilmektedir. Sayısal veriler (%) hücre popülasyonu olarak Çizelge 3.5’de gösterilmektedir.



Şekil 3.12. Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde Annexin V bağlanması analizi plot görüntüleri.



Şekil 3.13. Dulcitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin Annexin V bağlanma analizi bulguları. Hücre popülasyonu (%) ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edilmiştir,* $p < 0.05$, kontrole göre anlamlılık.

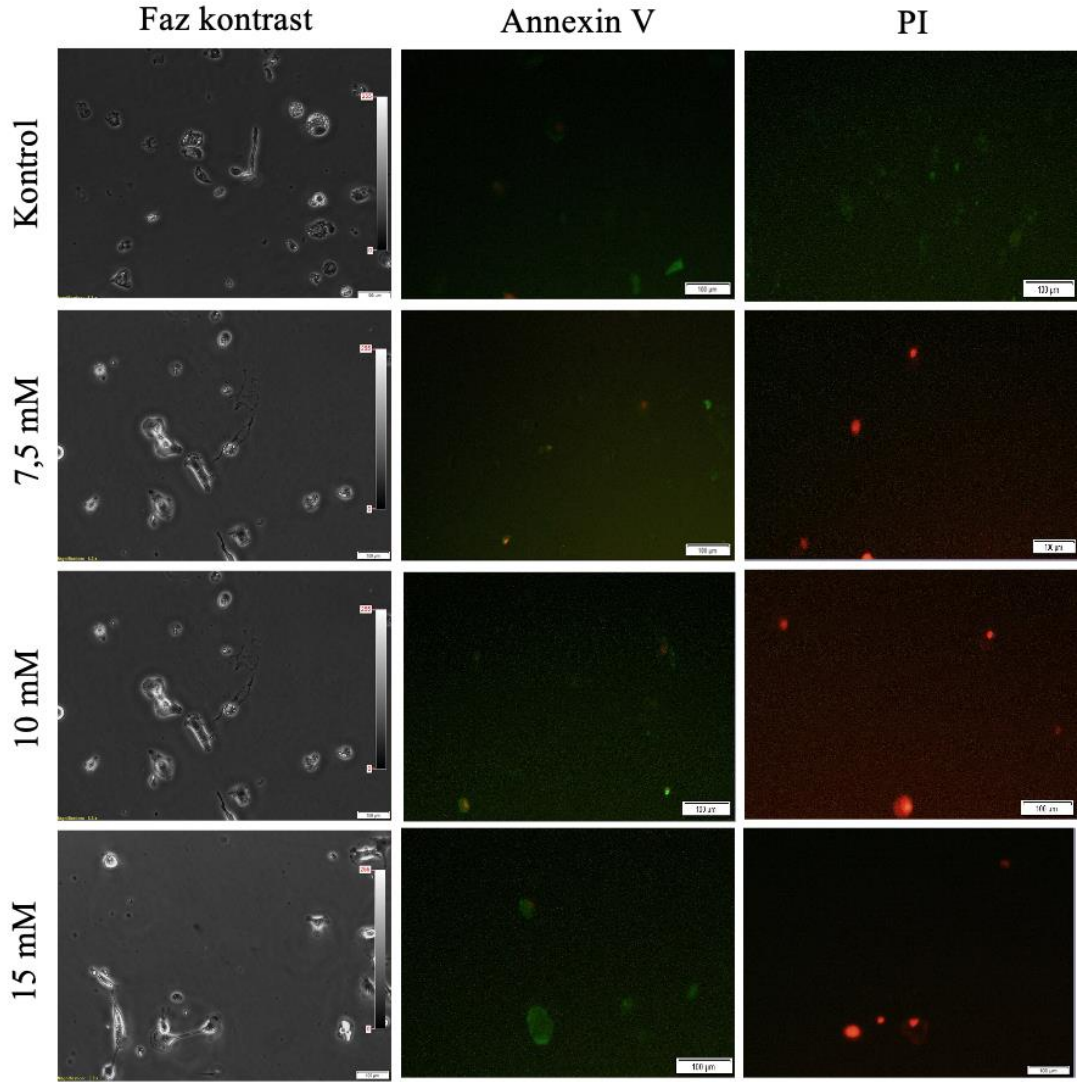
Çizelge 3.5. Dulcitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde Annexin V bağlanma analizine ait % hücre popülasyon değerleri.

	Hücre popülasyonu (%)	
	Canlı	Erken Apoptotik
Kontrol	96,945 $\pm$ 0,21	3,055 $\pm$ 0,21
5 mM	93,525 $\pm$ 3,36	6,475 $\pm$ 3,36
7,5 mM	89,1 $\pm$ 0,21	10,9 $\pm$ 0,21
10 mM	89,225 $\pm$ 3,50	10,775 $\pm$ 3,50
15 mM	81,775 $\pm$ 3,15	18,225 $\pm$ 3,15

5 mM dulcitol uygulanan grupta erken apoptotik hücre popülasyonu (%) 6,475 $\pm$ 3,36, 7,5 mM dulcitol uygulanan grupta (%) 10,9 $\pm$ 0,21, 10 mM dulcitol uygulanan grupta (%) 10,775 $\pm$ 3,50 ve 15 mM uygulanan grupta (%) 18,225 $\pm$ 3,15 olarak saptanmıştır. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde MDA-MB-231 hücrelerinde dulcitolün 7,5 mM ve üzerindeki konsantrasyonlarda apoptotik hücre popülasyonunu kontrole göre anlamlı olarak artırdığı belirlenmiştir.

3.4. Floresan Görüntüleme Bulguları

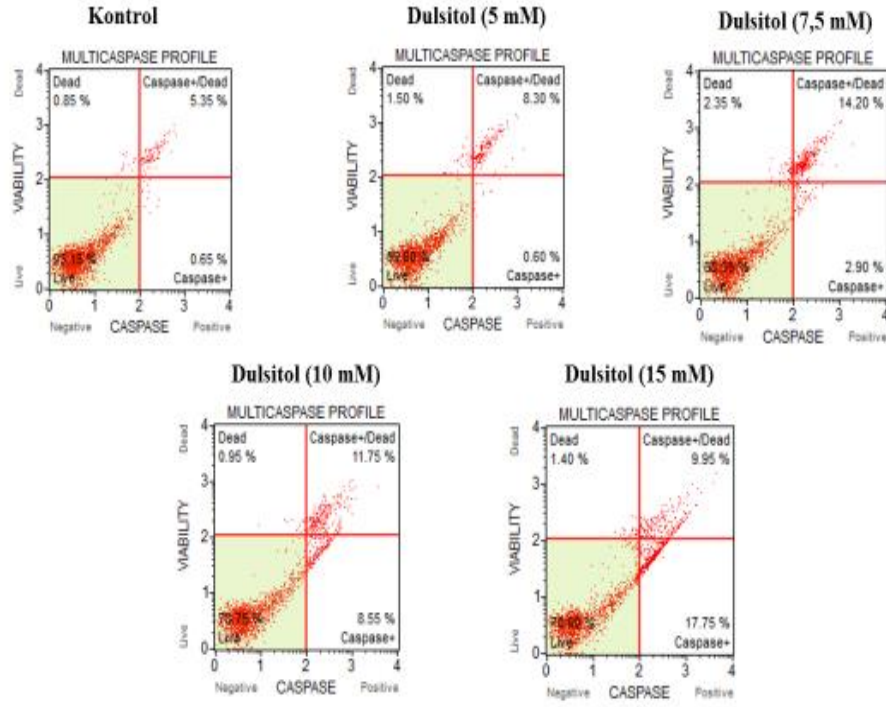
Dulsitolün MDA-MB-231 hücrelerinde annexin V bağlanması üzerine etkisi, floresan boyama yöntemi ile görüntülenmiştir. Bu kapsamda, Annexin V-FITC floresan mikroskop kiti kullanılmıştır.



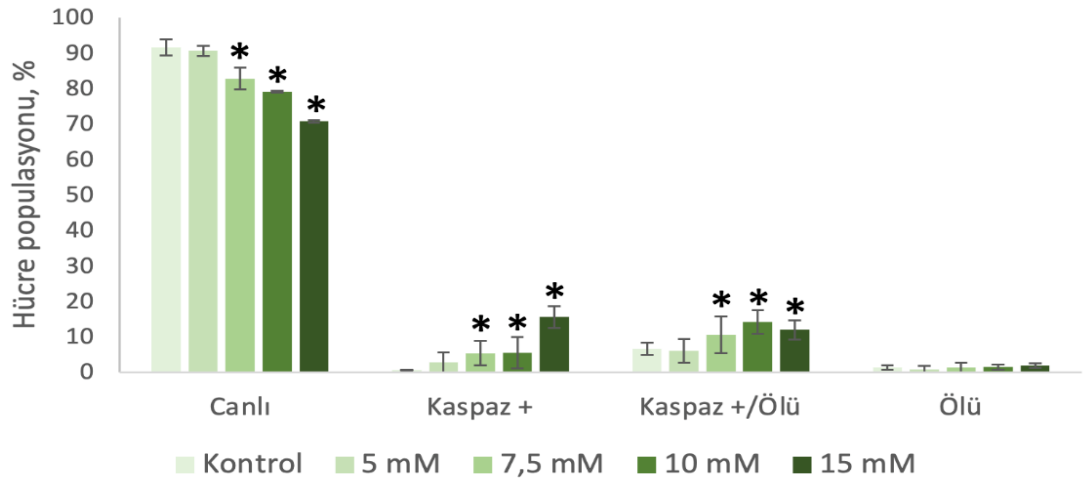
Şekil 3.14. Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde Annexin V-FITC floresan görüntüleri

3.5. Kaspaz Düzeyi Analizi Bulguları

Dulsitol'un MDA-MB-231 hücrelerinde kaspaz düzeyleri analizi, Muse Multicaspase Assay Kit kullanılarak tayin edilmiştir.



Şekil 3.15. Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde kaspaz düzeyi analizi plot görüntüleri.



Şekil 3.16. Dulcitol bileşiği uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin kaspaz düzeyleri. Grafikte canlı, kaspaz+, kaspaz+/ölü ve ölü % hücre popülasyonunu gösterilmektedir. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edilmiştir, * $p < 0.05$, kontrole göre anlamlılık.

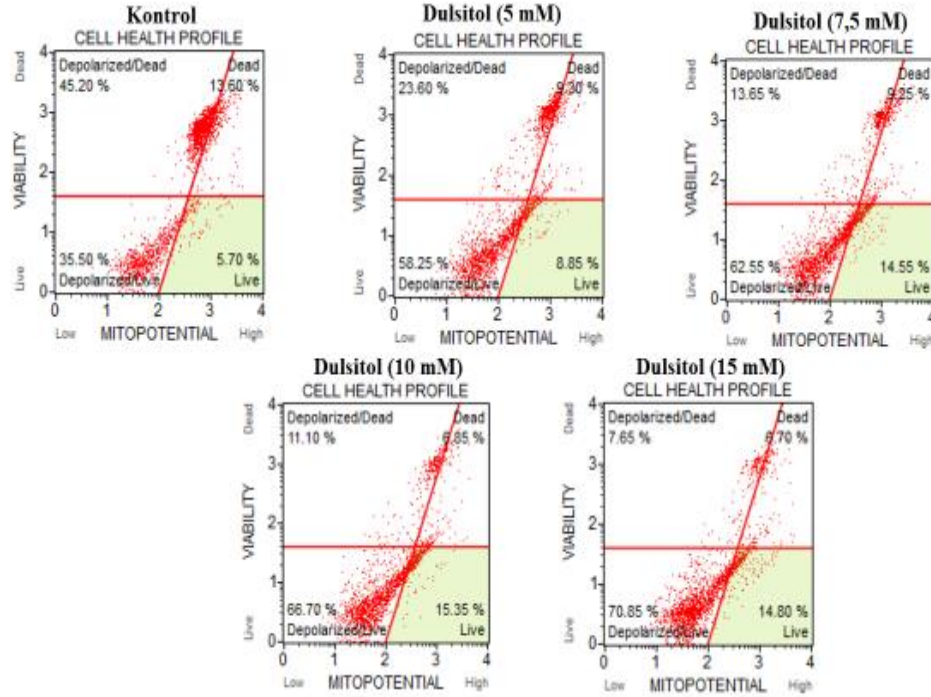
Çizelge 3.6. Dulcitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin kaspaz düzeyi analizine ait (%) hücre popülasyon değerleri.

	Hücre popülasyonu (%)			
	Canlı	Kaspaz +	Kaspaz +/Ölü	Ölü
Kontrol	91,55 $\pm$ 2,26	0,63 $\pm$ 0,04	6,55 $\pm$ 1,70	1,28 $\pm$ 0,60
5 mM	90,6 $\pm$ 1,41	2,68 $\pm$ 2,93	5,95 $\pm$ 3,32	0,78 $\pm$ 1,03
7,5 mM	82,75 $\pm$ 3,11	5,33 $\pm$ 3,43	10,55 $\pm$ 5,16	1,38 $\pm$ 1,38
10 mM	79,05 $\pm$ 0,28	5,43 $\pm$ 4,42	14,15 $\pm$ 3,39	1,43 $\pm$ 0,67
15 mM	70,68 $\pm$ 0,32	15,58 $\pm$ 3,08	11,9 $\pm$ 2,76	1,85 $\pm$ 0,64

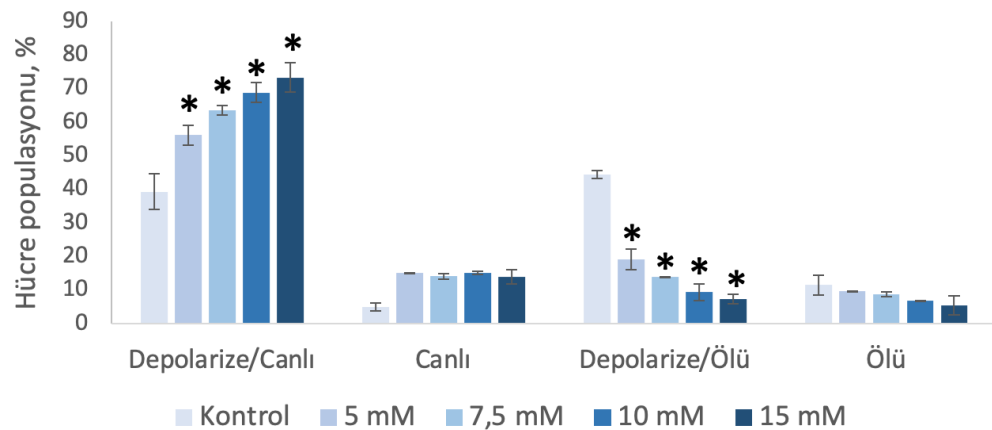
MDA-MB-231 hücrelerinde kaspaz düzeyi analizinde kontrol grubunda (%) kaspaz + 0,63 $\pm$ 0,04 iken; 5 mM'da 2,68 $\pm$ 2,93 şeklinde olduğu, 7,5 mM'da 5,33 $\pm$ 3,43 şeklinde olduğu, 10 mM'da 5,43 $\pm$ 4,42 şeklinde olduğu ve 15 mM'da ise 15,58 $\pm$ 3,08 olduğu saptanmıştır. Bu şekilde MDA-MB-231 hücrelerine artan konsantrasyonlarda dulcitol uygulaması ile elde edilen veriler doğrultusunda kontrol grubuna kıyasla kaspaz düzeylerinin arttığı belirlenmiştir.

3.6. Mitokondriyal Membran Potansiyel Analiz Bulguları

Mitokondriyal membran potansiyelinin ölçülmesi, apoptozun belirlenmesinde önemli bir basamaktır. Bu amaçla, Muse Mitopotential Assay kit kullanılmıştır.



Şekil 3.17. Dulcitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyeli analizi plot görüntüleri.



Şekil 3.18. Dulcitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyeli bulguları. Grafikte canlı, depolarize-canlı, depolarize-ölü ve ölü hücre popülasyonları % olarak belirtilmektedir, * p<0.05, kontrole göre anlamlılık.

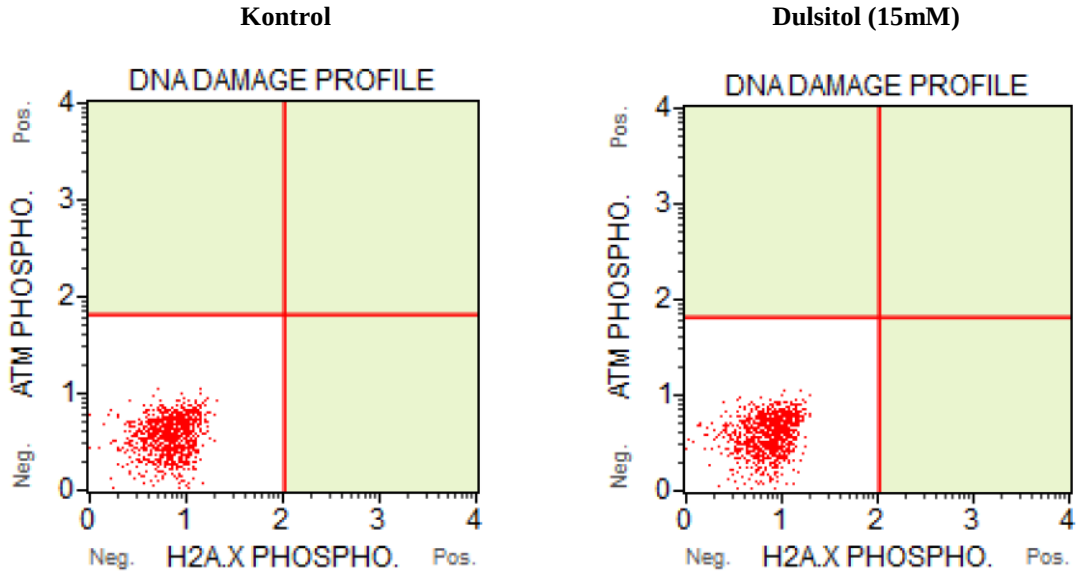
Çizelge 3.7. Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde mitokondriyel membran potansiyeli bulgularına ilişkin hücre popülasyonu (%) değerleri.

Konsantrasyon	Hücre popülasyonu (%)			
	Depolarize/Canlı	Canlı	Depolarize/Ölü	Ölü
Kontrol	39,28 ± 5,34	4,93 ± 1,10	44,33 ± 1,24	11,48 ± 3,01
5 mM	56,05 ± 3,04	15,13 ± 0,04	19,18 ± 3,08	9,65 ± 0,07
7,5 mM	63,5 ± 1,34	14,03 ± 0,74	13,78 ± 0,18	8,7 ± 0,78
10 mM	68,78 ± 2,93	15,08 ± 0,39	9,38 ± 2,44	6,78 ± 0,11
15 mM	73,28 ± 4,43	13,98 ± 2,17	7,38 ± 1,39	5,38 ± 2,87

Kontrol grubunun ve 5, 7,5, 10 ve 15 mM konsantrasyonlarda dulsitol bileşiği uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde mitokondriyel membran potansiyeli ölçüm sonuçları Şekil 3.16, Şekil 3.17 ve Çizelge 3.7’de ifade edilmektedir. Buna göre dulsitolün, konsantrasyon artışına bağlı olarak MDA-MB-231 hücrelerinde, depolarize hücre popülasyonunu kontrole göre anlamlı olarak arttırdığı saptanmıştır.

3.7. DNA Hasarı Analiz Bulguları

Multi Color DNA damage kit kullanılarak DNA hasarı flow sitometrik olarak analiz edilmiştir.

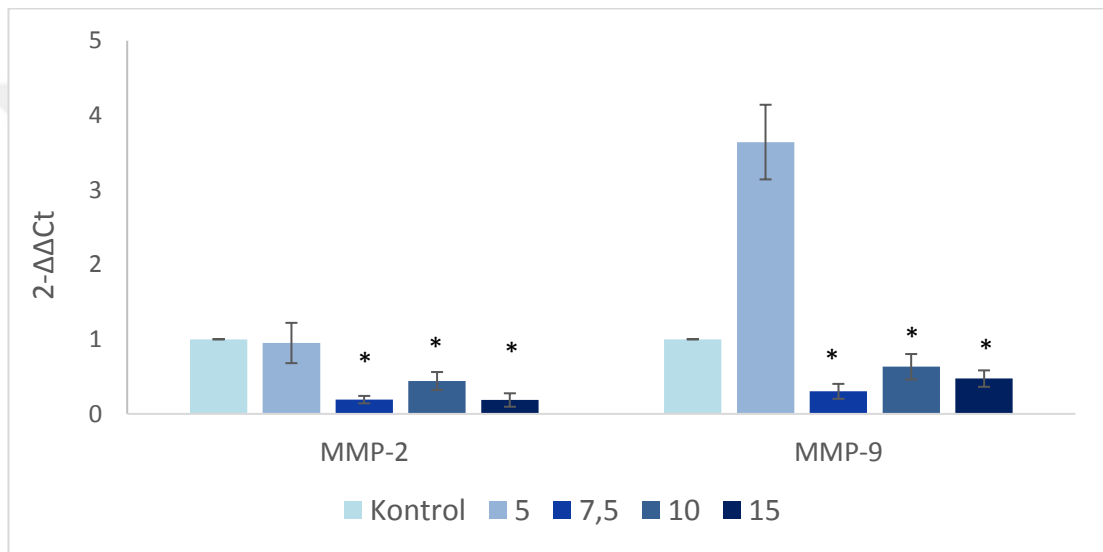


Şekil 3.19. Dulsitol bileşiği uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen DNA hasarı plot görüntüleri.

DNA hasarı analiz bulguları Şekil 3.19’da gösterilmiştir. Kontrol grubu ve en yüksek doz olan 15 mM konsantrasyona kadar değerlendirilmiş olmakla birlikte, dulsitolün MDA-MB-231 hücrelerinde DNA hasarı üzerine etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

3.8. MMP-2/-9 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Bulguları

Real-Time PCR çalışması ile dulsitolün MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde MMP-2/-9 mRNA ekspresyonu üzerine etkisi değerlendirilmiştir.



Şekil 3.20. Dulsitol bileşiği uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonu analizi,* p<0.05, kontrole göre anlamlılık.

Çizelge 3.8. Dulsitol bileşiği uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonu, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi ile hesaplanan değerler (fold change) ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edilmektedir.

Konsantrasyon	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	
	MMP-2	MMP-9
Kontrol	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
5 mM	0,95 $\pm$ 0,27	3,64 $\pm$ 0,5
7,5 mM	0,19 $\pm$ 0,05	0,30 $\pm$ 0,1
10 mM	0,44 $\pm$ 0,12	0,63 $\pm$ 0,17
15 mM	0,19 $\pm$ 0,09	0,47 $\pm$ 0,11

Dulsitol uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyon analizi bulguları Şekil 3.27 ve Çizelge 3.8.’de gösterilmektedir. Elde edilen bulgulara göre, dulsitol uygulanan hücrelerde 7,5, 10 ve 15 mM

konsantrasyonlarda MMP-2 mRNA ekspresyonunda sırası ile $0,19 \pm 0,05$, $0,44 \pm 0,12$ ve $0,19 \pm 0,09$ kat azalma gözlenmiştir ($p<0.05$). Benzer şekilde MMP-9 ekspresyonunda da $0,30 \pm 0,1$, $0,63 \pm 0,17$ ve $0,47 \pm 0,11$ kat azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Elde edilen bulgular, dulsitolün 7,5 mM ve üzeri konsantrasyonlarda MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonunda anlamlı düzeyde azalmaya neden olduğunu göstermektedir.



4. TARTIŞMA

Kanser dünya çapında oldukça önemli bir sağlık problemi olmakla birlikte Amerika Birleşik Devletleri'nde ölümlerin ikincil önde gelen nedenidir. 2020 yılında meydana gelen koronavirüs pandemisi, kanserin tanı ve tedavisini olumsuz yönde etkilemiştir. Pandemi nedeniyle kapanan sağlık tesisleri ve Covid-19'a maruz kalma korkusu sebebiyle bakıma erişimin yetersiz hale gelmesi, kanserin erken teşhis ve tedavisinde gecikmelere yol açarak, insidansında kısa süreli düşüşe neden olsa da ardından ileri evre kanserlerin artışına yol açmıştır (Siegel ve ark., 2022).

Meme kanseri, dünya çapında kadınlarda kanser nedeniyle meydana gelen ölümlerin önde gelen nedenidir (Bray vd.,2018). Meme kanseri heterojenite gösteren, oluşumu birden fazla nedene bağlı olan, spesifik, klinik, histopatolojik, moleküler (Eliyatkin ve ark., 2015) ve genetik özellik taşıyan bir hastalık grubudur (Bertos vd., 2011).

Kanser hücrelerinin invazyon ve metastazının moleküler mekanizmaları kompleks bir olaylar dizisi halindedir. Erken olaylardan biri, kanser hücrelerinin hareketi için biyokimyasal ve mekanik bariyer oluşturan (Chambers ve Matrisian, 1997) ekstrasellüler matriks komponentlerinin proteolitik degradasyonudur (Woessner, 1991). Ekstrasellüler matriksin degradasyonu, ekstrasellüler proteinazları gerektirdiğinden, MMP enzimleri meme kanserinde kritik rol oynamaktadır. MMP ailesi içinde, 72kDa'luk MMP-2 (Gelatinaz A) ve 92 kDa'luk MMP-9 (Gelatinaz B) enzimlerinin, ECM degradasyonunda ve hücre migrasyonunda kritik rol oynadıkları ve meme kanserinde tümör hücresinin invazyonuna yol açtıkları bildirilmiştir (Egeblab ve Werb, 2002).

Şekerlerin indirgenme ürünü olan şeker alkollerine, birçok farklı bitki grubunda rastlanırken ayrıca yosun, mantar ve likenler tarafından da üretimlerinin mevcut olduğu görülmektedir. Şeker alkollerini genellikle düşük kalorili, doğal tatlandırıcılar olarak tercih edilmektedirler. Biyo bazlı kimyasallar için potansiyel yapı taşları olarak da kullanımları önerilmektedir (Jagtap ve ark., 2019).

Doğal kaynaklı bir şeker alkolü olan dulsitolün, yapılan çeşitli çalışmalarda, anti-kanser, anti-enflamatuvar etkinliklere sahip olduğu bildirilmiştir.

Dulsitolün, DBA/1J farelerinde kollajen ile indüklenen artrit (CIA) üzerindeki etkisinin değerlendirildiği çalışmada, DBA/1J farelerine sıgır tip II kollajen aşılamasından 6 hafta sonra dulsitol, 100mg/kg/gün dozunda oral yoldan 9 hafta boyunca uygulaması yapılmıştır. Bu çalışma ile, dulsitol'un, kollajen kaynaklı artiriti baskılayarak hücrel bağışıklığı düzenleyici rolünün olabileceği belirtilmiştir (Kobayashi ve ark., 1997).

Dulsitol'un 25 mg/ml konsantrasyonda 24 saat boyunca C6 rat glioma hücreleri üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışmanın sonucunda; glioma hücrelerinde hücrel ROS seviyelerini ve apoptozu önemli oranda artırdığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2018).

Tez çalışmamızda dulsitolün MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı ve apoptoz üzerine etkinliği değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, söz konusu bileşiğin çalışılan konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisinin olmadığını, bununla birlikte, MDA-MB-231 hücrelerinde 7,5 mM ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığını anlamlı şekilde inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca dulsitolün bu hücrelerde annexin V bağlanmasını, mitokondriyal membran potansiyelini ve total kaspaz düzeyini anlamlı şekilde artırdığı ve apoptozu indüklediği de tespit edilmiştir.

HepG2 karaciğer karsinoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada, dulsitolün doza bağımlı olarak SIRT1, bcl-2 proteinlerinin ekspresyonunu down-regüle ederken p53, asetile-p53, cleaved-kaspaz 9, cleaved-kaspaz 3, bax ve sitokrom c ekspresyonunun up-regülasyonunu sağlayarak HepG2 hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, dulsitolün, tümör invazyonuyla ilişkili olarak arttığı bilinen E-cadherin MMP-9, Ups (ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü) ve MMP-2 seviyelerini azaltarak HepG2 hücrelerinin invazyonunu ve migrasyonunu baskıladığı, sonuç olarak, dulsitolün SIRT1 inhibitörü gibi davranarak MMP'ler ve SIRT1/p53 yolağı regülasyonu ile, apoptozu indüklediği ve bu hücrelerin

proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Lin ve ark., 2020).

Tez alışmamızda dulsitolün MDA-MB-231 hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyon düzeylerini anlamlı olarak azalttığı gösterilmiş olup, elde edilen bulgular literatür ile uyumludur.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapmış olduğumuz tez çalışmasında, doğal kaynaklı yollardan elde edilebilen bir şeker alkolü olan dulsitolün çeşitli meme kanseri hücrelerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu kapsamda hücre canlılığı analizleri, dulsitolün çalışılan konsantrasyon aralığında östrojen pozitif MCF-7 hücre hattı üzerinde etkisinin olmadığını, bununla birlikte, triple negatif meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinde 7.5 mM ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığını G0/G1 evresinde anlamlı olarak inhibe ettiğini göstermiştir.

Apoptotik etkinin değerlendirilmesi kapsamında yapılan analizlerde, dulsitolün MDA-MB-231 hücrelerinde annexin V bağlanmasını ve mitokondriyal membran potansiyelini anlamlı olarak artırdığı saptanmıştır. Ayrıca, dulsitolün apoptotik belirteçlerden olan total kaspaz düzeylerini anlamlı olarak artırdığı, bununla birlikte DNA hasarı üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Tez çalışmasında, kanserde ekspresyonunun arttığı bilinen ve metastazda önemli rolü olduğu gösterilen matriks metalloproteinaz enzim ailesi üyelerinden MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyon analizleri de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular, dulsitolün 7,5 mM ve üzeri konsantrasyonlarda söz konusu proteinlerin mRNA ekspresyonlarını anlamlı olarak azalttığını göstermiştir.

Sonuç olarak, tez çalışmamızdan elde edilen bulgular, dulsitolün selektif olarak triple negatif meme kanseri hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkinliğinin olduğunu göstermiştir. Doğal kaynaklı bir bileşik olan dulsitolün mevcut literatür taramalarında antikanser etkinliğine dair sınırlı bilgi yer almakla birlikte, çalışmamızda elde edilen bulgular literatür ile uyum göstermektedir.

Literatürde yer alan bulgular ve tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre, dulsitolün antikanser etkinliği olmakla birlikte, bu etkilerin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması için apoptozda etkin rol oynayan proteinlerin ekspresyonlarının, western blot analizi yöntemiyle araştırılması gerekmektedir.



ÖZET

Dulsitol'ün Çeşitli Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptotik Etki Mekanizmalarının Araştırılması

Kanser günümüzde, kardiyovasküler hastalıklar ve inmeden sonra dünya genelinde meydana gelen ölümlerin birincil nedenlerinden biridir. 2018 yılında yayınlanan verilere göre meme kanserinin dünyada kadınlar arasında en yaygın kanser türü ve kanser ölümlerinin ana nedeni olduğu bildirilmiştir.

Meme kanseri, spesifik klinik, histopatolojik ve moleküler özellikler taşıyan bir hastalık grubudur. Meme kanserinin kompleks yapıda olması ve heterojenite göstermesi farklı alt tiplere sınıflandırılmasına ve tedavide çeşitli rejimlerin uygulanmasına neden olmuştur. Meme kanseri'nin tedavisi için uygulanan geleneksel tedavi yöntemlerinin etkinliğinin düşük ve yan etkilerinin yüksek olması sorunları, meme kanserinin tedavisi için yeni ajanlar geliştirmenin önemini giderek arttırmaktadır. Dulsitol, doğal bir şeker alkolü olup, farklı hücre hatları üzerinde anti-kanser ve anti-enflamatuvar etkinliği belirtilmiş bir bileşiktir. Son yıllarda doğal kaynaklı bileşiklerin kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerinde etkili olduklarının gösterilmesi ile bu etkinliğe yönelik mekanizmaların araştırılma çalışmaları hızla devam etmektedir.

Bu tez çalışmasında, dulsitolün, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme karsinoma hücreleri üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlandı. Elde edilen bulgular, dulsitolün MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığını anlamlı olarak azaltırken, MCF-7 hücrelerinde etkili olmadığını gösterdi. Ayrıca, dulsitolün MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozu indüklediği ve MMP-2/-9 mRNA ekspresyonunu anlamlı olarak azalttığı gösterildi.

Söz konusu çalışma, dulsitolün meme kanseri hücreleri üzerindeki etkinliğinin değerlendirildiği ilk çalışma olması bakımından önem taşımakta olup, elde edilen bulguların literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Dulsitol, Sitotoksiste, Meme Kanseri, Apoptoz, MMP-2, MMP-9

SUMMARY

Investigation of Apoptotic Effect Mechanisms of Dulcitol in Various Breast Cancer Cells

Cancer is now one of the primary causes of death worldwide after cardiovascular disease and stroke. According to data published in 2018, it was reported that breast cancer is the most common type of cancer among women and the main cause of cancer deaths in the world.

Breast cancer is a group of diseases with specific clinical, histopathological and molecular features. The complexity and heterogeneity of breast cancer has led to its classification into different subtypes and the application of various regimens in the treatment. The problems of low efficacy and high side effects of traditional treatment methods applied for the treatment of breast cancer increase the importance of developing new agents for the treatment of breast cancer. Dulcitol, a natural sugar alcohol, is a compound that has been shown to have anti-cancer and anti-inflammatory activity on different cell lines. In recent years, with the demonstration of the effects of naturally-derived compounds on the proliferation of cancer cells, studies to investigate the mechanisms for this activity continue rapidly.

In this thesis, it was aimed to evaluate the antiproliferative and apoptotic effects of dulcitol on MCF-7 and MDA-MB-231 breast carcinoma cells. The findings showed that dulcitol significantly reduced cell viability in MDA-MB-231 cells, but was not effective in MCF-7 cells. In addition, it was shown that dulcitol induced apoptosis in MDA-MB-231 cells and significantly reduced MMP-2/-9 mRNA expression.

The study in question is important in that it is the first study to evaluate the effectiveness of dulcitol on breast cancer cells, and it is thought that the findings will contribute to the literature.

Key words: Dulcitol, Cytotoxicity, Breast Cancer, Apoptosis, MMP-2, MMP-9

KAYNAKLAR

ADAMS JM, CORY S (2001). Life or death decisions by the Bcl-2 family. *Trends. Biochem Sci.* **26**:61-6.

ALASEEM A, ALHAZZANI K, DONDAPATI P, ALOBID S, BISHAYEE A, RATHINAVELU A (2019). Matrix Metalloproteinases: A challenging paradigm of cancer management.” *Seminars in Cancer Biology* **56**:100–115.

AL,BROWN PO, BOTSTEIN D (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**:747-52.

ALENZI FQ, LOTFY M, WYSE R (2010). Swords of cell death: caspase activation and regulation. *Asian Pac. J Cancer Prev* **11**(2):271-280

ALLAN JA, DOCHERTY AJ, BARKER PJ, HUSKISSON NS, REYNOLDS JJ, MURPHY G(1995). Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J.***309**:299–306

AL-MAHMOOD S, SAPIEZYNSKI J, GARBUZENKO OB, MINKO T (2018). Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. *Drug Deliv. and Transl. Res.* **8**:1483–1507.

ANDREW GR, CATHERINE B, CHRISTOPHER SP (2001). Education and debate, What is apoptosis, and why is it important. *BMJ* **322**:1536-1538.

AKRAM M, SIDDIQUI SA (2012). Breast cancer management: past, present and evolving. *Indian J Cancer* **49**(3):277–282.

AUGELLO C, CARUSO L, MAGGIONI M, DONADON M, MONTORSI M, SANTAMBROGIO R, TORZILLI G, VAIRA V, PELLEGRINI C, RONCALLI M, COGGI G, BOSARI S (2009). Inhibitors of apoptosis proteins(IAPs) expression and their prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **9**:125

BERTOS NR, PARK M, (2011). Breast cancer-one term, many entities?. *J Clin Invest* **121**:3789–3796.

BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, SIEGEL RL, TORRE LA, JEMAL A (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.*Ca Cancer J Clin* **68**:394–424.

BRINCKERHOFF CE, MATRISIAN LM (2002). Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:207–214.

BROOKS SC, LOCKE ER, SOULE HD (1973). Oestrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem* **248**(17): p. 6251-3.

CAILLEAU R, OLIVE M, CRUCIGER QV (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* **14**(11):911– 915.

Cancer.gov.,(2022).

<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancerterms/def/mannitol>[Erişim Tarihi: 11.09.2022]

CHABERS AF, MATRISIAN LM (1997). Changing Views of the Role of Matrix Metalloproteinases in Metastasis. *Journal of the National Cancer Institute* **89**:1260-1270.

CHANG C, WERB Z (2001).The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis.” *Trends Cell Biol*,11(11):S37–S43.

CHAVEZ KJ, GARIMELLA SV, LIPKOWITZ S (2010). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis* **32**(1- 2):35–48.

COMŞA Ş, CIMPEAN AM, RAICA M (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research* **35**: 3147-3154

CURTIN JF, COTTER TG (2003). Live and let die: regulatory mechanism in Fas mediated apoptosis. *Cell Signal* **15**:983-92.

CHEN F, WANG W, EL-DEIRY WS (2010). Current strategies to target p53 in cancer. *Biochem Pharmacol.* **80**(5):724-730

DASGUPTA A, NOMURA M, SHUCK R, YUSTEIN J. (2016). Cancer’s Achilles’Heel: Apoptosis and Necroptosis to the Rescue. *Int. J. Mol Sci.* **18**(1):23.

DERYUGINA IE, QUIGLEY PJ (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis *Cancer Metastasis Rev* **25**:9-34

DESANTIS C, MA J, BRYAN L, JEMAL A (2014) Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* **64**(1):52–62.

DHANKHAR R, VYAS SP, JAIN AK, ARORA S, RATH G, GOYAL AK (2010). Advances in novel drug delivery strategies for breast cancer therapy. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* **38**:230–249.

EBEID NI. (1999). *Egyptian Medicine in the Days of the Pharaohs*. General Egyptian Book Organization, Cairo, Egypt.

EGEBLAD M, WERB Z (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**:161-174.

ELİYATKIN N, YALÇIN E, ZENGEL B, AKTAŞ S,VARDAR E. (2015). Molecular Classification of Breast Carcinoma”*J Breast Health* **11**:59-66

FANG T, CAI Y, YANG Q, OGUTU CO, LIAO L, HAN Y (2020). Analysis of sorbitol content variation in wild and cultivated apples. *J Sci Food Agric* **100**(1):139–144.

FAZEL A, HASANPOUR-HEIDARI S, SALAMAT F, RAJAIE S, KAZEMINEZHAD V, NAEIMI-TABIEI M, WEIDERPASS EV (2019). Marked increase in breast cancer incidence in young women: A 10-year study from Northern Iran, 2004–2013. *Cancer Epidemiology* **62**:1877-7821.

FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, MATHERS C, PARKIN DM, PINEROS M, ZNAOR A, BRAY F (2018). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* **144**:1941–1953.

GARRIDO C, GALLUZZI L, BRUNET M, PUIG PE, DIDELOT C, KROEMER G (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* **13**:1423–1433.

GINSBURG O, BRAY F, COLEMAN MP, VANDERPUYE V, ENIU A, KOTHA SR, SARKER M, HUONG TT, ALLEMANI C, DVALADZE A (2017). The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. *Lancet* **389**:847–860.

GHONCHEH M, MOMENIMOVAHED Z, SALEHINIYA H (2016). Epidemiology, Incidence and Mortality of Breast Cancer in Asia. *Asian Pac J Cancer Prev.* **17**(S3):47–52.

GROSS J, LAPIERE CM (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **48**:1014–1022.

GUO H, CHEN L, CUI H, PENG X, FANG J, ZUO Z, DENG J, WANG X, WU B (2016). Research Advances on Pathways of Nickel-Induced Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci* **17**:10

GÜLTEKIN N, KARAOĞLU K, KÜÇÜKATEŞ E (2008). New discoveries in the mechanism of apoptosis and cell survival and novel potential therapeutic strategies” *Arch Turk Soc. Cardiol.* **36**(2):120-130

HARRELL JC, PFEFFERLE AD, ZALLES N, PRAT A, FAN C, KHRAMTSOV A, OLOPADE OI, TROESTER MA, DUDLEY AC, PEROU CM (2014). Endothelial-like properties of claudin-low breast cancer cells promote tumor vascular permeability and metastasis. *Clin Exp Metastasis* **31**(1):33–45.

HERSCHKOWITZ JI, SIMIN K, WEIGMAN VJ, MIKAELIAN I, USARY J, HU Z, RASMUSSEN KE, JONES LP, ASSEFNIA S, CHANDRASEKHARAN S, BACKLUND MG, YIN Y, KHRAMTSOV AI, BASTEIN R, QUACKENBUSH J, GLAZER RI, BROWN PH, GREEN JE, KOPELOVICH L, FURTH PA, PALAZZO JP, OLOPADE OI, BERNARD PS, CHURCHILL GA, DYKE TV, PEROU CM (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genom Biol* **8**:76-81.

HENGARTNER MO, ELLIS RE, HORVITZ HR (1992). *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* **356**: 494-499

HORWITZ KB, COSTLOW ME, MCGUIRE WL (1975). MCF-7; a human breast cancer cell line with oestrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids* **26**(6): p. 785-95

HOLIDAY DL AND SPEIRS V (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* **13**(14):215.

ITOH T, IKEDA T, GOMI H, NAKAO S, SUZUKI T, ITOHARA S (1997). Unaltered secretion of β -amyloid precursor protein in gelatinase A (matrix metalloproteinase 2)-deficient mice. *J Biol Chem* **272**:22389–22392.

JAGTAP SS, BEDEKAR AA, LIU JJ, JIN Y, RAO CV (2019). Production of galactitol from galactose by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* IFO0880. *Biotechnol Biofuels* **12**:250.

JAKBS C, SCHWEITZER S, DORLAND B (1995). Galactitol in galactosemia. *European Journal of Pediatrics* **154**:50-52.

KARTLAŞMIŞ K, KÖKBAŞ U, KAYRIN L (2016). Biochemistry of Apoptosis. *Archives Medical Review Journal* **25**(1):52-69

KERR JF, WYLIE AH, CURRIE AR, (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**:239-257.

KESSENBROCK K, PLAKS V, WERB Z (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **141**:52-67.

KOBAYASHI Y, SHEN J, LI SH, KAKIZOE E, OKUNISHI H, CHEN JF, (1997). Suppressive effects of a plant-origin polyol, dulcitol on collagen-induced arthritis in mice. *Nihon Yakurigaku Zasshi* **110**:132–137.

KENNY PA, LEE GY, MYERS CA, NEVE RM, SEMEIKS JR, SPELLMAN PT, LORENZ K, LEE EH, BARCELLOS-HOFF MH, PETERSEN OW, GRAY JW, BISSELL MJ (2007). The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol.* **1**(1):84–96.

LEE AV, OESTERREICH S, DAVIDSON NE (2015). MCF-7 cells changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *J Natl Cancer Inst.* **107**:(7)djv073.

LI HC, CAO DC, LIU Y, HOU YF, WU J, LU JS, DI GH, LIU G, LI FM, OU ZL, JIE C, SHEN ZZ, SHAO ZM (2004). Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2) and MMP-9) in patients with lymph node- negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* **88**:(1)75-85.

LIPPMAN ME, BOLAN G (1975). Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture. *Nature*, **256**(5518): p. 592-3.

LIN XL, LI K, CHEN B, ZHANG T (2020). Dulcitol suppresses proliferation and migration of hepatocellular carcinoma via regulating SIRT1/p53 pathway. *Phytomedicine* **66**:0944-7113.

LIOTTA LA, TRYGGVASON K, GARBISA S, HART I, FOLTZ CM, SHAFIE S (1980). Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* **284**:67-68.

LIU H, ZANG C, FENNER MH, POSSINGER K, ELSTNER E (2003). PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro. *Breast Cancer Res Treat.* **79**(1):63-74.

MA L, WEINBERG RA (2008). Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends Genet.* **24**(9):448-456.

MARTIGNETTI JA, AQEEL AA, SEWAIRI WA, BOUMAH CE, KAMBOURIS M, MAYOUF SA, SHETH KV, EID WA, DOWLING O, HARRIS J, GLUCKSMAN MJ, BAHABRI S, MEYER BF, DESNICK RJ (2001). Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nat Genet.* **28**:261–265.

MEHNER C, HOCKLA A, MILLER E, RAN S, RADISKY DC, RADISKY ES (2014). Tumor cell- produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget* **5**:(9)2736-2749.

MCGEE SF (2010). Understandingmetastasis: current paradigms and therapeutic challenges in breast cancer progression. *RCSI Student Medical Journal* **3**:56–60.

MOMENIMOVAHED Z, SALEHINIYA H (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer Targets and Therapy* **11**:151-164.

MOSMANN T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**(1-2):55-63.

MYLONA E, NOMIKOS A, MAGKOU C, KAMBEROU M, PAPASSIDERI I, KERAMOPOULOS A, NAKOPOULOU L (2007). The clinicopathological and prognostic significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-9 according to their localization in invasive breast carcinoma. *Histopathology* **50**:(3)338-47

MURPHY G (2008). The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* **8**:932-941.

NAGASE H, VISSE R, MURPHY G (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* **69**:562-573.

NAGATA S (1999). Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet.* **33**:29-55.

NASSANI R, ALAMRI H, ALRFAEI BM (2021). Erythritol acts as tumor enhancer and suppressor depending on concentrations in brain tumor cell lines. *Cancer Res* **81**(13_Supplement): LB183

NOUNOU, ELAMRAWY F, AHMED N, ABDELRAOUF K, GODA S, SYED-SHA-QHATTAL H. (2015). Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. *Breast Cancer Basic and Clinical Research* **9**:17-34.

OZKAN E, BAKAR-ATEŞ F (2020). The Trinity of Matrix Metalloproteinases, Inflammation, and Cancer: A Literature Review of Recent Updates. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* **19**:206-221.

ÖZTEMUR Y, AYDOS A, GÜR DEDEOĞLU B (2015).Combination of breast cancer microarray data by using bioinformatic methods - Meta-analysis approaches. *Turk Hij Den Biyol Derg* **72**:155-62.

PAGE-MCCAW A, EWALD AJ, WERB Z (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:221-233.

PALMER ML, TSANGARIS TN (1993).Breast biopsy in women 30 years old or less. *Am J Surg* **165**:708–712.

PARK E, PARK MH, NA HS, CHUNG J (2015). Xylitol induces cell death in lung cancer A549 cells by autophagy. *Biotechnol Lett.* **37**(5):983-90.

PARKS WC, WILSON CL, LOPEZ-BOADO YS (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **4**:617-629.

PELLIKAINEN JM, ROPPONEN KM, KATAJA VV, KELLOKOSKI JK, ESKELINEN MJ, KOSMA VM (2004). Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res* **10**:(22)7621-8.

Pubchem, (2023). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Galactitol> [Erişim tarihi:25.01.2023]

RADISKY ES, RADISKY DC (2007). Stromal induction of breast cancer: inflammation and invasion. *Rev Endocr Metab Disord* **8**:(3)279-87.

RADISKY ES, RADISKY DC (2010). Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**:(2) 201- 12.

RICE T, ZANNINI E, ARENDT EK, COFFEY A (2019). A review of polyols biotechnological production, food applications, regulation, labeling and health effects. *Critical reviews in food science and nutrition* **60**:2034-2051.

ROCCA GL, PUCCI-MINAFRA I, MARRAZZO A, TAORMINA P, MINAFRA S (2004). Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. *British Journal of Cancer* **90**:1414–1421.

ROY R, YANG J, MOSES AM (2009). Matrix Metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol* **27**:5287-5297.

SCHMADEKA R, HARMON BE, SINGH M (2014). Triple-negative breast carcinoma: Current and emerging concepts. *Am. J. Clin. Pathol.* **141**:462–477.

SEKHON BS (2010). Matrix metalloproteinases –an overview. *Research and Reports in Biology* **1**:1–20

SINGLETARY SE, CONNOLLY JL (2006). Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin* **56**:(1)37-47.

SHAPIRO SD (1998). Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol.* **10**:602-608.

SOULE HD, VAZGUEZ J, LONG A, ALBERT S, BRENNAN M (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* **51**(5): p. 1409-16.

SORLIE T, TIBSHIRANI R, PARKER J, HASTIE T, MARRON JS, NOBEL A, DENG S, JOHNSEN H, PESICH R, GEISLER S, DEMETER J, PEROU CM, LØNNING PE, BROWN PO, BØRRESEN-DALE AL, BOTSTEIN D (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc N Acad Sci.* **100**(14):18-23.

STOCKERT JC, BLÁZQUEZ-CASTRO A, ETE MC, HOROBIN RW, VILLANUEVA A (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica* **114**:785–796

YOULDEN DR, CRAMB SM, YIP CH, BAADE PD (2014). Incidence and mortality of female breast cancer in the Asia-Pacific region. *Cancer Biol Med* **11**(2):101–115.

Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı Türkiye Kanser İstatistikleri 2017, www.kanser.gov.tr. [Erişim Tarihi : 04.02.2020]

VANDE WALLE L, LAMKANFI M, VANDENABEELE P (2008). The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: An overview. *Cell Death Differ.* **15**:453–460.

VANDENBROUCKE RE, LIBERT C (2014). Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**:904–927.

VISSE R, NAGASE H (2003). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res* **92**:827-839

VOUSDEN KH, LU X. (2002). Live or let die: the cells response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**:594- 604.

VU TH, WERB Z (2000). Matrix Metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes. Dev.* **4**(17): 2123-2133.

YI E, KIM Y (2013). Xylitol inhibits in vitro and in vivo angiogenesis by suppressing the NF- κ B and Akt signaling pathways. *International Journal Of Oncology* **43**: 315-320

YOUSEF EM, TAHIR MR, ST-PIERRE Y, GABOURY LA (2014). MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. *BMC Cancer* **14**:(1)609

ZHANG Y, WANG H, LI F, XU X, CHEN B, ZHANG T (2018). Inhibitory effects of Dulcitol on rat C6 glioma by regulating autophagy pathway. *Nat. Prod. Res.*, **1**:5 1478-6419.

XUE L, LI C, WANG YK, JIANG K, GAI XD (2014). Sorbitol induces apoptosis of human colorectal cancer cells via p38 MAPK signal transduction. *Oncology Letters* **7**: 1992-1996.

WHIBLEY C, PHAROAH PDP, HOLLSTEIN M (2009). p53 Polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer* **9**(2):95-107

WOESSNER JF (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J*, **5**:2145-2154.