



**POLİDATİN 'İN MEME KANSERİ ÜZERİNDEKİ ANTİ-PROLİFERATİF VE
APOPTOTİK ETKİSİNİN UZUN KODLANMAYAN RNA'LAR ÜZERİNDEN
İNCELENMESİ**

Doktora Tezi

Canan YILMAZ KAPANCIK

Eskişehir, 2024

**POLİDATİN 'İN MEME KANSERİ ÜZERİNDEKİ ANTI-PROLİFERATİF VE
APOPTOTİK ETKİSİNİN UZUN KODLANMAYAN RNA'LAR ÜZERİNDEN
İNCELENMESİ**

Canan YILMAZ KAPANCIK

DOKTORA TEZİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zerrin SELLER

Eskişehir Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Haziran 2024

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 2104S013 no.lu doktora proje kapsamında ve 1002 TÜBİTAK Acil Destek (123Z026) ile desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Canan YILMAZ KAPANCIK'ın " Polidatin'in Meme Kanseri Üzerindeki Anti-Proliferatif ve Apoptotik Etkisinin Uzun Kodlanmayan RNA'lar Üzerinden İncelenmesi" başlıklı tezi 24.06.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyokimya Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)		
Üye		
Üye		
Üye		..
Üye		..
		..

Prof. Dr. Saime ÖNCE
Enstitü Müdürü

ÖZET

POLİDATİN'İN MEME KANSERİ ÜZERİNDEKİ ANTİ-PROLİFERATİF VE APOPTOTİK ETKİSİNİN UZUN KODLANMAYAN RNA'LAR ÜZERİNDEN İNCELENMESİ

Canan YILMAZ KAPANCIK

Biyokimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Haziran 24

Danışman: Prof. Dr. Zerrin SELLER

Kanser neden olduğu ölüm oranları bakımından kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada bulunmaktadır. Meme kanseri kadınlar arasında en sık tanı alan ve en çok ölüme neden olan kanser türüdür.

Polidatin (PD), *Polygonum cuspidatum* bitkisinden ekstrakte edilmektedir. PD 'nin çeşitli kanser türlerine ait tümörlerde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir.

Uzun kodlanmayan RNA 'lar (LncRNA), proliferasyon ve apoptoz ile ilişkili genlerin ifadelerini epigenetik olarak değiştirerek kanserin oluşumuna ve ilerlemesine aracılık ederler.

Tez çalışmamızda, PD 'in farklı dozları uygulanan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 24 ve 48. saatteki % canlılıkları ve IC₅₀ dozları belirlendi. 24 saat IC₅₀ dozu uygulanan MCF-7 hücrelerinde mikroyarray aracılığıyla yapılan LncRNA ekspresyon taramasında en dramatik değişimin LncRNA SLC9A3-AS1 'de olduğu saptandı. LncRNA SLC9A3-AS1 'in proliferasyon ve apoptoz genleri üzerine etkisi, LncRNA SLC9A3-AS1 geni susturulduktan sonra RT-PCR aracılığıyla incelendi. RT-PCR analizi sonucunda SLC9A3-AS1-siRNA transfekte edilmiş MCF-7 hücre hatlarında proliferasyon (JAK2, NRAS, TP73, RASSF1, BRCA1 ve HGF) ile ilişkili ve apoptoz (TRAF2, AIFM1, APAF1, TP53, HRK, NFKB1 ve CASP2) ile ilişkili genlerin ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gösterdiği belirlendi (p<0.05). Annexin V-FITC kiti ve TUNEL kiti aracılığıyla da SLC9A3-AS1-siRNA transfekte edilmiş MCF-7 hücre hatlarında apoptotik hücre sayısının artış gösterdiği saptandı.

Anahtar Sözcükler: Uzun kodlanmayan RNA SLC9A3-AS1, Meme kanseri, Polidatin, Apoptoz.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTIPROLIFERATIVE AND APOPTOTIC EFFECT OF POLYDATIN ON BREAST CANCER VIA LONG NON-CODING RNAS

Canan YILMAZ KAPANCIK

Department of Biochemistry

Anadolu University, Postgraduate Education Institute, June 2024 Supervisor:

Prof. Dr. Zerrin SELLER

Cancer ranks second after cardiovascular diseases in terms of death rates. Breast cancer is the most frequently diagnosed type of cancer and causes the most deaths among women.

Polydatin (PD) is extracted from the *Polygonum cuspidatum* plant. PD has been shown to inhibit cell proliferation and induce apoptosis in tumors of various types of cancer.

Long non-coding RNAs (LncRNA) mediate the formation and progression of cancer by epigenetically changing the expression of genes related to proliferation and apoptosis.

In our thesis study, % viability and IC₅₀ doses at 24 and 48 hours were determined in MCF-7 breast cancer cells applied with different doses of PD. In the LncRNA expression screening performed via microarray in MCF-7 cells applied with IC₅₀ dose for 24 hours, the most dramatic change was found to be in LncRNA SLC9A3-AS1. The effect of LncRNA SLC9A3-AS1 on proliferation and apoptosis genes was examined by RT-PCR after silencing the LncRNA SLC9A3-AS1 gene. As a result of RT-PCR analysis, it was determined that the expressions of proliferation-related (JAK2, NRAS, TP73, RASSF1, BRCA1 and HGF) and apoptosis-related (TRAF2, AIFM1, APAF1, TP53, HRK, NFkB1 and CASP2) genes showed a statistically significant change in SLC9A3-AS1-siRNA transfected MCF-7 cell lines ($p < 0.05$). It was determined that the number of apoptotic cells increased in MCF-7 cell lines transfected with SLC9A3-AS1-siRNA through the Annexin V-FITC kit and TUNEL kit.

Keywords: Long Non-Coding RNA SLC9A3-AS1, Breast cancer, Polydatin, Apoptosis

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca emeğini esirgemeyen, sabırla ve ilgiyle değerli zamanını bana faydalı olmak için harcayan, her zaman yol gösterici olan, mesleki hayatımdanengin bilgilerinden ve tecrübesinden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli ve saygıdeğer hocam Prof.Dr. Zerrin SELLER'e,

Çalışmamda hem deneysel süreçlerde hem de tez yazımında desteğini benden esirgemeyen, sevgili eşim Dr. Serkan KAPANCIK'a, annesine pozitif enerjisiyle motivasyon vererek çalışmasını sağlayan kıymetli oğluma,

Her zaman ve her koşulda desteklerini hissettiren, doktora beni teşvik eden sevgili Ailem'e,

Tez çalışmasını maddi olarak destekleyen Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (AÜBAP) Komisyonu'na ve TÜBİTAK'a,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Canan YILMAZ KAPANCIK

İÇİNDEKİLER

Sayfa

DOKTORA TEZİ	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGE VE KISATLAMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Araştırma Konusunun Tanımı	1
1.2. Önemi.....	2
1.3. Amacı	2
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser Biyolojisi	3
2.2. Meme Kanseri	9
2.2.1. Meme kanseri risk faktörleri	12
2.2.1.1. Cinsiyet.....	12

2.2.1.2.	Yaş	12
2.2.1.3.	Genetik mutasyonlar	13
2.2.1.4.	<i>Hormonal faktörler</i>	13
2.2.1.5.	Obezite	14
2.3.	Polidatin	15
2.3.1.	Polidatin'in farmakojik etkileri	16
2.3.1.1.	Kalp kası hücreleri üzerindeki etkiler	16
2.3.1.2.	Anti-arteriyoskleroz etkiler	17
2.3.1.3.	Nöroprotektif aktivite	17
2.3.1.4.	Antiinflatuar aktivite	17
2.3.1.5.	Anti-oksidatif aktivite	18
2.3.1.6.	Anti-tümör aktivitesi	18
2.4.	Uzun Kodlanmayan RNA'lar	21
2.4.1.	SLC9A3-AS1 (LOC100288152) SLC9A3 antisense RNA 1	25
3.	YÖNTEM	27
3.1.	Hücre Hattı	27
3.2.	Materyaller	27
3.2.1.	Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler	27
3.2.2.	Ekipmanlar	28
3.2.3.	Kullanılan ticari kitler	29
3.2.4.	Kullanılan bilgisayar programları	30
3.2.5.	Polidatin bileşiğinin çözündürülmesi ve hazırlanması	30
3.2.6.	Hücre kültürü	30
3.2.7.	Sitotoksite belirleme testi	30
3.2.7.1.	MTT yöntemi ile polidatinin IC ₅₀ dozunun belirlenmesi	30
3.2.8.	Akridin Oranj (AO) ve Etidyum Bromür (EB) boyama ile apoptozun belirlenmesi	31
3.2.9.	RNA izolasyonu	31
3.2.10.	cDNA sentezi	32
3.2.11.	Mikroarray aracılığıyla lncRNA ekspresyon düzeylerinin	

taranması	33
3.2.12. Gen ifadelerinin analizi.....	33
3.2.12.1. Gen ifadelerinin belirlenmesi	34
3.2.12.2. Gen ifadelerine ait verilerin analizi.....	34
3.2.13. LncRNA SLC9A3-AS1 'in siRNA aracılığıyla susturulması.....	34
3.2.14. İnsan apoptoz RT ² Profiler™ PCR Array ve insan onkogenler ve tümör süpresör genler RT ² Profiler™ PCR Array kit aracılığıyla proliferasyon ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon profillerinin belirlenmesi	35
3.2.15. Apoptoz düzeylerinin flow sitometri cihazı aracılığıyla belirlenmesi 36	
3.2.16. TUNEL analizi.....	37
3.2.17. İstatistiksel analiz	38
4. BULGULAR VE YORUM.....	39
4.1. Polidatin'in Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi.....	39
4.2. Akridin Oranj (AO) ve Etidyum Bromür (EB) Boyama ile Apoptozun Belirlenmesi	41
4.3. Mikroarray Aracılığıyla lncRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi ..	42
4.4. SLC9A3-AS1 'in Susturma İşleminin Başarısının Belirlenmesi	44
4.5. Proliferasyon ve Apoptoz ile ilişkili genlerin profillerinin belirlenmesi.....	50
4.6. MTT Yöntemi Aracılığıyla Susturma Sonrası % Canlılık Değerlerinin Belirlenmesi	57
Susturma işleminden 24 saat sonra MCF-7 meme kanseri hücrelerinin % canlılık değerleri MTT yöntemi aracılığıyla belirlenmiştir (Şekil 4.13.).....	57
4.7. Flowsitometre yöntemi ile Apoptoz düzeyinin belirlenmesi.....	58
Tüm MCF-7 meme kanseri hücre gruplarındaki erken apoptoz düzeyleri, yapılan transfeksiyon ve IC50 PD uygulaması işlemlerinden 24 saat sonra Muse Annexin V apoptoz kiti aracılığıyla saptanmıştır (Şekil 4.14.).....	58
4.8. TUNEL analizi	60

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER..... 61

KAYNAKÇA..... 78

EKLER

ÖZGEÇMİŞ



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 3. 1. Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler.....	27
Tablo 3. 2. Ekipmanlar.....	28
Tablo 3. 3. Kullanılan ticari kitler.....	29
Tablo 3. 4. Kullanılan bilgisayar programları.....	30
Tablo 3. 5. RNA izolasyon basamaklarındaki işlemler.....	32
Tablo 3. 6. cDNA sentez reaksiyon karışımının hazırlanması.....	33
Tablo 3. 7. RT-PCR reaksiyon karışımı.....	34
Tablo 3. 8. DNA amplifikasyonunun koşulları.....	34
Tablo 4. 1. IC80 Polidatin dozu uygulanan MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki mikroarray sonucu dramatik ekspresyon değişimi olan uzun kodlamayan RNA ‘lar	43
Tablo 4. 2. IC50 Polidatin dozu uygulanan MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki mikroarray sonucu	44
Tablo 4. 3. Her bir hücre örneğindeki genlerin ortalama Ct değerleri	46
Tablo 4. 4. Her bir hücre örneğindeki genlerin ortalama Ct değerleri	49
Tablo 4. 5. MCF-7 hücrelerinde proliferasyon ile ilişkili genlerin ifade edilme kat regülasyonları.....	51
Tablo 4. 6. MCF-7 hücrelerinde apoptoz ile ilişkili genlerin ifade edilme kat regülasyonları.....	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Tirozin kinaz reseptör aktivasyonu	7
Şekil 2. 2. Apoptoz mekanizmaları	9
Şekil 2. 3. 2022 yılında en sık oranda tanı alan % kanser türleri	10
Şekil 2. 4. 2022 yılında kanser türlerinin % ölüm oranları.....	11
Şekil 2. 5. 2022 yılında kadınlar arasında en sık oranda tanı alan % kanser türleri	11
Şekil 2. 6. 2022 yılında kanser türlerinin kadınlar arasındaki % ölüm oranları	12
Şekil 2. 7. Polidatinin kimyasal yapısı	15
Şekil 2. 8. Polidatinin Apoptoz ve Otofaji Üzerine Etkisi.....	20
Şekil 2. 9. SLC9A3-AS1 geninin genomik yerleşimi	25
Şekil 2. 10. SLC9A3-AS1 Geninin normal insan dokularındaki mRNA ekspresyonu..	26
Şekil 4. 1. 24 saat boyunca Polidatin' in 0-500 µmol/L arasındaki dozlarına maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin % Canlılık değerleri.....	39
Şekil 4. 2. 24 saat boyunca Polidatin' in 0-500 µmol/L arasındaki dozlarına maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin IC50 grafiği	40
Şekil 4. 3. 48 saat boyunca Polidatin' in 0-500 µmol/L arasındaki dozlarına maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin % Canlılık değerleri.....	40
Şekil 4. 4. Polidatin varlığında 24 saat sonra AO/EB ile boyanmış MCF-7 hücrelerinde canlı ve apoptotik hücre görüntüleri	42
Şekil 4. 5. 24. saat lncRNA SLC9A3-AS1 gen amplifikasyon örnek eğrileri	45
Şekil 4. 6. 24. saat örnek erime eğrileri	45
Şekil 4. 7. MCF-7 hücre hatlarında SLC9A3-AS1 'in ifade edilme düzeyleri	47
Şekil 4. 8. 48. saat lncRNA SLC9A3-AS1 gen amplifikasyon örnek eğrileri	48
Şekil 4. 9. 48. saat örnek erime eğrileri	48
Şekil 4. 10. MCF-7 hücre hatlarında SLC9A3-AS1 'in ifade edilme düzeyleri	50
Şekil 4. 11. MCF-7 hücre hatlarında proliferasyon ile ilişkili genlerin ifade edilme düzeyleri.....	53
Şekil 4. 12. MCF-7 hücre hatlarında apoptoz ile ilişkili genlerin ifade edilme düzeyleri	56
Şekil 4. 13. MCF-7 hücre hatlarının % canlılık düzeyleri	57
Şekil 4. 14. MCF-7 hücre hatlarındaki apoptoz düzeyleri.....	58
Şekil 4. 15. TUNEL analizi	60

SİMGE VE KISATLAMALAR DİZİNİ

AIFM1	: Apoptosis Inducing Factor Mitochondria Associated 1 (Mitokondri ile İlişkili Apoptoz Tetikleyici Faktör 1)
AKT	: Serin/Treonin Protein Kinaz
AO	: Akridin Oranj
Apaf-1	: Apoptotic Protease Activating Factor-1 (Apoptoz Proteaz Aktive Edici Faktör 1)
APC	: Adenomatöz Polipozis Koli
ApoA1	: Apolipoprotein-1
AS	: Ateroskleroz
ATP	: Adenozin tri fosfat
A β	: Amiloid- β peptit
Bax	: Bcl2 ile ilişkili X, apoptoz düzenleyicisi
Bcl2	: Bcl2 apoptoz düzenleyicisi
BRCA1	: Breast Cancer 1 (Meme Kanseri 1)
CAT	: Katalaz
Caspaz	: Apoptosis-associated Cysteine Peptidase (Apoptozla ilişkili Sistein Peptidaz)
CCAT-1	: Colon Cancer Associated Transcript 1 (Kolon Kanseriyle İlişkili Transkript 1)
CDK	: Sikline bağımlı Protein Kinaz
CNE	: Nazofarinks Karsinom
CPK	: Kreatin Fosfokinaz
Creb	: CAMP yanıt element bağlayıcı
DGCR5	: Drosha ve DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 5
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimelsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNMT-1	: DNAMetiltransferaz
E2F	: Eukaryote Transcription Factor (Ökaryot Transkripsiyon Faktörü)
EB	: Etidyum Bromür
ECM	: Extracellular Matrix (Hücre dışı Matriks)
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor (Epidermal Büyüme Faktörü)

	Reseptörü)
EMT	: Epithelial Mesenchymal Transition (Epitel Mezenkimal Geçiş)
ER	: Endoplazmik Retikulum
ER	: Östrojen Reseptörü
FBS	: Fetal Bovine Serum(Fetal sığır Serumu)
FGFR2	:Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 2)
FN	: Fibronektin
GMC	: Glomerular Mezengiya
GRB2	:Growth Factor Receptor Bound Protein 2 (Büyüme Faktörü Reseptörüne bağlı Protein 2)
GTP	: Guanozin Tri Fosfat
HGF	: Hepatocyte Growth Factor (Hepatosit Büyüme Faktörü)
HER2	: Human Epidermal Receptor 2 (İnsan Epidermal Reseptör 2)
HIF-1	: Hipoksi-İndüklenebilir Faktör-1
IC ₅₀	: Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan doz
JAK2	: Jonus Tirozin Kinaz 2
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LLC	: Lewis Akciğer Karsinomu
LncRNA	: Uzun Kodlamayan RNA
LUCAT-1	: Lung Cancer Associated Transcript 1 (Akciğer kanseriyle ilgili transkript 1)
MALAT-1	:Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1 (Metastazla İlişkili Akciğer Adenokarsinomu Transkripti 1)
MAPK	: Mitojenle Aktive olan Protein Kinaz
MC	: Miyokardiyal Hücreler
MCF-7	: Meme Kanseri Hücre Hattı MDA: Malondialdehit
miRNA	: mikroRNA
MTT	: 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid
Myc	: Proto-onkogen
NSCLC	:Non-Small Cell Lung Cancer (Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri)
p53	: p53 proteini

PD	: Polidatin
PDGFR	: Platelet Growth Factor Receptor (Trombosit Büyüme Faktörü Reseptörü)
PI3K	: Fosfatidil İnozitol 3-Kinaz
PR	: Progesteron Reseptörü
PRC2	: Role of the Polycomb Repressive Complex 2 (Polycomb Baskılayıcı Kompleks 2)
RAS	: G-proteini türünde bir proto-onkogen
RB	: Retinoblastoma Protein
RCC	: Renal Cell Carcinoma (Böbrek hücreli karsinom)
RISC	: RNA ile İndüklenen Susturucu Kompleks
RNA	: Ribonükleik Asit
RT-PCR	: Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SH-2	: Src-Hematoloji-2
SMMC-7721	: Hepatoma Hücre Dizisi
SOD	: Süperoksitdismutaz
ST20	: Tümör Baskılayıcı Gen 20
STAT3	: Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü 3)
TERRA	: Telomeric Repeat-Containing RNA (Telomerik Tekrar İçeren RNA)
TCF	: Tümör Hücresi Faktörü
TG	: Trigliserit
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TUG1	: Taurine Upregulated Gene 1 (Taurin yukarı regüle edilmiş gen 1)
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)
XIST	: X-Inaktif Spesifik Transkript

1. GİRİŞ

1.1 Araştırma Konusunun Tanımı

Kanser oldukça karmaşık ve çok yönlü olarak ortaya çıkan bir hastalıktır. DNA’da meydana gelen mutasyonlar ve epigenetik farklılaşmalar hücre bölünmesini teşvik eden onkogenlerin ifadesini artırarak aktive duruma gelmesine ve bunun yanında tümör baskılayıcı genlerin ifadesini baskılayarak apoptozun indüklenmesine aracılık ederek kanserin ortaya çıkışına neden olur (Katti vd., 2022).

Meme kanseri kadınlar arasında oldukça sık görülen ve farklı genetik temelleri nedeniyle farklı şekillerde ortaya çıkan bir kanser türüdür. Meme tümörleri duktal hiperproliferasyon ile başlayıp kanser başlatıcı faktörlerle uyarılma sonucu benign hatta malign tümörlere dönüşür (Barzaman vd., 2020). 2022 yılında en sık ikinci sırada tanı alan kanser türü % 11,6 oranı ile meme kanseridir. 2022 yılında kanser nedeniyle meydana gelen ölümlerin ise % 6,9 oranı meme kanseri nedeniyle meydana gelmektedir. Meme kanseri kadınlar arasında en sık olarak rastlanılan kanser türü olmasının yanında kanser nedeniyle meydana gelen ölümler açısından da ilk sırada yer almaktadır (ME vd., 2024). Meme kanserini oluşturan en önemli risk faktörlerinden ilki cinsiyet ve yaş ile ilişkili faktörlerdir (Łukasiewicz, 34).

Polidatin ($C_{20}H_{22}O_8$, 3,4,5-trihidroksistilben-3-b-dglucopyranoside) (PD), *Polygonum cuspidatum* bitkisinin kökü ve rizomundan ekstrakte edilen, glikozit grubunun C-3 pozisyonuna bağlandığı ve bir hidroksil grubunun yerini aldığı aktif bir bileşendir (Chen vd., 2017). Glikoz taşıyıcılarını kullanan aktif bir mekanizma ile hücre içine girer. PD antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi aracılığıyla önemli farmakolojik etkilere sahip olan bir bileşiktir (Du vd., 2013).

Uzun kodlamayan RNA (LncRNA)’lar DNA’nın ifade edilmesi ile sentez edilmektedirler. 200 nükleotidden daha yüksek sayıda nükleotit içeren lncRNA’lar, protein molekülünü kodlamayan RNA’ların önemli bir parçasını meydana getirmektedir. LncRNA’lar görevlerini yerine getirebilmek için DNA’da değişimler meydana getirmeden epigenetik, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel yolları kullanarak genlerin ekspresyonlarını değiştirmektedir. LncRNA’lar meydana getirdikleri epigenetik düzensizlikler aracılığıyla kanserden, nörolojik hastalıklara ve kalp damar hastalıklarına kadar farklı birçok hastalığın oluşumuna moleküler zemin hazırlamaktadır

(Bhan vd., 2017; Hauptman ve Glavač, 2013).

1.2. Önemi

Meme kanserinin tedavisi konusunda son zamanlardaki teknolojik gelişmelere bağlı olarak ilaç çeşitliliği ve sayısındaki artışlar ile birlikte, meme kanseri hastalarının bu yeni tedavi olanaklarına yanıt oranları her ne kadar yüksek olsa da, kadınlarda kanser nedeniyle meydana gelen ölümler arasında meme kanseri halen ilk sırada yer almaktadır (Burguin vd., 2021; ME vd., 2024). Bununla birlikte, meme kanseri hastalarında kullanılan tedaviler sonucunda tümör küçülüp kaybolrsa bile, hastaların çoğunun tümörleri nüksetmekte ve kullanılan tedaviye karşı direnç meydana gelmektedir (Pedersen vd., 2022; Lainetti vd., 2020). Bu nedenle, meme kanserinin daha etkili bir şekilde tedavi edilebilmesi için yeni terapötik moleküllerin bulunması amacıyla meme kanseri konusunda yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

LncRNA'lar, gen ifadelerini epigenetik olarak değiştirerek kanserin oluşumunda ve ilerlemesinde rol oynarlar. İnsanda eksprese edilen onbinlerce LncRNA mevcuttur (Kondo vd., 2017). Ancak bunların bir çoğunluğu diğer kanser türlerinde olduğu gibi meme kanserinde de araştırılmamıştır. Meme kanserinde LncRNA'ların anti-kanser etkisinin belirlenebilmesi ve etki mekanizmasının aydınlatılması hastalığın tedavisinde yeni stratejilerin ortaya konulabilmesi açısından büyük öneme sahiptir.

1.3. Amacı

Kadınlar arasında en sık görülen ve diğer kanser türleriyle kıyaslandığında en fazla ölüme neden olan meme kanserinde PD uygulaması ile oluşan muhtemel anti- kanser etki mekanizmasının lncRNA'lar üzerinden biyolojik rollerinin aydınlatılması amacıyla, tez çalışmamızda PD uygulamasının lncRNA'lar üzerinden hücre proliferasyonu ve apoptozdaki rollerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, meme kanserinde PD'in olası anti-kanser etkisini lncRNA'lar üzerinden hangi biyolojik mekanizmalar ile gerçekleştirdiğinin ortaya konulması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Biyolojisi

Kanser karmaşık ve çok yönlü olarak ortaya çıkan bir hastalıktır. DNA’da meydana gelen mutasyonlar ve epigenetik farklılaşmalar hücre bölünmesini teşvik eden onkogenlerin ifadesini artırarak, aktive duruma gelmesine ve bunun yanında tümör baskılayıcı genlerin ifadesinin durdurarak, etkisiz hale gelmesine aracılık eder ve kanserin ortaya çıkışına neden olur. DNA’daki mutasyonlar ya da epigenetik farklılaşmalar sonucu meydana gelen gen ifadelerindeki değişimler, kanser hücrelerinin tüm organizma koşullarına uyum sağlayarak çoğalmalarına olanak vermektedir. Ayrıca kanser hücreleri gen ifadelerindeki bu değişimler aracılığıyla büyüme ve çoğalmalarına imkân sağlayacak şekilde metabolizma süreçlerini ve hızlarını da düzenlemektedirler (Katti vd., 2022).

Kanser hücrelerinin hızlı ve kontrolsüz olarak bölünebilmesi için normalde sıkı bir şekilde kontrol edilen hücre döngüsünün dengesi bozulmaktadır. Hücre döngüsünü kontrol eden genlerde meydana gelen mutasyonlar ya da epigenetik yollar aracılığıyla bu genlerin ifadelerinde oluşan farklılıklar, hücre döngüsünün dengesinin bozulmasına ve hücrelerde sürekli bölünme durumunun oluşmasına neden olmaktadır. Hücre döngüsü iki ana süreç üzerinden yürümektedir. Bunlardan birincisi, hücrenin genetik bilgisinin taşındığı DNA’nın replikasyonu ikincisi ise, tek bir hücrenin bölünerek iki yavru hücre meydana getirmesi sürecidir. Kanser hücrelerinin kontrolsüz bölünebilmesi hücre döngüsünün kontrol basamaklarından birçoğunun hücrelerdeki genetik mutasyonlar aracılığıyla işlevsiz hale gelmesi ile mümkün olmaktadır. Normalde hücrelerde genetik kusurlar ortaya çıktığında hücre döngüsünün DNA hasarı kontrol basamakları tarafından hücre bölünmesi durdurulur, böylelikle genetik kusurlu yavru hücrelerin ortaya çıkması engellenir. Ancak, kanserli hücrelerde mutasyonlarda artış olsa bile hücre döngüsü kontrolü kaybedildiği için DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. Bu durum, hücrelerde DNA hasarının yavru hücrelere taşınmasına ve bu yavru hücrelerde de oluşacak mutasyonlar ile birlikte gelecek kuşak hücrelerde DNA hasarının birikmesine neden olmaktadır (Kops vd., 2004).

Hücrelerde onarılamaz bir şekilde DNA hasarı oluştuğunda hücre döngüsü aşamasında DNA hasarı kontrol basamağında p53 tümör baskılayıcı proteinine bağımlı yolların aracılık ettiği süreçle hücreler geri dönülemez şekilde hücre döngüsünden çıkarılarak, programlı hücre ölümü yolu olan apoptoza yönlendirilmektedir (Zilfou ve

Lowe, 2009). Kanserde çok sık olarak görülen p53 geninde meydana gelen mutasyonlar nedeniyle hücre döngüsündeki DNA kontrol basamağı işlemediği için kanserli hücreler biriken DNA hasarlarına rağmen hücre döngülerinin ilerlemesine devam edebilmektedirler. p53 genindeki mutasyonlar sebebiyle hücre döngüsü ilerlese bile ökaryot transkripsiyon faktörü (E2F) aktivasyonunun düzenlenmesi aracılığıyla da hücreler, hücre döngüsünden çıkmaktadır. Ancak kanserli hücrelerin çoğunda E2F aktivasyonuna neden olan mutasyonlar da ortaya çıktığı için hücreler hücre döngüsünün S fazına geçişine teşvik edilmektedir. Kanserli hücrelerin hücre döngüsünün S fazına geçişi hücre döngüsünden çıkışı tehlikeye attığı gibi hücrelerin apoptoza gidişini de engellemektedir (Zilfou ve Lowe, 2009; Chen vd., 2009).

Tümör büyümesinin devam edebilmesi tümörü oluşturan hücrelerin kanser mikro ortamını oluşturarak vasküler endotel büyüme faktörleri (VEGF) ile yeni damar oluşturmaya, bunun sonucu olarak tümör dokusundaki besin ve enerji ihtiyacının sağlanabilmesine bağlıdır. Hücre çoğalma sürecini gerçekleştiren hücre döngüsünün ilerleyebilmesi ise, öncelikli olarak bir serin/treonin protein kinaz olan siklin bağımlı kinaz (CDK) aktivitesi ile ilişkilidir. CDK aktivitesinin artması, hücre döngüsünü hızlandırdığı için birçok kanserin patogenezinde karşılaşılan bir durumdur. Bu nedenle, kanserin tedavisinde CDK inhibitörleri büyük önem taşımaktadır. CDK inhibitörleri tarafından hücreler, hücre döngüsünden çıkarılarak hücre çoğalmasının engellenmesi mümkün olmaktadır (Cui vd., 2023; Malumbres ve Barbacid, 2009).

Kanser, organizmada anormal hücre büyümesi ile ortaya çıkmasına rağmen hastalık genetik temellere dayanmaktadır. Kanserde miras alınan genetik defektlerin yanında çevresel faktörler aracılığıyla edinilen yeni genetik defekt ya da mutasyonlar aracılığıyla hastalık ortaya çıkmaktadır. Organizmayı oluşturan hücreler bölünüp çoğalabilmek ve farklılaşmak için proto-onkogenlere, bölünmelerinin kontrollü bir şekilde devam ettirilmesinin sağlanması içinse tümör baskılayıcı genlere sahiptirler. Bu proto-onkogenler genetik yapı ve çevresel koşulların etkisiyle mutasyonlara uğramakta veya artan ifadeleri aracılığıyla onkogenlere dönüşmektedir. Bununla birlikte, tümör baskılayıcı genler ise mutasyonlar aracılığıyla işlev kaybına uğramakta, bu durum kanser hücrelerinin kontrolsüz bölünme yeteneğine sahip olmasına ve hızlı bir şekilde büyümesine ve hatta zor ortam koşullarında bile hayatta kalmasına neden olmaktadır (Kopnin, 2000; Yang vd., 2007).

Kanserin patogenezinde rol oynayan en önemli onkogenlerden biri transkripsiyon faktörlerini kodlayan düzenleyici genler ve proto-onkogenlerden oluşan MYC genidir. MYC proto-onkogen ailesi c-MYC, n-MYC ve L-MYC nükleer fosfoproteinlerden oluşmaktadır. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan MYC bu yolla hücre bölünmesine ve farklılaşmasına aracılık etmektedir. (Dang, 2012; Amati vd., 1998). C-MYC ile adenomatoz polipozis koli (APC) geninin aktivasyonları birbiriyle zıt olarak çalışmaktadır. Nükleer translokasyon işlemi esnasında C-MYC aktivasyonunun artışı, APC geninin işlevselliğinin kaybına neden olmaktadır. APC geninin işlevselliğinin kaybı ya da azalan ifadesi C-MYC aktivasyonunda artışa aracılık ederek hücrelerde kanserojen bir ifade oluşmasına neden olmaktadır. C-MYC ve APC geni arasındaki ilişki B-kateninin dahil olduğu WNT yolu ile düzenlenmektedir. P-53 geni ise C-MYC 'nin aktivitesini negatif yönde düzenleyerek hücrelerin hızlı bölünüp çoğalmasını engelleyici yönde etki etmektedir (Marandel vd., 2012). C-MYC düzeyi ve aktivasyonunun tümör ile yakın ilişkisi bulunmaktadır. Kanserin birçok çeşidinde C-MYC düzeyi ya da aktivasyonunun artış gösterdiği belirlenmiştir. C-MYC ifadesinde meydana gelen artış genellikle bu gende meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. C-MYC geninde meydana gelen mutasyonlar kanserde en sık olarak karşılaşılan mutasyonlardandır. Bu nedenle kanser tedavisi konusunda yapılan çalışmalarda C-MYC hedef gen olarak seçilmiştir. C-MYC onkogeni hücrelerin apoptoz sürecini de düzenlemektedir. Bu gen apoptozun inhibisyonuna neden olarak hücre bölünmesini teşvik edici yönde etki göstermektedir (Dang, 2012; Duffy vd., 2021).

Hücrelerin kanserleşmesinde önemli olan bir diğer gen ailesi ise, Ras proteinini kodlayan HRAS, KRAS ve NRAS genleridir. Yapılan araştırmalar bu genler içerisinde en sık mutasyona uğrayan KRAS geni olduğunu göstermiştir. Bu gen üzerinde oluşan mutasyon sonucu sıklıkla amino asit dizisinde glisin yerine valin veya aspartat amino asitti gelmektedir. Oluşan KRAS onkogeni tümörün oluşumunda, ilerlemesinde, metabolizmanın kanser hücrelerinin artan ihtiyacına uygun olarak düzenlenmesinde ve metastaz da aktif olarak rol almaktadır (Huang vd., 2021; Prior vd., 2020).

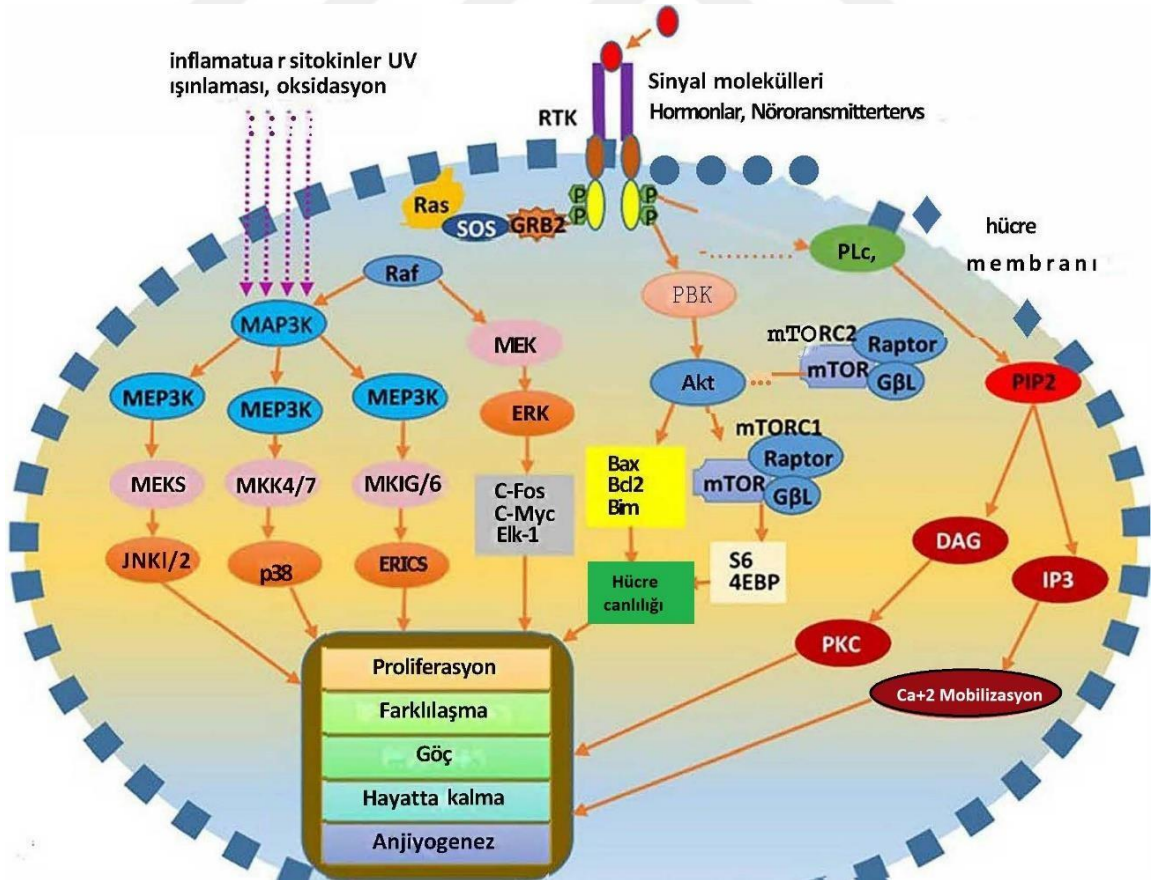
Kanser hücrelerinin hızlı bir şekilde çoğalabilmesi ve uzun süre hayatta kalabilmesi için tümör baskılayıcı genlerin ifadesinin azalmış olması veya mutasyona uğramış olması gerekmektedir. Tümör baskılayıcı genlerin en önemlileri retinoblastoma 1 proteini (RB1) ile p53 proteindir. p53 geninden ifade edilen p53 proteini tetramer

oluşturarak tümör baskılayıcı rolünü gerçekleştirmektedir. Bu tetramerin bir zincirinde bile oluşacak mutasyon p53 proteininin aktivasyonunu engelleyerek kanserojen etki ortaya çıkarır (Muller ve Vousden, 2013; Di Fiore vd., 2013).

Hücre proliferasyonu ile ilişkili olan tirozin kinaz reseptörlerinin de birçok kanser türünde mutasyona uğradığı bilinmektedir. Tirozin kinaz reseptörlerinde meydana gelen mutasyonlar bu reseptörlerin aşırı aktivasyonuna neden olmakta, bunun sonucunda hücrelerde kanserojen aktive ortaya çıkmaktadır. Şu ana kadar tanımlanmış 60 'a yakın tirozin kinaz reseptörü bulunmaktadır. Bunların birçoğu kanserin patogenezi ile ilişkilendirilmektedir. Kanserle ilişkilendirilen tirozin kinaz reseptörlerinden en önemlileri epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), fibroblast büyüme faktör reseptörü (FGFR), Trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) 'dür. Bu reseptörlerin genleri üzerinde oluşan mutasyonlar bu reseptörlere ligand bağlanmamış olsa bile sürekli olarak reseptörün aktivasyonuna neden olmaktadır. Özellikle, EGFR 'ünün sürekli aktivasyonu birçok kanser türünde sıklıkla karşılaşılan bir durumdur (Huang vd., 2020; Oda, 2005).

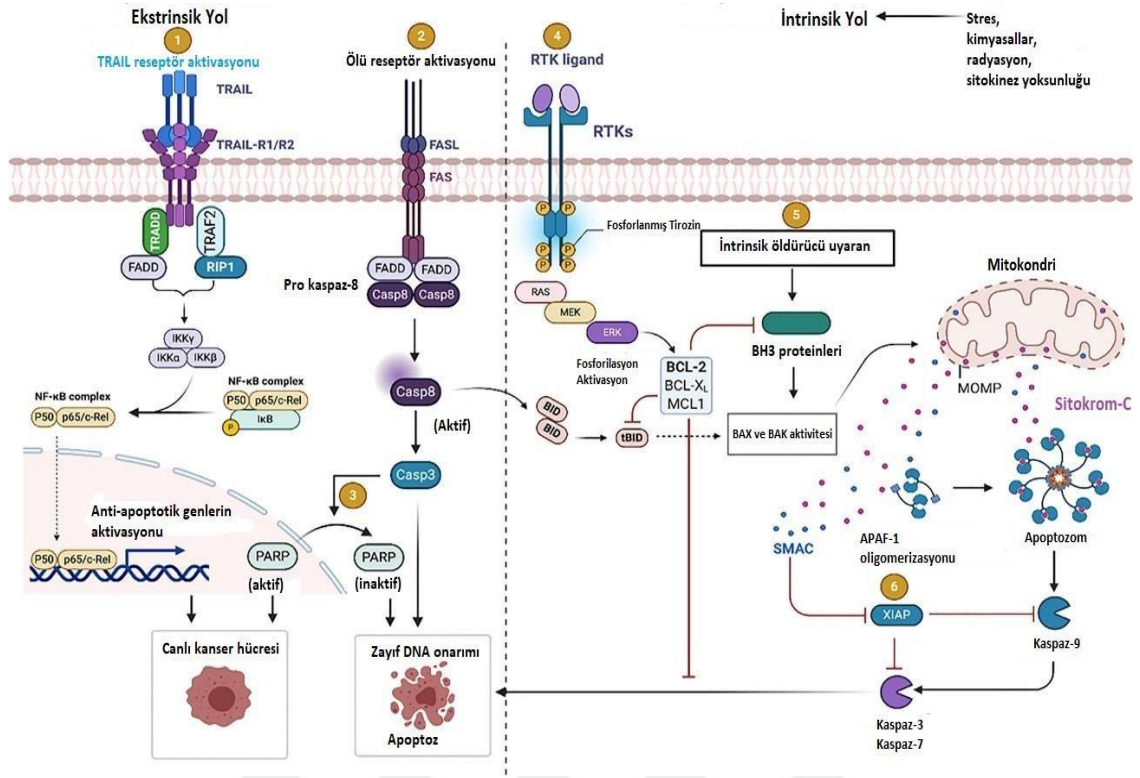
Kanserde kontrolsüz ve sürekli olan tirozin kinaz reseptörünün aktivasyonu reseptörün tirozin kinaz aktivitesi aracılığıyla kendini fosforillemesi ile başlar. Fosforillenen tirozin kalıntılarına farklı adaptör proteinler bağlanarak hücre dışından iletilen sinyalin hücre içine iletimi sağlanmaktadır. Tüm adaptör proteinlerin Src-Homoloji-2 (SH2) bölgesi bulunmakta, bu SH2 bölgeleriyle reseptöre bağlanmaktadır. Tirozin kinaz reseptör aktivitesi fosfataz enzimleri aracılığıyla sonlandırılabilir. Adaptör proteinler fosforile olmuş tirozin kinaz reseptörü ile sitoplazmada bulunan efektör olarak adlandırılan proteinler arasında bağlantının kurulmasında görev almaktadırlar (Blume-Jensen ve Hunter, 2001). Adaptör proteinler aracılığıyla reseptör ile adaptör proteinler arasında bağlantı kurulduğunda sinyal ya mitojenle aktifleşen protein kinazlar (MAPK) yoluna ya da fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) yoluna aktarılır. IP3K/AKT/mTOR yolu hücre büyümesi ve hücre metabolizmasını düzenlerken, RAS/MAPK yolu ise hücre döngüsü, hücre çoğalması ve hücre farklılaşmasını düzenlemektedir. MAPK yolunda, GRB2 adaptör proteini fosforile tirozin kinaz reseptörüne bağlanır, efektör SOS proteini ise GRB2 'ye bağlanır. Efektör protein, GDP bağlı Ras proteininin GTP ile yer değiştirmesini katalize eder. Böylelikle aktif Ras proteini ya da aktif kinaz enzimi ortaya çıkar. Aktif Ras aracılığıyla sinyal ilk olarak Raf-

1 'e ardından MEK 'e son olarak MAPK 'a iletilir. MAPK ise çeşitli proteinlerin fosforile olmasına aracılık ederek sinyalin hücre çekirdeğine ulaştırılmasını sağlar. MAPK aracılığıyla sinyal hücre çekirdeğine ulaştırıldığında hücre çoğalması ve hücrenin hayatta kalması ile ilgili birçok proteinin ifadesinde değişikliklere neden olur. Kanserde sürekli MAPK sinyali olması nedeniyle hücre çoğalmasını teşvik edici faktörlerin artan ifadesi hücre bölünmesini ve çoğalmasını aşırı oranda artırmaktadır (Bahar vd., 2023). PI3K yolunda ise, tirozin kinaz reseptörü aracılığıyla PI3K 'nin aktivasyonu sonucu fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PIP2) 'tan fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3) oluşumu katalizlenir. PIP3 oluşumu, AKT 'yi aktive eder. Aktifleşen AKT ise mTOR sinyalini promote eder. mTOR promote olduğunda hücre döngüsü ve hücre büyümesi ile ilişkili genlerin ifadesinde artışlar meydana gelmekte, bunun sonucu olarak hücre büyümesinde artış olmaktadır. Kanserin bazı türlerinde MAPK yolunda olduğu gibi AKT yolu üzerindeki mutasyonlar da AKT yolunun sürekli olarak aktivasyonuna aracılık ederek hücre büyümesinin aşırı şekilde indüklenmesine neden olmaktadır (Peng vd., 2022) (Şekil 2.1.).



Şekil 2. 1.Tirozin kinaz reseptör aktivasyonu (Huang vd., 2021)

Kanserin oluşumunda hücre çoğalmasında artış olduğu gibi programlı bir ölüm şekli olan apoptoz sürecinde de azalma meydana gelmektedir. Kanseri hücrelerinde apoptoz düzeyindeki azalma apoptoz ile ilişkili genlerin ifadelerinin değişmesi ile oluşmaktadır. Apoptoz ile ilişkili genlerin ifadeleri mutasyonlar aracılığıyla değişebildiği gibi epigenetik yollar aracılığıyla da apoptoz ile ilişkili genlerin ifadelerinde farklılaşmalar olmaktadır (Ghavami vd., 2009; Chen vd., 2014). Hücre apoptoz aracılığıyla ölüm kararını apoptoz ile ilişkili genlerin aktivasyonu ya da hücrede bazı sinyaller yoluyla almaktadır. Hücrede DNA hasarı ile birlikte p53 aktivasyonu da hücrelerin apoptoza gitmesine aracılık etmektedir. Apoptoz hücrelerde ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki yol aracılığıyla mümkün olmaktadır. Ekstrinsik apoptoz yolunda Tümör Nekroz Faktörü (TNF), çeşitli hücre tipleri üzerinde eksprese edilen bir tip II transmembran proteini olan Fas reseptörlerine ligand bağlanması aracılığıyla kaspazların aktive olması ile birlikte apoptoz gerçekleşmektedir. İntrinsik apoptoz yolunda ise, mitokondri organel olarak önemli rol almaktadır. İntrinsik apoptoz yolu Bcl-2'nin inaktive olması ile başlamaktadır. Bcl-2'nin inaktive olması Bax ile Bak aktivasyonu aracılığıyla ilk olarak, aktif kaspaz 9 ardından aktif kaspaz 3'ü oluşturarak hücrede proteinlerin kesilmesi aracılığıyla apoptozun gerçekleşmesine neden olmaktadır. Kanseri patogenezinde apoptozun bu iki yolu üzerindeki proteinlerin ifadelerinin mutasyon veya epigenetik yollar ile değişmesi sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Apoptoz ile ilişkili kaspazlar, Bcl-2 ve Bax protein düzeylerindeki ve aktivitelerindeki farklılaşmalar apoptozun engellenmesi ile kanseri oluşumuna zemin hazırlamaktadır (Ghavami vd., 2009; Chen vd., 2014; Lossi, 2022; Qian vd., 2022) (Şekil 2.2.).

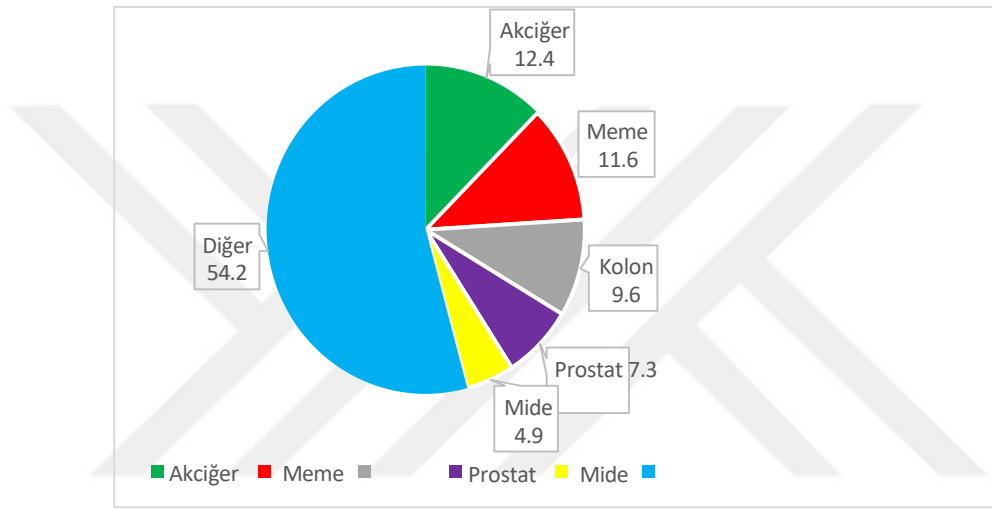


Şekil 2. 2. Apoptoz mekanizmaları (Das vd., 2021)

2.2. Meme Kanseri

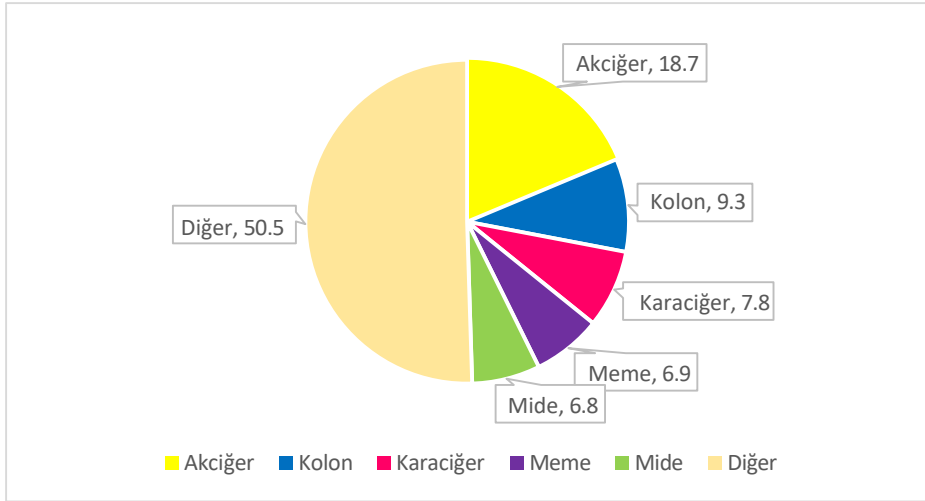
Meme kanseri kadınlar arasında oldukça sık görülen ve farklı genetik temelleri nedeniyle farklı şekillerde ortaya çıkan bir kanser türüdür. Meme tümörleri duktal hiperproliferasyon ile başlayıp kanser başlatıcı faktörlerle uyarılma sonucu benign hatta malign tümörlere dönüşür. Kişilerin genetik yapısı, stromal etkiler veya makrofajlar gibi tümör mikro ortamları, meme kanserinin ortaya çıkışında ve ilerlemesinde önemli role sahiptir (Sun vd., 2017). Meme kanseri histolojik ve genetik temellerine uygun olarak 3 farklı sınıfa ayrılmaktadır. Bunlardan birincisi, östrojen reseptörü (ER⁺) ya da progesteron (PR⁺) reseptörü eksprese eden meme kanseri, ikincisi insan epidermal reseptör 2 (HER2⁺) eksprese eden meme kanseri ve üçüncüsü üçlü negatif (ER⁻, PR⁻, HER2⁻) meme kanseridir. Tanı alan meme kanseri türlerinin yaklaşık % 60 'ı östrojen reseptörü (ER⁺) ya da progesteron (PR⁺) reseptörü eksprese eden meme kanseri türüdür. Yaklaşık olarak % 20 'si ise insan epidermal reseptör 2 (HER2⁺) eksprese eden meme kanseridir. Son olarak yaklaşık % 10-20 'si ise üçlü negatif (ER⁻, PR⁻, HER2⁻) meme kanseridir (Barzaman vd., 2020).

2022 yılına ait kanser ile ilgili dünya genelini kapsayan istatistiklere göre, kanser tanısı alan kişilerin sayısı yaklaşık olarak 20 milyon kişi olduğu bildirilmiştir. Kanser hastalığına sahip 9,7 milyon birey ise bu hastalık nedeniyle hayatlarını kaybetmiştir. İstatistikler her beş kişiden birinin hayatlarının herhangi bir evresinde kansere yakalandığını göstermektedir. 2022 yılında en sık oranda karşılaşılan kanser türü akciğer kanseri olmuştur (% 12,4). İkinci olarak, en sık tanı alan kanser türü meme kanseridir (% 11,6). Bu kanser türlerini kolon kanseri (% 9,6), prostat kanser (% 7,3) ve mide kanseri (% 4,9) izlemektedir (ME vd., 2024) (Şekil 2.3.).



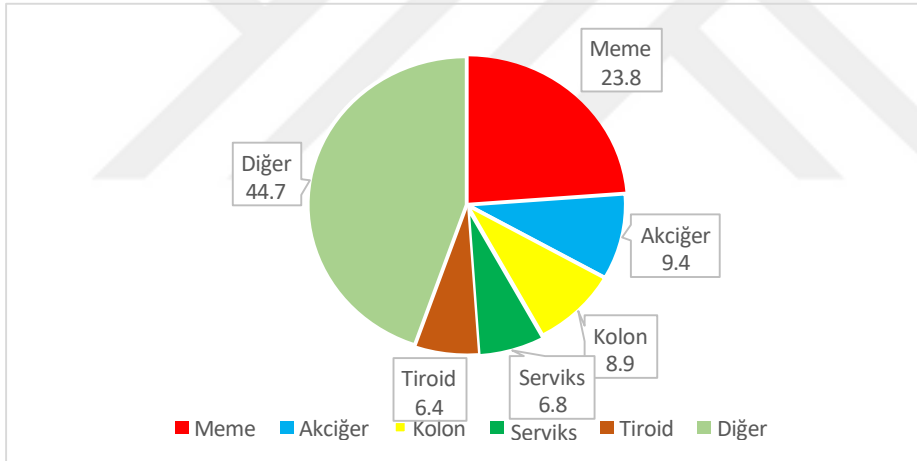
Şekil 2. 3. 2022 yılında en sık oranda tanı alan % kanser türleri (ME vd., 2024)

Akciğer kanseri en sık karşılaşılan kanser türü olmasının yanında en fazla ölümün de meydana geldiği kanser türüdür. Yaklaşık olarak 1,8 milyon akciğer kanseri hastası bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmiştir (% 18,7). Akciğer kanserinden sonra kanser meydana gelen ölümlerin ikinci nedeni ise kolon kanseridir (% 9,3). Bu kanser türlerinden meydana gelen ölümleri sırasıyla karaciğer kanseri (% 7,8), meme kanseri (% 6,9) ve mide kanseri (% 6,8) takip etmektedir (ME vd., 2024) (Şekil 2.4.).



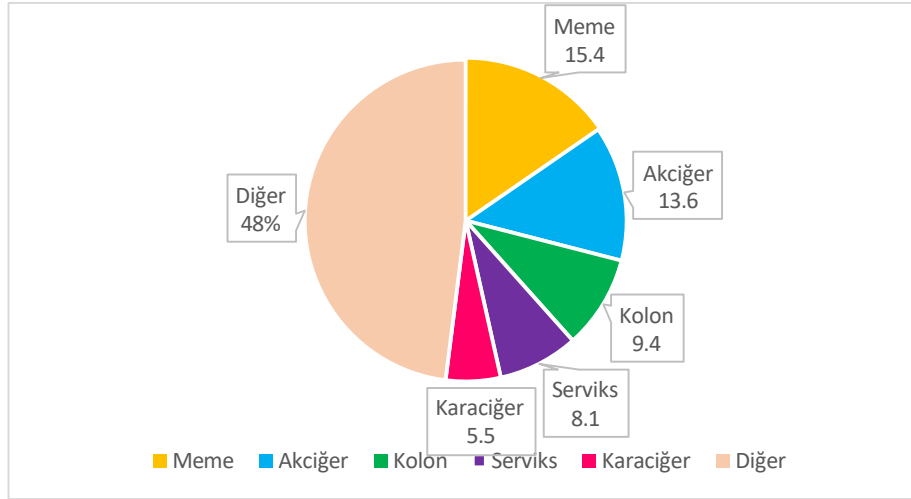
Şekil 2. 4. 2022 yılında kanser türlerinin % ölüm oranları (ME vd., 2024)

Kanser türlerine cinsiyetlere göre bakıldığında kadınlar arasında en sık görülen kanser türü meme kanseri (% 23,8) iken erkekler arasında en sık görülen kanser türü akciğer kanseridir (% 15,3) (ME vd., 2024) (Şekil 2.5.).



Şekil 2. 5. 2022 yılında kadınlar arasında en sık oranda tanı alan % kanser türleri (ME vd., 2024)

Meme kanseri kadınlar arasında en sık olarak rastlanılan kanser türü olmasının yanında kanser nedeniyle meydana gelen ölümler açısından da ilk sırada yer almaktadır (%15,4) (ME vd., 2024) (Şekil 2.6.)



Şekil 2. 6. 2022 yılında kanser türlerinin kadınlar arasındaki % ölüm oranları (ME vd., 2024)

Ülkemizde de cinsiyetlere göre bakıldığında meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür (% 23,4) (Gültekin ve Boztaş, 2014).

2.2.1. Meme kanseri risk faktörleri

Meme kanseri oluşumunun genetik temelleri bilinse bile meme kanserinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte, meme kanserinin oluşumu için risk faktörleri ve bu risk faktörlerinin karsinojeneze nasıl yol açtığı bilinmektedir. Meme kanserini oluşturan en önemli risk faktörlerinden birincisi cinsiyet, yaş, hormon ile ilişkili faktörlerdir. Meme kanserinin gelişiminde genetik ve epigenetik faktörler, hormon tedavisi kullanımı, yanlış ve dengesiz beslenme ve bunun sonucunda artan enerji alınımları ile birlikte ortaya çıkan obezite büyük rol oynamaktadır. Meme kanseri meydana gelişinde diğer önemli risk faktörlerinden biri alkol tüketimi, diğeri ise iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma yer almaktadır (Łukasiewicz vd., 2021).

2.2.1.1. Cinsiyet

Cinsiyet meme kanserine yatkınlık yönünden büyük önem taşımaktadır. Meme kanseri % 99 gibi büyük bir oranda kadınlar arasında görülmektedir. Erkekler açısından bakıldığında ise meme kanseri erkekler arasında nadiren görülen bir hastalıktır. Bu nedenle, kadın cinsiyetine sahip olmak meme kanseri için en önemli risk faktörlerinden biridir (Religioni, 2020).

2.2.1.2. Yaş

Yaş aralığı meme kanseri için en önemli risk faktörlerinden biridir. Günümüzde

meme kanseri hastalarının yaklaşık % 80 'i 50 yaş üstü bireylerden oluşurken, aynı zamanda % 40 'tan fazlası 65 yaş üstü bireylerdir. Meme kanserine yakalanma riski açısından 40 yaşında risk % 1,5, 50 yaşında % 3 ve 70 yaşında % 4 'ten fazladır. İlerleyen yaşla birlikte tüm kanser türlerinin görülme ihtimali yükseldiği gibi meme kanserinin görülme ihtimalide yükselmektedir. Bunun en önemli nedeni hücrelerdeki mutasyonlarının artmış olması ve potansiyel kanserojenlere maruz kalma sürelerinin artmış olması ile ilişkilidir (Religioni, 2020; Bite, 2004).

2.2.1.3. Genetik mutasyonlar

Çeşitli genetik mutasyonların artan meme kanseri riskiyle yüksek oranda ilişkili olduğu bilinmektedir. Meme kanseriyle ilişkili iki ana gen, Breast Cancer 1 geni (BRCA1) (kromozom 17'de bulunur) ve Breast Cancer 2 geni (BRCA2)'dir (kromozom 13'te bulunur). Bu iki ana gen üzerindeki mutasyonlar meme kanserinin fizyopatolojisinde önemli yer tutmaktadır. Bu genlerdeki mutasyonlar otozomal dominant olarak bulunmaktadır ve bu şekilde etki gösterirler. Meme kanseri ile ilişkili diğer genler arasında ise; tümör baskılayıcı geni (TP53), Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (FGFR2), Apoptozla ilişkili Sistein Peptidaz 8 (CASP8) 'i sıralayabiliriz (Shiovitz ve Korde, 2015).

2.2.1.4. Hormonal faktörler

Meme kanseri östrojen hormonu ile yakın ilişkilidir. Östrojen hormonuna ne kadar yüksek miktarda ve ne kadar uzun süre maruz kalmaya göre meme kanseri riski de artmaktadır. Östrojen hormonuna uzun süre yüksek miktarda maruz kalındığında genetik yatkınlıkla birlikte meme kanseri ortaya çıkmaktadır. 15 yaşından sonra menstural döngüye giren bireylerin 12 yaşından önce menstural döngüye giren bireylere göre meme kanser riskinin yüksek oranda azaldığı bilinmektedir. Burada menstural döngüye giriş yaşının yüksekliği östrojenin yüksek dozuna maruz kalınan süreyi azaltacağından bu bireyde ortaya çıkabilecek meme kanseri riskini de azaltmaktadır (Brinton vd., 1988).

Yine östrojene maruz kalma süresi açısından önemli olması nedeniyle menapoza girilen yaşta meme kanseri riskini etkileyen etmenler arasındadır. Menapoza girme yaşı arttıkça meme kanseri riski de yükselmektedir. Menapoza girme yaşı 10 yıl arttığında meme kanseri riski de yaklaşık olarak iki kat artırmaktadır ("Collaborative Group on Hormonal Factors", 2012). Uzun süreli hormon replasman tedavisinin bireylerde meme kanseri riskini önemli düzeyde düşürdüğü araştırmalar aracılığıyla gösterilmiştir (Narod, 2011).

Diyet Beslenme türü ve beslenme çeşitliliği tüm kanser türlerinin ortaya çıkışını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Diyetinde yüksek oranda şeker olan bireylerin artan enerji alımı ile birlikte hem kronik hastalıklara yakalanma oranlarında hem de kansere yakalanma oranlarında artışlar olmaktadır. Bununla birlikte işlenmiş ürünlerin tüketilmesi ile doymuş yağlı, rafine tahıllı olarak beslenmenin de meme kanseri riskini önemli ölçü de arttırdığı bildirilmiştir. Akdeniz diyetine uygun şekilde bitkisel beslenmenin, balık tüketiminin, günlük öğününde sebze ve meyve tüketmenin, bitkisel yağlarla beslenmenin ise meme kanserini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Seiler vd.2018; Turati vd., 2018).

2.2.1.5. Obezite

Meme kanseri riskini artıran önemli faktörden biri de obezitedir. Obezitenin risk faktörü olmasının en önemli nedeni, yanında kronik hastaları getirmesidir. Araştırmalar artan kalori alımının tüm kanser türlerine yakalanma riskini artırdığını göstermektedir. Kalori alımındaki artış, başlı başına kanser riskini artırırken, neden olduğu obezite ile ilişkili hastalıklar nedeniyle de meme kanseri riski önemli ölçüde artmaktadır. Aşırı kiloya sahip olup östrojenin yüksek düzeyine maruz kalmış bireylerde ER⁺ ya da PR⁺ reseptörü eksprese eden meme kanseri türü en başta olmak üzere meme kanserinin diğer türlerine de yakalanma riskinin oldukça yüksek olarak belirlenmiştir (Jiralerspong ve Goodwin, 2016; Greenwald vd., 1997; Suzuki vd., 2009).

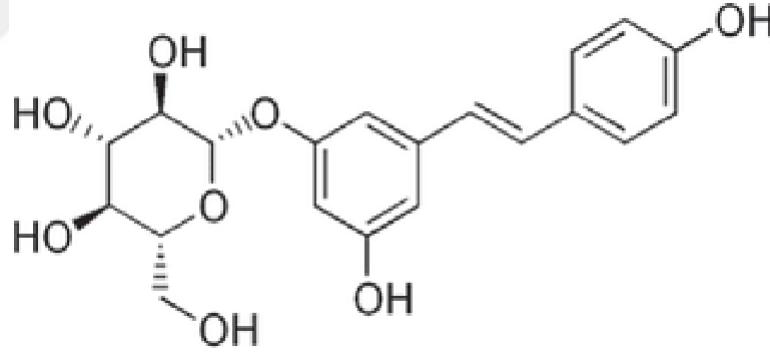
Obezite çeşitli mekanizmalar yoluyla kanser oluşumunu teşvik etmektedir. Aşırı kalori alımı sonucu artan yağ dokusu bağışıklığın bileşenlerinden sitokinlerin, kemokinlerin ve endokrin faktörlerin sentezini önemli ölçüde artırmaktadır. Bununla birlikte yağ dokusundaki artış leptin düzeylerinde de artış meydana gelmektedir. Leptin yeni damar oluşumunu destekleyen pro-anjiyogenik özellikleri ve hücre büyümesini ve hücre çoğalmasını tetikleyen pro-mitojenik özellikleri nedeniyle kanserin oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Yağ dokusunun aşırı oranda artması sonucu hipoksi oluşmaktadır. Hipoksi durumu leptinin ve tümör dokusunda yeni damar oluşumunda etkili VEGF faktörünün sentezini artırıp, antianjiyogenik ve antimitojenik etkiye sahip olan adiponektinin sentezini inhibe ederek apoptozun durmasını ve meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını teşvik edecektir (Vendrell vd., 2004; Incio vd., 2018).

2.3. Polidatin

Bitkiler binlerce yıldır dünya çapında geleneksel ilaçların en önemli kaynağı olmuş ve insanlığa sürekli yeni çareler sunmaktadır. Çeşitli teknikler kullanılarak bitkilerden elde edilen doğal aktif bileşenlerin belirlenmesi için büyük çaba sarf edilmiştir (Du vd., 2013).

Polidatin ($C_{20}H_{22}O_8$, 3,4,5-trihidroksistilben-3-b-dglucopyranoside) (PD), *Polygonum cuspidatum* bitkisinin kökü ve rizomundan ekstrakte edilen, glikozit grubunun C-3 pozisyonuna bağlandığı ve bir hidroksil grubunun yerini aldığı aktif bir bileşendir (Chen ve Sijia, 2017). PD'nin kimyasal yapısı Şekil 2.7. 'de gösterilmektedir.

PD, resveratrol'ün bir glikozit türevidir ve doğada resveratrol'ün en bol bulunan formudur. Bu yapı bileşiğe konformasyonel değişiklik sağlar. Bu durum PD'e resveratrol'den daha fazla biyoyararlanım kazandırır. Glikoz taşıyıcılarını kullanan aktif bir mekanizma ile hücre içine girer. Daha verimli emilir ve enzimatik oksidasyona karşı daha dirençlidir. Antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi daha yüksektir (Du vd., 2013).



Şekil 2. 7. Polidatinin kimyasal yapısı (http-1).

PD, stilbenoid bir polifenol ve monokristalin doğal bir bileşiktir. *Vitaceae*, *Liliaceae* ve *Leguminosae* bitki familyaları PD ekstraksiyonunun önde gelen kaynaklarıdır. *Reynoutria japonica* (Japon madımağı), Uzak Doğu'dan gelen istilacı bir bitkidir ve endüstriyel ölçekte PD'in ana kaynağıdır. PD'in bu bitki kaynağı o kadar istilacıdır ki, iklim değişikliği bağlamında avantaj sağlayarak, dağlık alanların tarımsal potansiyeli de dahil olmak üzere ekosistemin dengesini bozduğu en uzak dağlık bölgelere bile ulaşmıştır. Bu fitokimyasal ayrıca kırmızı şarap, kabuklu yemişler, sebzeler, meyveler, şerbetçiotu kozalakları/peletleri, kakao ve çikolata içeren ürünler gibi diğer bitki kaynaklarında da bulunur (Şöhretoğlu vd., 2018; San Tang ve Tan, 2019; Du vd., 2013; Lanzilli vd., 2012). Çin'de geleneksel Çin terapisinde ateş düşürücü, idrar

söktürücü, balgam söktürücü olarak uygulanır (Du vd., 2013).

Doğada trans-polidatin, trans-resveratrol, cis-polidatin ve cis-resveratrol dahil olmak üzere dört önde gelen türeve sahiptir. Resveratrolün *P. cuspidatum*'daki diğer izomerlerden izolasyonu için, geri akış ekstraksiyonu, filtreleme, hidrolize etme, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, elüsyon ve ultraviyole görünür diyot dizisi dedektörüne bağlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi dahil olmak üzere çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Wang, D. G., & Chen, 2013). Önceki çalışmalar, PD'in anti-trombosit agregasyonu, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) anti-oksidatif etkisi, kardiyoprotektif aktivite, anti-inflamatuar ve immün düzenleyici fonksiyonlar gibi birçok biyomedikal özelliğe sahip olduğunu göstermiştir (Lanzilli vd., 2012). PD'in miyokardiyal disfonksiyonu hafiflettiğini, otofajiyi artırdığını ve mitokondriyal biyoenerjiyi iyileştirdiğini bildirmiştir (Du vd., 2013; Dai ve Jinhua, 2019).

PD'in terapötik ve koruyucu etkileri esas olarak anti-inflamatuar, antioksidan ve anti-apoptotik aktivitelerinden kaynaklanmaktadır. PD'in kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, hepatik/solunum hastalıkları, gastrointestinal hastalıklar, bulaşıcı hastalıklar, romatoid hastalıklar ve iskelet/kas bozukluklarına karşı etkili ve tedavi edici olduğu bildirilmiştir. PD'in bu hastalıkların yanında nörodejeneratif hastalıklara, ateroskleroza ve çoklu organ iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğu bilinmektedir (Du vd., 2013).

2.3.1. Polidatin'in farmakojik etkileri

2.3.1.1. Kalp kası hücreleri üzerindeki etkiler

Miyokardiyal hücreler (MC) oksijen ve glikoz yoksunluğuna maruz bırakıldığında hücre hasarın belirtici olarak hücre dışı Laktat Dehidrogenaz (LDH) enzim miktarı artmaktadır. PD, oksijen ve glikoz yoksunluğuna uğrayan MC hücrelerini hasardan koruyarak salınan LDH miktarını azaltmaktadır (Luo vd., 1990). PD'in ayrıca MC kasılma boyutunu artırarak, MC'de Ca^{+2} miktarının artırılabilirdiğini göstermiştir (Zhao vd., 2003). PD'in kalp üzerine koruyucu etkisi antioksidan enzim aktivitesini artırarak kronik damarların üzerine iyileştirici rolü ile mümkün olmaktadır. Bununla birlikte PD'in kalp korunmasının hem hücre zarında hem de mitokondriyal membranda ATP'ye duyarlı potasyum kanalının açılması ve mitokondriyal geçirgenlik geçişi gözenek açıklığının inhibisyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zhang vd., 2009). Bu konuda daha önce yapılan çalışmalara benzer şekilde, MC'lerine PD'in uygulanmasının ardından MC'lerinde kreatin fosfokinaz (CPK) ve LDH salınımının yani hücre hasarın anlamlı

derecede azaldığını belirlemişlerdir (Miao vd., 2011).

2.3.1.2. Anti-arteriyoskleroz etkiler

Hiperlipidemiler obez kişilerde yaygındır. Kroner kalp hastalığı ve ateroskleroz (AS) gibi kardiyovasküler hastalık riskini artırır. PD'in kan lipitleri metabolizması üzerine etkisi aracılığıyla kan lipit düzeyini düşürdüğü bu yolla kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Özellikle, sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda PD verilen sıçanların serum total kolesterol (TC), trigliserit (TG), LDL kolesterol (LDL-C) ve apolipoprotein A1 (ApoA1) düzeylerini önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır (Zhu ve Jin, 2006).

2.3.1.3. Nöroprotektif aktivite

PD'in nöron koruyucu etkilere de sahip olduğu bilinmektedir. PD uygulamasının sıçanlarda kronik serebral hipoperfüzyonun neden olduğu öğrenme ve hafıza bozuklukları üzerindeki etkilerini ve potansiyel mekanizmalarını araştırmak üzere, 30 gün boyunca oral olarak PD verilen sıçanlarda malondialdehit (MDA) düzeyinin azaldığı ve süperoksid dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitelerinin önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. PD sıçanlarda antioksidan enzim aktivitelerini artırmak yoluyla oksidatif stresi azaltarak, öğrenme ve hafıza üzerinde olumlu etkiye sahip olan nöron koruyucu bir etki ortaya çıkarmıştır (Li vd., 2012).

Amiloid- β peptid ($A\beta$) birikimi, Alzheimer hastalığının nörodejeneratif etkenlerinden biridir. Rivière ve arkadaşlarının, 2010 yılında yaptıkları çalışmada PD 'in $A\beta$ polimerizasyonunu inhibe ettiğini, β tabakalarını düzensiz yapıya kaydırabilen ve oligomerleşmeyi dengesizleştiren etkili bir inhibitör olduğunu göstermiştir (Rivière vd., 2010).

2.3.1.4. Antiinflamatuvar aktivite

PD inflamatuvar etkili maddelerin ortadan kaldırılmasındaki rolü aracılığıyla antiinflamatuvar etki göstermektedir. Bu konu ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada, potasyum oksanat verilerek hiperürisemi oluşturulan farelerde PD'in antihiperürisemik aktiviteye sahip olduğu ve renal organik iyon taşıyıcılarını düzenlediği böylelikle antiinflamatuvar aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir (Shi vd., 2012). PD'in, antiinflamatuvar aktivite göstermesinin yanında inflamatuvar hasara bağlı oluşan yapışmayı ve hücre hasarları da iyileştirdiği bilinmektedir. PD'in aşırı fibronektin (FN) üretimine ve hücre dışı matriks (ECM) birikimine neden olarak glomerüloskleroza yol açan inflamatuvar hasarın baskılanmasında rol aldığı saptanmıştır. PD'in ayrıca diyabetik

nefropatinin (DN) glomerüler mezengiyal (GMC) hücrelerinde yüksek glikozun neden olduğu FN ekspresyonunu inhibe ederek inflamatuvar hasarı ortadan kaldırdığı gözlemlenmiştir (Xie vd., 2012).

2.3.1.5. Anti-oksidatif aktivite

Kalp ve damar hastalıkları, kanser ya da yaşlanmaya bağlı bozuklukların önlenmesi için meyve ve sebze açısından zengin bir diyetin beslenmedeki önemi bilinmektedir. Meyve ve sebzelerin içeriğinde bulunan polifenollerin antioksidan aktivitesi, serbest radikalleri ortadan kaldırarak lipit peroksidasyonunun engellenmesine yardımcı olur. PD, lipit peroksidasyonuna karşı resveratrole kıyasla daha yavaş fakat daha uzun süreli etki etmektedir. PD'in yapısında bulunan konjuge çift bağın sayesinde lipit düzeyini düşürme yönünden önemli bir özelliğe sahiptir. Ayrıca PD 'in duyarlı hidroksil grubunun çeşitli zincir uzunluklarına sahip lipozomların, çoklu doymamış yağ asitlerinin çift bağlarına yakın çift tabakanın lipit bölgesinde yer alması bu bileşiğe önemli antioksidan bir özellik katmaktadır (Fabris vd., 2008).

PD'in sahip olduğu antioksidan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) türünün PD'e maruz bırakıldığı CL2166 mutant soyunda, PD'in oksidatif stresin floresans ifadesini karakterize ederek oksidatif strese karşı koruyucu özelliği olduğu belirlenmiştir (Wen vd., 2012). PD ile ilgili yapılan başka bir çalışmada ise, HaCaT hücrelerinde UVB ışınlaması ile antioksidatif için önemli parametrelerden biri olan ROS üretiminin arttığı, ancak PD'in etkisi ile ROS üretiminin önemli ölçüde inhibe olduğu belirlenmiştir (Du vd., 2013).

2.3.1.6. Anti-tümör aktivitesi

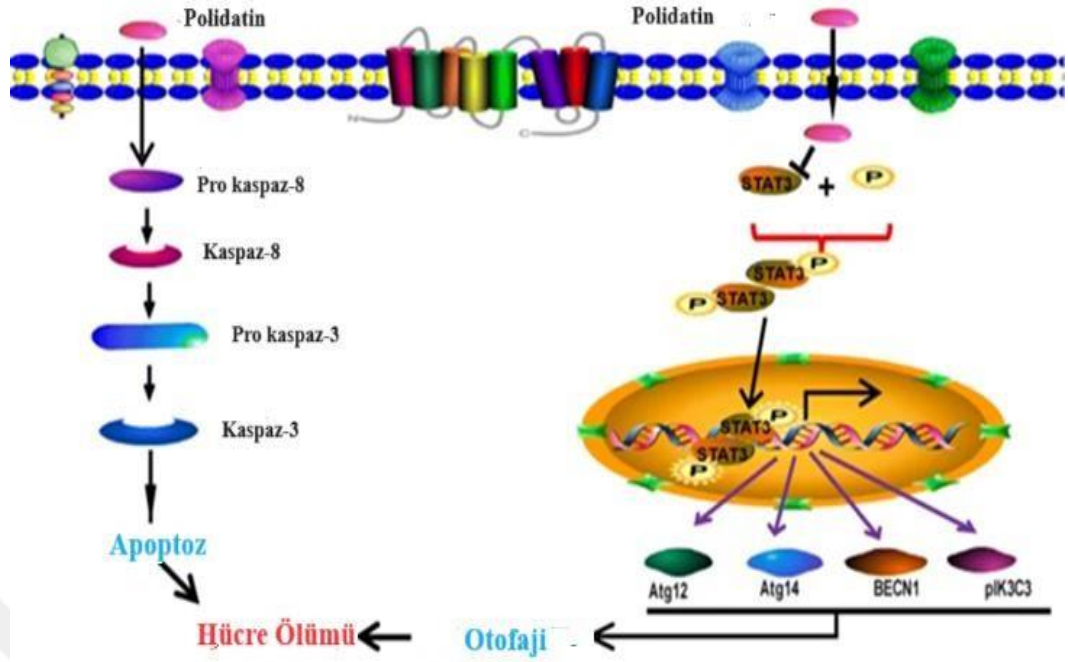
PD molekülünün en önemli farmakolojik rollerinden bir tanesi de anti-kanser aktivitesidir. PD'nin, insan servikal karsinom (HeLa) hücreleri, hepatoma hücre dizisi (SMMC-7721), epidermal karsinom (A-431) hücreleri ve nazofarinks karsinom (CNE) hücreleri gibi birçok insan tümör hücre hattını önemli ölçüde öldürerek, sitotoksik etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Liu vd., 2011). Bunun dışında akciğer kanseri, kolorektal kanser, larenks kanseri, yumurtalık kanseri ve hepatosellüler karsinomaya karşı antitümör aktiviteleri gösterilmiştir (Jiang ve Chang-qing, 2020). Güçlü anti-kanser etkisi araştırılmak üzere nazofarinks karsinom CNE hücrelerinde PD'in etkisine bakıldığında mitokondriyal apoptoza neden olduğu, endoplazmik retikulum (ER) stresini tetiklediği, Akt 'nin inaktivasyonunu ortadan kaldırdığı saptanmıştır (Liu vd., 2011).

Yüksek metastazlı Lewis akciğer karsinomu (LLC) tümörleri taşıyan fareler üzerine yapılan bir çalışmada ise PD 'in tümör büyümesi ve akciğer metastazında DNA sentezini baskılayarak inhibe ettiği ve yine aynı çalışmada insan göbek damarı endotel hücrelerinin (HUVEC) anjiyogenez oluşumunu engellediği belirlenmiştir (Kimura ve Okuda, 2000).

PD'in farklı tipteki tümörler üzerinde çok yönlü anti-kanser etkileri olduğu bilinmektedir. MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında, PD Creb (CAMP yanıt element bağlayıcı protein) 'in fosforilasyon seviyesini düşürmekte ve böylelikle apoptozu indüklemektedir (Chen ve Sijia, 2017). H9C2 hücre hattında ise PD, PI3K/Akt/mTOR ve MEK/ERK sinyal yolu üzerinden apoptozu indüklemektedir. PD'nin Bcl-2 ekspresyonunu azaltırken, Bax ve kaspaz-3 ekspresyonunu artırması hücre büyümesinin durmasına hücrelerin apoptoza gitmesine neden olur (Dai vd., 2019).

PD'in, önceki çalışmalarda otofajiyi düzenlemesi ve iyi bir anti-kanser yeteneği göstermiş olması kanser tedavisi için yeni bir strateji olarak kabul edilmektedir. Osteosarkom MG-63 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, PD'in MG-63 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği, apoptoz ve otofajiyi arttırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca PD'in sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3) ekspresyonunu ve fosforilasyon (Y705) seviyesini azalttığı, otofajiyi ilişkili genlerin (Atg12, Atg14, BECN1, PIC3K3) ekspresyonunu arttırdığı ve dolayısıyla otofajik hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (Jiang ve Chang-qing, 2020) (Şekil 2.8).

Şekil 2.8. 'de de görüldüğü gibi insan osteosarkoma hücre hattında PD; kaspaz 3 ve kaspaz 8'i belirgin bir şekilde aktive ederek, kaspazlara bağlı olarak apoptozu indüklediği gözlemlenmiştir (Jiang ve Chang-qing, 2020).



Şekil 2. 8. Polidatinin Apoptoz ve Otofaji Üzerine Etkisi (Jiang ve Chang-qing, 2020)

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) üzerine yapılan bir çalışmada, PD'in NSCLC hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği ve metastazı baskılayan anti-tümör ajan olarak görev yaptığı gösterilmiştir (Zou vd., 2018). PD'nin 143B ve MG63 osteosarkom hücrelerinde proliferasyonu doza bağlı olarak inhibe ettiğini ve apoptozu desteklediğini göstermiştir. Ayrıca PD'in Bax ekspresyonunu arttırdığı ve Bcl-2 ekspresyonunu zayıflattığı ve sonuç olarak kaspaz-3 aktivitesini arttırdığı gözlemlenmiştir (Xu vd., 2016). A549 akciğer kanseri hücre hattında yapılan başka bir çalışmada ise, PD'in doza bağlı olarak proliferasyonu önemli ölçüde inhibe ettiği ve apoptozu neden olduğu belirlenmiştir. Western blot analizi ile Bax'ın arttığı, Bcl-2 ifadesinin azaldığı ve siklin D1 ifadesinin de baskılandığı gösterilmiştir. PD hücre döngüsünü S fazında durarak hücre büyümesini de engellemektedir (Zhang vd., 2014).

İnsan hücrelerinde mTOR/p70s6k sinyal yolu, tümör baskılaması, oksidatif stres ve enfeksiyon gibi durumlarla karşılaşıldığında otofaji durumunun ortaya çıkması ile ilişkilidir. Ayrıca mTOR/p70s6k sinyal yolunun aktivasyonu tümör oluşumunda, anjiyogenezde ve tümör proliferasyonunda önemli bir rol oynar. Multiple myeloma hücrelerinde yapılan çalışmada, MTOR ve p70s6k'nin fosforilasyonunun PD tarafından önemli ölçüde baskılandığını belirtmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada, mTOR/p70s6k sinyal yolunun rapamisin tarafından inhibisyonunun, otofajiyi indüklediği ve hücre canlılığını azalttığını saptanmıştır (Yang ve Zhao, 2017). Osteosarkoma hücrelerinde de uzun

kodlanmayan RNA Taurin yukarı regüle edilmiş gen 1 (TUG1) üzerinden PD aracılığı ile Akt sinyal yolağının baskılanması sonucu proliferasyon inhibe edilerek osteosarkom hücrelerinde apoptoz desteklenmektedir (Hu vd., 2019).

PD kolon kanseri oluşumunu miR-382'yi up regüle etmesi sonucu PD-L1 ekspresyonunu baskılaması ve apoptozu artırması ile engellemektedir (Jin vd., 2020). PD ayrıca karaciğer kanseri hücrelerinde sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü (STAT3) onkogeninin aktivasyonunu güçlü bir şekilde bloke ederek, proliferasyonu inhibe etmekte ve STAT3 sinyal molekülü üzerinden apoptozu indükleyerek hücre çoğalmasını engellemektedir (Li vd., 2019).

Düşük toksisiteleri nedeniyle bitki kökenli bileşikler kanser tedavisi çalışmalarında anti-tümör ajanı olarak ilgi görmektedir. Renal hücreli karsinomda (RCC) yapılan bir çalışmada PD'in doza ve zamana bağlı olarak hücrelerinin canlılığını ve RCC hücrelerinin göçünü, istilasını ve epitelyal-mezenkimal geçişini inhibe ettiğini belirlenmiştir. Ayrıca PD'in RCC hücrelerini kaspaz-3 ve kaspaz-9'a bağımlı bir şekilde apoptozu teşvik ettiği ve PI3K/Akt sinyal yolunu baskıladığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, PD uygulaması RCC hücrelerinde Bax aktivasyonu ile mitokondriyal proteinlerin salınmasına aracılık edip Bcl-2 ve Mcl-1'in aşağı regülasyonuna yol açarak apoptozu indüklemiştir (Jin vd., 2018).

2.4. Uzun Kodlanmayan RNA'lar

LncRNA'lar DNA'nın ifade edilmesi ile sentez edilmektedirler. Ancak, protein kodlayan RNA'lardan farklı olarak lncRNA'lar protein moleküllerinin sentezine aracılık etmemektedir. LncRNA'ların sentezi epigenetik açıdan büyük önem arz etmektedir. 200 nükleotidden daha yüksek sayıda nükleotit içeren lncRNA'lar, protein molekülünü kodlamayan RNA'ların önemli bir parçasını meydana getirmektedir. LncRNA'lar görevlerini yerine getirebilmek için DNA'da değişimler meydana gelmeden epigenetik, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel yolları kullanarak genlerin ekspresyonlarını değiştirmektedir. LncRNA'lar meydana getirdikleri epigenetik düzensizlikler yardımıyla nörolojik hastalıklardan kalp damar hastalıklarına kadar farklı birçok hastalığın oluşumuna moleküler zemin hazırlamaktadır (Bhan vd., 2017; Hauptman ve Glavač, 2013).

Kanserin ortaya çıkışında epigenetik yolların önemi oldukça büyüktür. Epigenetik değişikliklerin en önemlileri ise lncRNA'ların aracılık ettiği yoldur. LncRNA'ların hücre

proliferasyonunu teşvik eden birçok genin ifadesini arttırarak, kanser hastalığının ortaya çıkışına zemin hazırlamaktadır (Kazimierczyk ve Wrzesinski, 2021). Kanser patolojisinde lncRNA'lar ilk olarak kromatini yeniden modelleyerek kanser oluşumuna neden olurlar. Bu yeniden modelleme durumu epigenetik olarak gerçekleşmektedir. Kromatin yeniden modellenmesi kromatin ile lncRNA'ların etkileşimi sayesinde gerçekleşmektedir. LncRNA'ların yaklaşık olarak yarısı kromatinin aktif bölgesine bağlanabilmektedir. Bununla birlikte, lncRNA'lar kromatini modifiye eden proteinlere de bağlanarak kromatini yeniden regüle ederek genlerin ifadelerini değiştirebilmektedir. Polycomb Baskıcı Kompleks 2 (PRC2), organizmanın gelişim sürecinde ve kanser oluşumunda epigenetik yollarla genlerin ifadelerini inhibe eden bir histon metiltransferaz enzimi olarak işlev görmektedir. Bu histon metiltransferaz birçok lncRNA'lar tarafından regüle edilmekte, aktivitesi değiştirilebilmektedir (Han ve Chang, 2015). PRC2 düzenlenmesi yoluyla kromatin yapısının yeniden düzenlenmesine aracılık eden birçok lncRNA'lardan en önemlisi X-İnaktif Spesifik Transkript (XIST) 'dir (Wang vd., 2021). Kromatin yapısının değişmesi yani bazı kimyasal bağların yıkılıp bazı kimyasal bağların kurulması ile genlerin ifade edilme düzeylerinde değişiklikler meydana gelir. Eğer meydana gelen bu değişiklikler özellikle onkogenler ya da tümör süpresör genler üzerindeyse hücrenin proliferasyonu doğrudan etkilenir. İfadesi değişen genler, bölünmeyi teşvik edici genler olduğunda hücre hızlı bir şekilde bölünmeye ve farklılaşmaya başlayarak kanserli hücreleri oluşturur. Yapılan çalışmalar, kanserde birçok lncRNA'nın ifadesinin kanserde değiştiğini göstermektedir. Bu ifadeleri değişen lncRNA'ların bazıları da kromatin yapısı ile ilişkilidir. LncRNA'ların ifadeleri değiştiğinde kromatin ile ilişkili olanları kromatin yapısını yeniden modelleyerek, kanserin başlangıcına katkı sağlamaktadır (Han ve Chang, 2015). Kromatin yapısına bağlanıp kimyasal bağlar kurarak kromatin yapısını yeniden modelleyen lncRNA'ların yanı sıra bazı lncRNA'larda kromatinin üç boyutlu yapısını modifiye eden DNA metil transferazların aktivitelerini düzenleyerek dolaylı olarak kromatin yapısını yeniden düzenlerler. Bu lncRNA'lardan en önemlileri özofagus skuamöz hücreli karsinomda Akciğer Kanseri ile ilişkili Transkript 1 (LUCAT1) ve kolon kanserinde DNA Metiltransferaz 1 (DNMT-1) 'dir. Bununla birlikte, lncRNA'lar nükleozom konumlandırması değiştirmek aracılığıyla da kromatin yapısını yeniden düzenleyebilmektedirler (Yoon vd., 2018; Merry vd., 2015).

LncRNA'lar organizma içerisinde birçok moleküle bağlanabildikleri için

kanserdeki rolleri oldukça çeşitli ve oldukça karmaşıktır. LncRNA'ların bağlandığı en önemli moleküller protein ya da protein kompleksleridir. Bu bağlanma aracılığıyla hücrede onkojenik fonksiyonlar kazanılır. Özellikle, lncRNA'ların büyüme faktörleri ile etkileşerek büyüme faktörlerinin aktivitelerini arttırmaları hücrelerde kanserleşmeyi başlatan en önemli basamaklardan birisidir. Örneğin; MALAT1 onkojenik bir büyüme faktörü olan B-MYB ile etkileşime girerek hücre döngüsünün hücre bölünmesi yönünde hızlanmasına, dolayısıyla hücre apoptozunun inhibe olmasına ve hücre proliferasyonunun artmasına aracılık etmektedir (Tripathi vd., 2013). Protein komplekslerinin katlanmasına aracılık eden lncRNA'lar olduğu gibi proteinin üç boyutlu yapısının bozulmasına aracılık eden lncRNA'larda vardır. Bu lncRNA'lara örnek olarak, Telomerik Tekrar İçeren RNA (TERRA)'yı verebiliriz. TERRA hücre bölünmesi ile ilişkili enzimlerden telomeraza bağlanmaktadır. Telomeraz enziminin üç boyutlu yapısı bu bağlanma sonucu bozulmakta enzim aktivitesini yitirmektedir. Bu durum, kanser hücrelerinin ölümsüzlüklerinin ortadan kaldırılması için önem taşır. Ancak, birçok kanser türünde TERRA 'nın ifadesinin düşük olması bu mekanizmanın tersi yönde işleyeceği anlamına gelmektedir. Böylelikle kanserli hücreler ne kadar bölünürlerse bölünsünler telomer bölgelerinde kısalma minimumda kalacağı için kanserli hücreler ihtiyaç duydukları ölümsüzlüklerine kavuşacaklardır. Bu nedenle, TERRA'nın kanserdeki ifade düzeyi hastalığın başlangıcını, devamını etkileyen önemli faktörlerdendir (Cusanelli ve Chartrand, 2015; Adishesh vd., 2020).

LncRNA'ların bir diğer bağlandığı molekül ise miRNA'lardır. Bununla birlikte miRNA'ların rekabetçisi olarak da davranmaktadırlar. mi-RNA'ların bağlandıkları moleküllere bağlanarak bu moleküllerin biyolojik aktivitelerini düzenledikleri bu yolla kanserin gelişimine katkı sağladıkları gösterilmiştir. HULC karaciğer kanserinde miRNA 372'ye bağlanarak bu miRNA'nın aktivitesini düzenlemektedir. Yine lncRNA, Kolon Kanseriyle İlişkili Transkript 1 (CCAT1) mesane kanserinde miRNA 218-5p 'ye bağlanıp regüle etmek yoluyla mesane kanserinin oluşumuna katkı sağlamaktadır. LncRNA 'lar özellikle tümör süpresör görevleri olan miRNA 'lara ya da bu miRNA 'ların hedef moleküllerine bağlandıklarında, hücrelerdeki apoptoz inhibe olmakta hücreler proliferasyona yönlendirilmektedir (Wang vd., 2010; Ma vd., 2015).

LncRNA'ların kanserin oluşumuna özellikle büyüme faktörlerinin ifadelerini arttırmaları ile katkıda bulunmaktadırlar. Böylelikle kanser hücreleri çevreden herhangi bir büyü ya da bölün sinyali gelmeden kendi sentezledikleri faktörler ile büyü ve bölün

emrini almaktadırlar. Bununla birlikte, lncRNA'ların en önemli görevlerinden biri kanser hücrelerindeki apoptoz ile ilişkili genlerin düzeylerini değiştirmeleri ve apoptozdan kaçışı ile ilgilidir. Apoptozdan kaçan kanser hücrelerinde proliferasyonda artma, oluşan tümör dokusunda damarlanma ve metastaz meydana gelmektedir (Takayama vd., 2013).

LncRNA'lar, büyüme faktörleri ve hormonların reseptöre bağlanması ile sinyalin hücre çekirdeğine ulaşması sırasında görevli ikincil sinyal moleküllerinin aktivitelerini de düzenlemektedirler. Bu yolla hücrelerin apoptoz ve proliferasyon yolları üzerine etkiye sahip olmaktadır. LncRNA'lar, ligandların reseptöre bağlanabilmesi amacıyla reseptörleri de stabilize etmektedirler. Örneğin Metastazla İlişkili Akciğer Adenokarsinomu Transkripti 1 (MALAT1) meme kanserinde östrojen reseptörüne bağlanarak hastalığın prognozunu kötü yönde etkilemektedir (Huang vd., 2016). Birçok lncRNA sinyal reseptörlerini aktive etmek veya inhibe etmek yerine bu reseptörlerin ifade edilmelerini çeşitli epigenetik yollar aracılığıyla değiştirerek hücrelerin onkojenik özellik kazanmasına aracılık da etmektedirler. Reseptörleri yeniden düzenlenen hücreler onkojenik özellikler kazandıktan sonra apoptozdan kaçınmakta ve hızlı bir şekilde bölünmeye başlamaktadırlar (Xing vd., 2014).

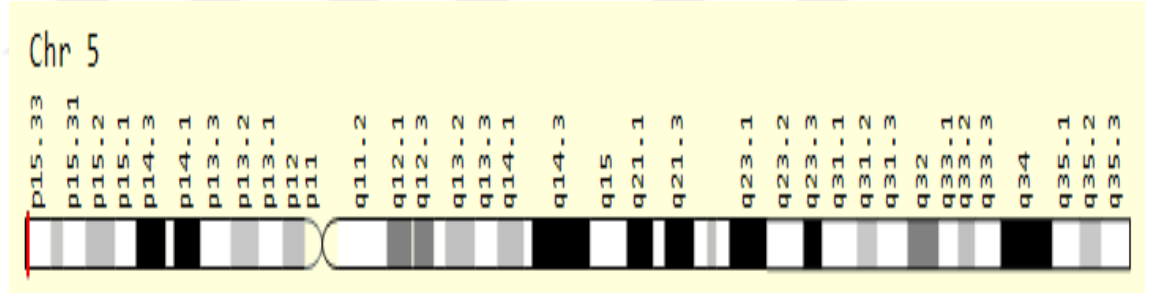
Hücrelerin proliferasyonunun aktivasyonu, lncRNA'ların hücre büyümesi ile ilişkili siklinler, siklin bağımlı kinazlar, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri etkileşimi ile mümkün olmaktadır. Hücrelerin proliferasyonunun inhibisyonu ise p53 gibi tümör süpressör genlerin lncRNA'lar aracılığıyla regüle edilmesi aracılığıyla mümkün olmaktadır. LncRNA'lar, genlerin ifade edilme süreçlerine dahil olan transkripsiyon ve translasyon süreçlerini kontrol eden onkogenler ile tümör süpressör genlerin ifadelerini değiştirerek, hücrelerin apoptoz ve proliferasyonlarını düzenlemektedirler (Zhou vd., 2016; Kitagawa vd., 2013).

LncRNA'lar, kanserli hücrelerin ihtiyacı olan besin ve oksijeni taşıyan kan damarlarının tümör dokusuna ulaştırılması için kan damarlarının oluşumunda rol alan damar büyüme faktörlerinin ifadelerini artırmaktadırlar. Bu yeni damar oluşumunda görevli en önemli damar büyüme faktörü VEGF faktörüdür. MALAT1 epigenetik yollarla VEGF 'nin ifadesini artırarak tümör lokusuna kan damarlarının yönlendirilmesine aracılık etmektedir. Tümör lokusuna kan damarlarının yönlendirilmesi ile kanser hücrelerinin besin ve oksijen ihtiyacı fazlasıyla karşılandığı için bu hücrelerde apoptoz düzeyleri azalırken, hücre proliferasyonunda ise önemli bir oranda artış olmaktadır. Bu durum hastalığın gidişatını kötü yönde etkilemektedir (Li vd., 2017). Kanserli hücrelerin

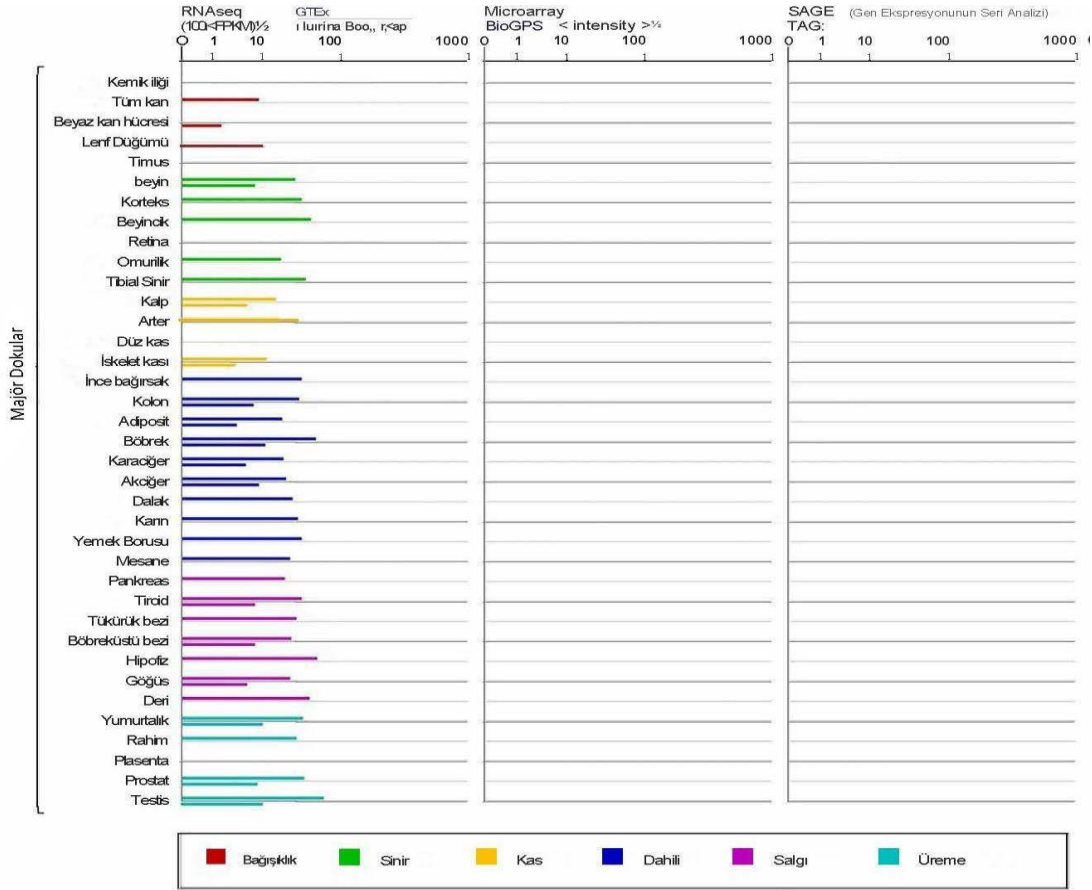
büyüyüp çoğalması için gerekli olan hızlı enerji ihtiyacı nedeniyle glikoliz hızı da yükselmektedir. Bu hücrelerde glikoliz hızının yükselmesiyle birlikte Warburg etkisi olarak bilinen laktik asit sentezi de önemli ölçüde artmaktadır. Kanserde glikoliz ve laktik asit sentez hızındaki bu regülasyonların gerçekleştirilmesinde bazı LncRNA'ların da rolünün olduğu gösterilmiştir. LncRNA'lar hücre proliferasyonuna ve apoptoza etki ettikleri gibi kanser metabolizmasına da etki ederek kanserli hücrelerin hayatta kalmaları için gerekli olan metabolizma koşullarını epigenetik yollar aracılığıyla sağlamaktadırlar (Mirzaei ve Hamblin, 2020). LncRNA PCED1B-AS1 'in glioblastoma hücrelerinde HIF-1 α 'yı regüle ederek Warburg etkisini ve karsinogenezi indüklediği bilinmektedir (Yao vd., 2020).

2.4.1. SLC9A3-AS1 (LOC100288152) SLC9A3 antisense RNA 1

LncRNA, SLC9A3-AS1, 5. kromozom üzerinde bulunan indüklenebilir SLC geninin antisens zinciri üzerinde lokalizedir. 5'-3' : yönünde CGAGAGAGGGCAGCGGCTAGT baz dizisinden oluşmaktadır. Genomik konumu Şekil 2.9. 'deki gibidir.



Şekil 2. 9. SLC9A3-AS1 geninin genomik yerleşimi (<http-2>).



Şekil 2. 10. SLC9A3-AS1 Geninin normal insan dokularındaki mRNA ekspresyonu (http-2).

LncRNA SLC-A3-AS1 ile son zamanlarda yapılan çalışmalara baktığımızda, NSCLC ve nazofarenks kanseri (NPC) gibi iki önemli kanser türünde çalışıldığını görmekteyiz. NSCLC kanserinde, SLC9A3-AS1'in ekspresyonunun insan normal akciğer epitel hücrelerine (16HBE) kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olduğunu görülmektedir. Ayrıca, A549 ve H520 hücre hatlarında SLC9A3-AS1'in susturulması ile iki hücre hattında da hücre proliferasyonunun azaldığını, hücre hatlarında göç ve istila yeteneklerinin baskılandığını belirlenmiştir (Huang vd., 2022). NPC hücrelerinde de aynı şekilde normal nazofarenks epitel doku ile kıyaslandığında SLC9A3-AS1'in daha yüksek düzeyde eksprese edildiği gözlemlenmektedir. SLC9A3-AS1'in susturulması ile NPC hücrelerinin proliferatif kapasitesinin azaldığı, apoptozun önemli ölçüde arttığı gözlenmektedir. Yani bu durum SLC9A3-AS1'in NPC hücreleri üzerinde tümör teşvik edici etkisi olduğunu göstermektedir (Li vd., 2021).

Karaciğer kanseri hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada ise, SLC9A3-AS1'in gen ekspresyonunun up-regüle olduğu saptanmıştır. SLC9A3-AS1'in yıkılması ile kanser hücrelerinin canlılığı, göçü ve istilasının belirgin bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir (Zhao vd., 2023).

3. YÖNTEM

3.1. Hücre Hattı

MCF-7 (Meme Kanseri) hücreleri Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.2. Materyaller

3.2.1. Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler

Tablo 3. 1. *Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler*

İsim	Şirket
25 ve 75 cm ² 'lik hücre kültür flaskları	Nest, Çin
24 ve 96 kuyulu plakalar	Sarstedt, Almanya
Steril pipetler	Sarstedt, Almanya
Steril polipropilen test tüpleri	Nest, Çin
DMEM	Sigma-Aldrich, Almanya
DMEM	Capricorn, Almanya
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich, Almanya
Fetal Sığır Serum (FBS)	Sigma-Aldrich, Almanya
Penisilin/Streptomisin	Sigma-Aldrich, Almanya
Tripsin	Sigma-Aldrich, Almanya
Fosfat Tamponu	Hyclone, ABD
MTT Boyası (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	Applchem, Almanya
Etil alkol	Merck, Almanya
Etidyum bromür	Sigma-Aldrich, Almanya
Akridin oranj	Sigma-Aldrich, Almanya

3.2.2. Ekipmanlar

Tablo 3. 2. *Ekipmanlar*

Ekipmanlar	Şirket
Real-time PCR cihazı	Rotor Gene Q 6000, Qiagen; Almanya
Thermal Cycler	Gen Amplifikasyon PCR sistem 9700 Applied Biosystems, ABD
Muse hücre analiz cihazı	Merck, Almanya
Nanodrop	Maestro Gen, Tayvan
Steril CO ₂ inkübatörü	Hera Cell 240 Thermo Scientific, Almanya
Otoklav	ALP, Japonya
Soğutmalı santrifüj	Heraheus, Almanya
Floresan mikroskop	Leica DMI 4000B, Almanya
Mikro santrifüj	Sigma, ABD
Distile su cihazı	Nüve, Türkiye
Hassas terazi	Ohaus, İsviçre
Inverted mikroskop	Leica, Almanya
Sterilizatör	Nüve FN 500, Türkiye
Su banyosu	Nüve BM 302, Türkiye
Vorteks	Yellowline, Belçika
Laminar kabin	Heal Force, Çin
pH metre	Thermo Scientific, Singapore
Dondurucu (-80°C)	New Brunswick Scientific, ABD
Etüv	Nüve, Türkiye
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik No Frost, Türkiye

3.2.3. Kullanılan ticari kitler

Tablo 3. 3. *Kullanılan ticari kitler*

İsim	Şirket
D-190801-00-00005 Katalog Numaralı SLC9A3-AS1-siRNA	Dharmacon, ABD
D-001320-10-05 Katalog Numaralı Negatif Kontrol-siRNA	Dharmacon, ABD
Lipofectamine RNAiMAX transfeksiyon kiti	Invitrogen, ABD
SLC9A3-AS1 Primeri	B Oligo, Türkiye
GAPDH Primeri	B Oligo, Türkiye
RT ² SYBR Green qPCR Mastermix	ABT, Türkiye
RNA izolasyon kiti	GeneAll Hybrid-RTM Kit, Güney Kore
cDNA sentez kiti	Thermo Scientific, Singapore
Apoptoz RT-PCR Array Kit	Qiagen, Almanya
Proliferasyon RT-PCR Array Kit	Qiagen, Almanya
Muse Annexin V Apoptoz Kiti	Merck; Almanya
In Situ Cell Death Detection Kit	Roche, Almanya

3.2.4. Kullanılan bilgisayar programları

Tablo 3. 4. *Kullanılan bilgisayar programları*

İsim	Şirket
Graphpad Prism 8	Amerika Birleşik Devletleri

3.2.5. Polidatin bileşiğinin çözündürülmesi ve hazırlanması

PD'nin ana stok çözelti konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde saf Dimetilsülfoksit (DMSO) çözücüsü kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonraki ara stok konsantrasyonları (10 mM ve 1 mM) %10 Foetal bovin serum (FBS) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyeri içerisinde hazırlanmıştır. Etkili konsantrasyonu belirleme çalışmaları için 1-500 µmol/L PD konsantrasyon aralığı %10 FBS'li DMEM besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır. Çözücü konsantrasyonu en yüksek %0.1 olarak alınmıştır.

3.2.6. Hücre kültürü

MCF-7 insan meme kanseri hücreleri %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin içeren DMEM besiyerinde %5 CO₂'li inkübatörde 37 °C'de kültür ortamında çoğaltılmıştır. Büyüme ortamındaki hücre yoğunluğu % 80'e ulaştığında pasajlama işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. Sitotoksite belirleme testi

3.2.7.1. MTT yöntemi ile polidatinin IC₅₀ dozunun belirlenmesi

MTT yöntemi, hücre canlılığını, hücre proliferasyonunu ve sitotoksiteyi belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. MTT yöntemi ile IC₅₀ dozunun belirlenebilmesi için hücreler 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Ardından, hücreler 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda medium ortamı değiştirilerek, hücelere 24 ve 48 saat boyunca 50-500 µmol/L konsantrasyon aralığında polidatinin 7 farklı doz uygulaması yapılmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa 10 µl MTT boyası eklenerek, hücreler 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından MTT boyası hücrelerden aspire edilip, her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklenmiştir. Plakalar 10 dakika boyunca çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Bu işlemin sonrasında spektrofotometrik mikropłaka okuyucuda 540 nm dalga boyunda absorbans okuması yapılmış olup, elde edilen absorbans değerlerinden kontrol hücre grubuna (Polidatin ile muamele edilmeyen hücreler) göre % hücre canlılık değerleri

hesaplanmıştır. Hücrelerin %50 canlılığını gösteren değer IC₅₀ değeri olarak kabul edilmiştir. Hesaplama ve grafik çizimleri Graphpad Prism 8 yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

IC₅₀ değerlerinin hesaplanmasında ilk olarak PD 'in (0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500) µmol/L dozlarına maruz bırakılan MCF-7 hücrelerindeki % canlılık değerleri MTT işleminin ardından ölçülen absorbanslar aracılığıyla aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

% Canlılık = ((PD uygulanan kuyucuktaki absorbans değeri)/ (PD uygulanmayan kuyucuktaki absorbans değeri))*100

Bu işlemin ardından PD dozu ve % canlılık değerleri Graphpad Prism 8 yazılımına yüklenmiştir ve IC₅₀ değerleri program üzerinden hesaplanmıştır.

3.2.8. Akridin Oranj (AO) ve Etidyum Bromür (EB) boyama ile apoptozun belirlenmesi

Akridin Oranj (AO) ve Etidyum Bromür (EB) boyama ile erken ve geç apoptozun belirlenmesi için 24 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna 4.5×10^4 hücre ekilmiş olup daha sonra hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler 24 saat boyunca 160 µM/ml (IC₅₀) ya da 100 µM/ml (IC₈₀) PD ile inkübasyona bırakılmışlardır. Bu sürenin sonunda 1:1 oranında hazırlanan 50 µg/ml Etidyum Bromür (EB) ve 100µg/ml Akridin Orange (AO) boya karışımından 100µl hücelere eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra floresan mikroskopta (Leica DMI 4000B, Almanya) FITC filtresi kullanılarak görüntüleme işlemi yapılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler iki kez PBS ile yıkama yapılarak en son yine PBS ortamında floresan mikroskopta FITC filtresi ile hücrelerin görüntülenmesi sağlanmıştır.

3.2.9. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu işlemlerinde, RNA izolasyon kiti (GeneAll Hybrid-RTM Kit, Güney Kore) kullanılmıştır. RNA izolasyon işlemi, kit kullanım protokolüne uygun bir şekilde aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. 1×10^7 hücreye 1 ml RiboEx™ çözeltisi ekleyerek, hücreler besi kaplarında lizis işlemine tabi tutulmuşlardır. Oluşan homojenat, 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra steril ependorf tüplere aktarılmıştır. Homojenata eklenmiş olan her 1 ml'lik RiboEx™ çözeltisine karşılık 200µl kloroform çözeltisi eklenmiştir. Karışım 15 saniye boyunca alt üst edilerek karıştırılıp, sonrasında oda sıcaklığında 2 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Karışım, 4°C sıcaklığında ve 12000xg 'de 15 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra üstteki şeffaf olan faz (süpernatant) farklı bir steril ependorf tüpe alınmıştır. Ependorf tüpe süpernatant

hacminin 1/1 oranında RPI tamponu eklenerek, karışımın 700 µl'si mini kolona aktarılmıştır. Mini kolon 10000xg 'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra kolonun altında biriken elüt kısmı uzaklaştırılmıştır. Mini kolona 500 µl SWI tamponundan eklenmiştir. Hücreler bu işleme iki kez daha maruz bırakılmıştır. Daha sonra mini kolon steril yeni bir ependorf tüpe aktararak, 50 µl nükleaz içermeyen su ilave edilerek, ependorf tüp 10000xg'de 1 dakika santrifüj edilmesi aracılığıyla total RNA elüe edilmiştir. Elde edilmiş olan RNA'nın 1-2 µl'si RNA saflık ve konsantrasyon ölçümü için kullanılmıştır. Kalan kısım ise saklanmak üzere -20 °C'lik derin dondurucu da muhafaza edilmiştir. RNA kalitesi ile miktarının belirlenebilmesi için nanodrop spektrofotometresi cihazı kullanılmıştır. İzole edilmiş olan RNA örneklerindeki A260/A280 oranlarının 2 civarı olmasına dikkat edilmiştir.

Tablo 3. 5. RNA izolasyon basamaklarındaki işlemler

RNA izolasyon basamakları	Yapılan işlemler
1. basamak	1x10 ⁷ hücreye 1 ml RiboEx™ çözeltisi eklenmiştir.
2. basamak	Karışım 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
3. basamak	1 ml' lik RiboEx™ çözeltisine karşılık karışıma 200µl kloroform çözeltisi eklenmiştir.
4. basamak	Karışım 15 saniye alt üst edilip 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
5. basamak	Karışım ependorf tüpte 4°C sıcaklığında ve 12000xg'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
6. basamak	Ependorf tüpe süpernatant hacminin 1/1 oranında RPI tamponu eklenerek, karışımın 700 µl 'si mini kolona aktarılmıştır.
7. basamak	Mini kolon 10000xg 'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra kolonun altında biriken elüt kısmı uzaklaştırılmıştır
8. basamak	Mini kolon tamponlar aracılığıyla yıkanmıştır.
9. basamak	Mini kolon steril yeni bir ependorf tüpe aktararak, 50 µl nükleaz içermeyen su ilave edilmiştir.
10. basamak	Ependorf tüp 10000xg'de 1 dakika santrifüj edilmesi aracılığıyla total RNA elüe edilmiştir

3.2.10. cDNA sentezi

MCF-7 hücrelerinden elde edilmiş olan total RNA 'lardan, cDNA sentez kiti (Thermo Scientific, ABD) aracılığıyla cDNA sentezlenmiştir. Ependorf tüpe 1µl total RNA ve 1µl hexamer primer eklenip nükleaz içermeyen su ile hacim 12µl'ye

tamamlandıktan sonra karışım 5 dakika 65°C’de inkübe edilip soğutulmuştur. Elde edilen karışıma Tablo 3.6.’ da gösterildiği gibi cDNA sentez reaksiyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla, toplam hacim 20 µl olacak şekilde örnekler eklenerek reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Tablo 3. 6. *cDNA sentez reaksiyon karışımının hazırlanması*

Reaksiyon bileşenleri	Her bir örnekten eklenecek miktar(µl)
5X Reaksiyon Tamponu	4
Ribolock RNaz İnhibitor	1
RevertAid Revers Transkriptaz	1
dNTP Mix	2
İlk basamakta hazırlanan karışım	12
Toplam Reaksiyon Hacmi	20

Tablo 3.6. ‘da belirtildiği gibi, 20 µl karışım 60 dakika 42°C’de inkübasyonda bırakılmış olup, sonrasında karışım 5 dakika 70°C’de inkübasyonda bırakılarak cDNA sentez işlemi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen cDNA’lar -20°C’lik dondurucuda muafaza edilmiştir.

3.2.11. Mikroarray aracılığıyla lncRNA ekspresyon düzeylerinin taranması

Elde edilen cDNA’larda mikroarray cihazı aracılığıyla uzun kodlamayan RNA taraması yapılmıştır. Mikroarray cihazı aracılığıyla uzun kodlamayan RNA taraması işlemi AY-KA firması tarafından Clariom™ Array kiti aracılığıyla hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.12. Gen ifadelerinin analizi

Sentezini gerçekleştirdiğimiz cDNA örneklerinden RT-PCR yöntemi aracılığıyla SLC9A3-AS1’in gen ifadesi analizi yapılmıştır. SLC9A3-AS1 genine spesifik olan PCR ürününü oluşturabilmek amacıyla B Oligo üreticisi tarafından üretilen primer kullanılmıştır. Referans genin primeri olarak ise, GAPDH geni için B Oligo üreticisi tarafından üretilen primer kullanılmıştır.

Primer dizileri :

SLC9A3-AS1-Forward: 5’-CGAGAGAGGGCAGCGGCTAGT-3’ ; Reverse: 5’-TAACTTTCCAAGGCACCCAGCA-3’,

GAPDH-Forward: 5’-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3’; Reverse: 5’-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3’

3.2.12.1. Gen ifadelerinin belirlenmesi

RT-PCR reaksiyon karışımı, toplam hacmi 25 µl olacak şekilde Tablo 3.7. 'de gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo 3. 7. RT-PCR reaksiyon karışımı

RT-PCR bileşenleri	Her bir örnekten eklenecek miktar (µl)
SYBR® Green Mastermix	12.5
Primer	1
cDNA	1
Nükleaz İçermeyen Su	10.5
Toplam Reaksiyon Hacmi	25

Hazırlanan RT-PCR karışımı, RT-PCR cihazına yerleştirilerek, Tablo 3.8. 'de gösterilen DNA amplifikasyon koşullarında her bir genin amplifiye olması sağlanmıştır. RT-PCR reaksiyonunun ardından amplifiye edilmiş olan PCR ürünlerinin spesifikliği ise erime eğrisinin analizi aracılığıyla teyit edilmiştir.

Tablo 3. 8. DNA amplifikasyonunun koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Açıklamalar
Başlangıç aktivasyonu	95 °C	10 dk.	HotStarTaq Plus DNA Polimerazı aktive eder.
Denatürasyon	40 dörngü	95 °C	15 sn
Uzama		60 °C	60 sn Floresan veri birikimi sağlar.

3.2.12.2. Gen ifadelerine ait verilerin analizi

Gen ifadeleri analizinin RT-PCR sonuçları, Rotor-Gene 6000 Series Software Version 1.7 yazılımı aracılığıyla belirlenmiştir. Verilerin $\Delta\Delta CT$ metodu aracılığıyla istatistiksel analizi ise “RT² profiler RT-PCR Array Data Analysis Version 3.5” yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

3.2.13. LncRNA SLC9A3-AS1 'in siRNA aracılığıyla susturulması

Mikroarray lncRNA ekspresyon analizinde dramatik ekspresyon düşüşü gözlenen lncRNA SLC9A3-AS1' i susturacak (Knockdown işlemi) siRNA havuzu (siRNA; 5nmol) ve negatif kontrol siRNA (siRNA; 5nmol) 'sı hazır olarak satın alınmıştır. MCF-7 meme kanseri hücreleri % 80 yoğunluğa ulaştıktan sonra tripsinlenerek 2×10^5 hücre/ml

olacak şekilde % 10 FBS içeren DMEM besi ortamında 6 kuyucuklu plakalara ekim işlemi gerçekleştirilmiştir. Ekim işlemi sonrasında hücreler 37°C’de, %5 CO₂ ve %95 nemli hava ortamında bir gece inkübe edilmiştir. Pelet halindeki siRNA ‘lardan, üretici firmanın verdiği tabloya uygun şekilde siRNA buffer kullanarak 5 µM siRNA stok solüsyonları hazırlanmıştır. İnkübasyon süresinin ardından her bir kuyucuk için 2 ayrı ependorf tüpü hazırlanmıştır. Bu tüplerden birine 5 µM stok siRNA solüsyonundan, 10 µl (final konsantrasyonu 25nM) eklenmiştir ve FBS ile antibiyotik içermeyen DMEM ile solüsyon 200 µl ‘ye tamamlanmıştır. İkinci tüpe ise, 4 µl transfeksiyon reaktifi eklendikten sonra FBS ile antibiyotik içermeyen DMEM ile 200 µl ‘ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüpler 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonrasında iki tüp karıştırılarak 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 400 µl ‘lik transfeksiyon çözeltisine, %10 FBS içeren fakat antibiyotik içermeyen 1600 µl DMEM besiyerinden eklenerek, toplam hacim 2 ml ‘ye tamamlanmıştır. Plakalardaki besiyer ortamı kaldırılarak, hazırlanana 2ml ‘lik transfeksiyon ortamı kuyucuklardan her birine aktarıldıktan sonra hücreler 37°C’de, % 5 CO₂ ve % 95 nemli hava ortamında 24 inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.14. İnsan apoptoz RT² Profiler™ PCR Array ve insan onkogenler ve tümör süpresör genler RT² Profiler™ PCR Array kit aracılığıyla proliferasyon ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon profillerinin belirlenmesi

Dizayn edilen siRNA havuzunun transfekte edildiği hücreler ile negatif kontrol siRNA ‘sının transfekte edildiği hücrelerden elde edilmiş olan cDNA örneklerinde, apoptoz RT² Profiler™ PCR Array (Qiagen, Almanya) ve onkogenler ve tümör süpresör genler RT² Profiler™ PCR Array kiti (Qiagen, Almanya) aracılığıyla, proliferasyon ve apoptoz ile ilişkili 84 ‘er genin ekspresyon profilleri, RT-PCR cihazı ile analiz edilmiştir. Ekspresyon analizi yapılan genlerin listesi şu şekildedir;

İnsan Apoptoz RT² Profiler™ PCR Array ekspresyon kiti için,

CRADD, FADD, TNF, TNFRSF10B (DR5), ABL1, CIDEA, CIDEB, TP53 (p53), TP73, CFLAR (Casper), DAPK1, TNFRSF25 (DR3), BAD, BAK1, BAX, BCL10, BCL2L11, BID, BIK, BNIP3, BNIP3L, CASP1 (ICE), CASP10 (MCH4), CASP14, CASP2, CASP3, CASP4, CASP6, CASP8 (FLICE), CD27 (TNFRSF7), CD70 (TNFSF7), CYCS, DFFA, DIABLO (SMAC), FAS (TNFRSF6), FASLG (TNFSF6), GADD45A, HRK, LTA (TNFB), NOD1 (CARD4), PYCARD (TMS1, ASC), TNFRSF10A (TRAIL-R),

TNFRSF9, TNFSF10 (TRAIL), TNFSF8, TP53BP2, TRADD, TRAF3, AKT1, BAG1, BAG3, BAX, BCL2, BCL2A1 (BFL1), BCL2L1 (BCLXL), BCL2L10, BCL2L2, BFAR, BIRC3 (c-IAP2), BIRC5, BIRC6, BNIP2, BNIP3, BNIP3L, BRAF, CD27 (TNFRSF7), CD40LG (TNFSF5), CFLAR (Casper), DAPK1, FAS (TNFRSF6), HRK, IGF1R, IL10, MCL1, NAIP (BIRC1), NFKB1, NOL3, RIPK2, TNF, XIAP (BIRC4).

İnsan onkogenler ve tümör süpresör genler RT² Profiler™ PCR Array ekspresyon kiti için,

BAX, BCL2L1 (BCLXL), CASP8 (FLICE), CDK4, ELK1, ETS1, HGF, JAK2, JUNB, JUND, KIT (CD117), KITLG (SCF), MCL1, MET, MOS, MYB, NFKBIA (I κ B α , MAD3), NRAS, PIK3CA (p110-alpha), PML, PRKCA, RAF1, RARA, REL, ROS1, RUNX1 (AML1), SRC, STAT3, ATM, BRCA1, BRCA2, CDH1 (E-Cadherin), CDKN2B (p15INK4b), CDKN3, E2F1, FHIT, FOXD3, HIC1, IGF2R, MEN1, MGMT (AGT), MLH1, NF1, NF2, RASSF1, RUNX3, S100A4, SERPINB5 (maspin), SMAD4 (MADH4), STK11 (LKB1), TP73, TSC1, VHL, WT1, WWOX, XRCC1, BCR, EGF, ERBB2 (HER-2, NEU), ESR1 (ER α), FOS, HRAS, JUN, KRAS, MDM2, MYC, MYCN, NFKB1, PIK3C2A, RB1, RET, SH3PXD2A, TGFB1, TNF, TP53 (p53), ABL1, CDKN2A (p16INK4a), CTNNB1, E2F1, MEN1, MYB, TGFB1, ZHX2.

Verilerin $\Delta\Delta CT$ metodu ile istatistiksel analizi “RT2 profiler RT-PCR Array Data Analysis version 3.5” (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.15. Apoptoz düzeylerinin flow sitometri cihazı aracılığıyla belirlenmesi

SLC9A3-AS1-siRNA havuzu ile transfekte edilmiş hücreler ile bu hücrelere 160 μ M PD’e eklendikten 24 saat sonra erken apoptoz hücre oranları Annexin V apoptoz kit aracılığıyla akış sitometrisinde belirlenmiştir. Paralel olarak, negatif kontrol siRNA ile transfekte edilen MCF-7 hücreleri ve bunların PD ile muamele edilmiş hücre grupları da negatif siRNA kontrol grupları olarak deneylere dahil edilmiştir. Bu hücre gruplarının her biri 25’ cm^2 ’lik hücre kültür besi kaplarında 1×10^5 hücre 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Her bir hücre grubu Fosfat Tamponlu Çözelti (PBS) ile yıkanıp tripsinize edilerek, süspanse hale getirilmiştir. Daha sonra hücreler, falkon tüplere aktararak, 1500 rpm ‘de 5 dakika santrifüj edilmişlerdir. Oluşan hücre peletlerin üzerine 100 μ l PBS (%1 FBS içeren) eklenerek, hücreler süspanse hale getirilmiştir. Apoptoz düzeyinin tayini için, 100 μ l hacmindeki PBS (%1 FBS içeren) içindeki homojenize haldeki hücrelerin üzerine 100 μ l annexin V reaksiyon çözeltisinden eklendikten sonra hücreler 3-5 saniye kadar vortex aracılığıyla karıştırılmıştır. Ardından, hücreler oda sıcaklığında, 20 dakika boyunca karanlık bir bölmede inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda örnekler

iyice karıştırılarak, erken apoptoz düzeyleri Muse marka (Almanya) Akım Sitometrisi belirlenmiştir. AnnexinV(FITC) için FITC label 1 (FL1) paneli ve Propidyum İyodür (PI) için FITC label 2 (FL2) panelinde okuma gerçekleştirilmiştir. Analizler akım sitometri cihazında kadran istatistiği yapılarak apoptoz oranları (%) belirlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık seviyesi ise $p \leq 0.05$ olarak alınmıştır.

3.2.16. TUNEL analizi

TUNEL yöntemi, enzimatik olarak DNA iplikçik kırılmalarını sonlandırarak endonükleaz bölünme ürünlerini tayin etmek ve terminal transferaz DNA fragmanlarının 3'-ucuna etiketli UTP eklemek için kullanılır. İşaretlenen dUTP, ışık mikroskobu veya floresan mikroskobunda incelenebilir. Geç apoptoz hücre oranının belirlenebilmesi değerlendirmek için, In Situ Cell Death Detection Kit (Sigma Aldrich, ABD) Fluorescein kullanılmıştır. Tüm prosedürler kit üreticisinin belirttiği şekilde yapılmıştır. 1×10^6 MCF-7 meme kanseri hücreleri 6 kuyucuklu plakaların içerisine yerleştirilmiş lamellar üzerine ekilmiştir. Daha sonra, lameller üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak Hücreler PBS ile iki kez yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra, hücreler taze hazırlanmış %4 lük paraformaldehit/PBS (pH 7.4) solüsyonu içerisinde, oda sıcaklığında 30 dakika fikse edilmiştir. PBS ile yıkama işleminden sonra, hücreler %1 'lik sodyum sitrat içinde taze hazırlanmış Triton X-100 ile 2-8°C 'de 2 dakika permeabilize işlemine tabi tutulmuştur.

Kit içerisinden çıkan label solüsyonundan 50 µl alınarak, TUNEL reaksiyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği test edilmiştir. Kit içerisinden çıkan enzim solüsyonu ile label solüsyonu karıştırılarak inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif kontrollere ise hazırlanan karışım uygulanmadan önce, DNA kırıklarını tespit edebilmek için, 15-25°C ortamda, 10 dk, micrococcal nuclease or DNase 1 recombinant solüsyonunda (3000U/ml-3U/ml in 50 mM Tris-HCL, pH7.5, 1mg/ml BSA) bekletilmiştir. Daha sonra, 2 defa PBS ile yıkanan hücrelere TUNEL mix solüsyonu (label ve enzim solüsyonu karışımı) her bir örnek üzerine 50 µl uygulanarak, nemli, karanlık ve 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda PBS-Triton-X ile hücreler 3 kez yıkanmıştır. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (10µg/ml) ile 5 dakika inkübasyona bırakılan hücre gruplarının PBS ile yıkanmasının ardından hücreler floresan mikroskop altında görüntülenmiştir.

3.2.17. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz tek yönlü Anova ve Student T-testi kullanılarak Graphpad Prism 8.0 programında ve $\Delta\Delta C_T$ metodu ile “RT² profiler RT-PCR Array Data Analysis version 3.5” yazılımının kullanılması aracılığıyla yapılmıştır. Üç bağımsız tekrarın sonuçları ortalama $\pm$ standart ortalama hata olarak belirtildi ve 0.05’ten küçük olan p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



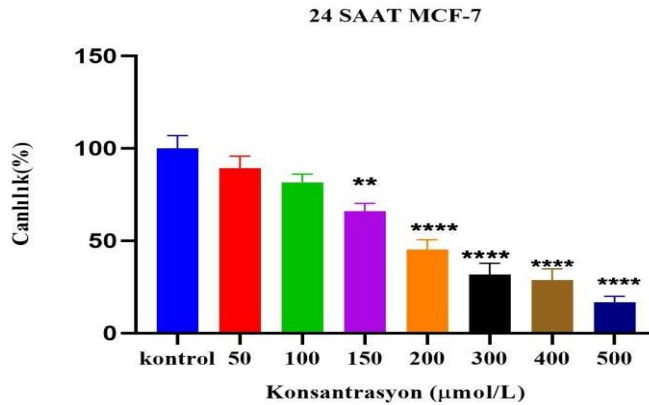
4. BULGULAR VE YORUM

Çalışmamızda, MCF-7 meme kanseri hücreleri %10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin ilave edilmiş DMEM (%1 oranında L-glutamine'li) besiyeri kullanılarak 37°C 'de, % 95 nem ve % 5 CO₂ 'li inkübatör ortamında çoğaltıldıktan sonra aşağıda belirtilen MCF-7 meme kanseri deney ve kontrol hücre grupları oluşturulmuştur:

1. siRNA ile gen susturma işlemine tabi tutulmayan meme kanseri hücreleri
2. Negatif kontrol siRNA ile transfekte edilen meme kanseri hücreleri
3. Dizayn edilen siRNA havuzu ile transfekte edilen meme kanseri hücreleri
4. Polidatine maruz bırakılan meme kanseri hücreleri
5. Polidatin ve siRNA 'ya maruz bırakılan meme kanseri hücreleri.

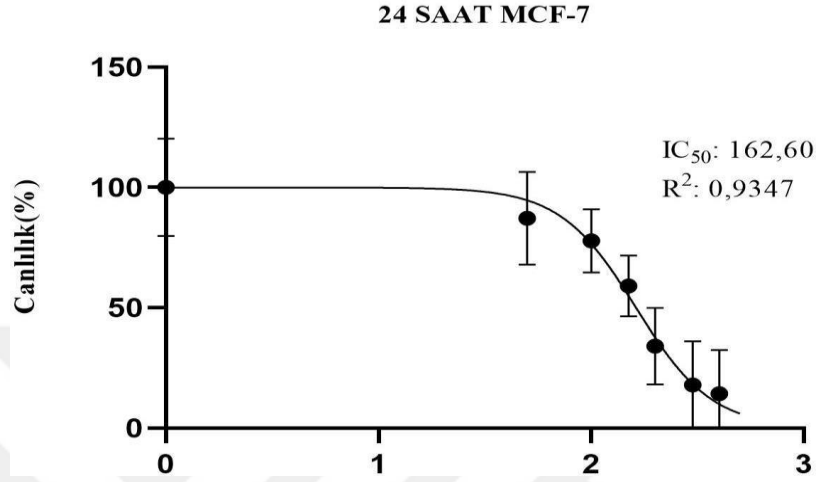
4.1. Polidatin'in Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

PD'in (0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500) µmol/L konsantrasyon aralığındaki dozlar ile MCF-7 meme kanseri hücreleri 24 ya da 48 saat inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Sitotoksik dozların belirlenmesi için (3-4,5- dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT) yöntemi kullanılmıştır. MTT yönteminin çalışma prensibi proliferasyona uğrayan hücrelerin artan mitokondrial dehidrogenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyum halkasının formazona dönüşmesi sonucu elde edilen mor renk ile canlı hücrelerin absorbands değerlerinin belirlenmesidir. Ölü hücreler ise aktif mitokondriyal dehidrogenaz enzimine sahip olmadıklarından tetrazolyum halkasının formazona indirgenmemesi sonucunda renk değişimi gözlemlenmemektedir. Spektrofotometrik ölçümler sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.1. ve 4.3. 'de verilmiştir. PD'nin 24 saat uygulanması sonrasında belirlenen IC₅₀ değerleri Şekil 4.2. 'de gösterilmiştir.



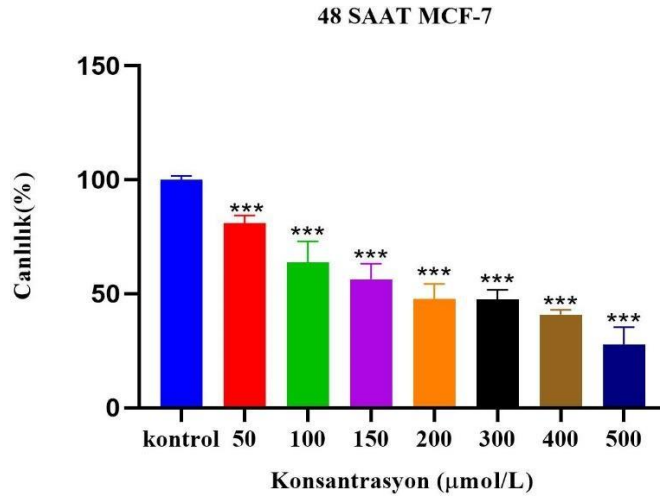
Şekil 4. 1. 24 saat boyunca Polidatin' in 0-500 µmol/L arasındaki dozlarına maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin % Canlılık değerleri (** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$)(N=3)

Şekil 4.1.' de üç bağımsız veriden elde edilen ortalama sonuçlara göre, 24 saat boyunca PD'in (0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500) $\mu\text{mol/L}$ derişimlerine maruz bırakılan MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki % canlılık değerleri sırasıyla; %89.30, % 81.58, % 65.90, % 45.14, % 31.65, % 28.64, % 16.17 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 2. 24 saat boyunca Polidatin' in 0-500 $\mu\text{mol/L}$ arasındaki dozlarına maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin IC₅₀ grafiği (N=3)

24 saat boyunca PD'in farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan meme kanseri hücrelerinin IC₅₀ değeri 162,60 $\mu\text{mol/L}$ olarak belirlenmiştir.



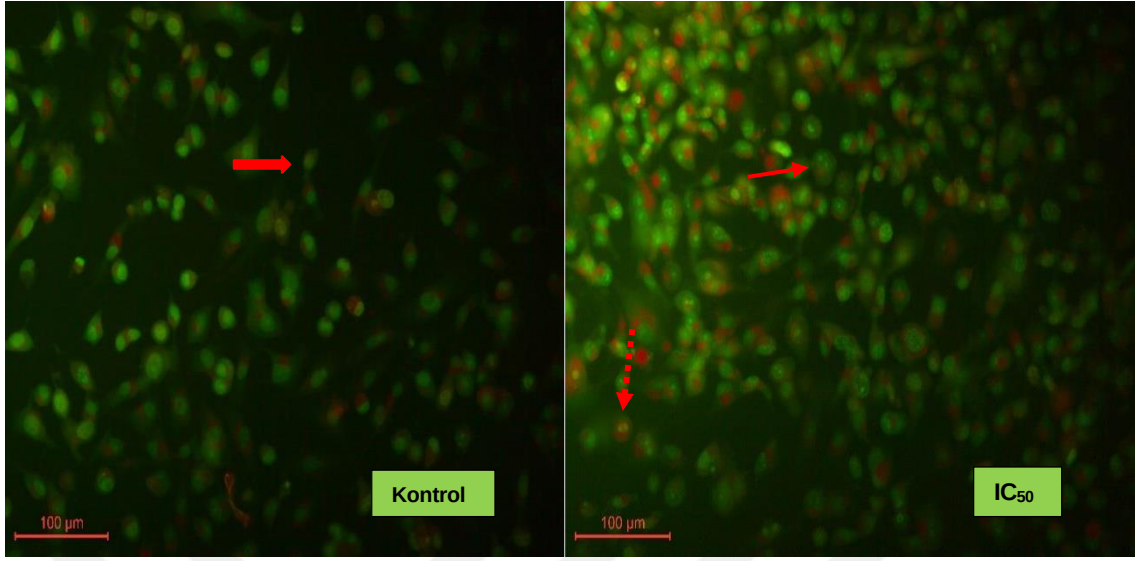
Şekil 4. 3. 48 saat boyunca Polidatin' in 0-500 $\mu\text{mol/L}$ arasındaki dozlarına maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin % Canlılık değerleri (***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05)(N=3)

İnkübasyon süresinin 48 saatte çıkarılması ile (0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500) $\mu\text{mol/L}$ PD derişimlerine maruz bırakılan meme kanseri hücrelerindeki % canlılık değerleri sırasıyla; %80.92, %63.84 %56.32, %47.72, %47.40, %40.76, %27.28 olarak belirlenmiş olup, 48 saatteki PD'nin IC₅₀ değeri 105,5 $\mu\text{M/L}$ olarak saptanmıştır.

4.2. Akridin Oranj (AO) ve Etidyum Bromür (EB) Boyama ile Apoptozun Belirlenmesi

Bu yöntem ile canlı ve apoptotik hücreler arasındaki farklar ayırt edilebilirken nükleus ve hücre membranında meydana gelen değişimler belirlenmektedir. Etidyum Bromür (EB) membran bütünlüğü bozulan hücreleri belirlemekte ve geç apoptotik hücrelerin turuncu renge boyanmasını sağlamaktadır. Akridin Oranj (AO) ise hem canlı hücreleri hem de apoptotik hücreleri boyamaktadır. Canlı ve erken apoptotik hücrelerin her ikisinde yeşil renge boyanırken erken apoptotik hücreler nükleuslarda nükleer fragmentasyon ve kondensasyon göstererek canlı hücrelerden ayırt edilebilmektedir (Avcı vd., 2013).

Akridin Oranj (AO) ve Etidyum Bromür (EB) boyama yöntemi aracılığıyla MCF-7 meme kanseri hücrelerine 160 μ M PD uygulamasından sonra, hücrelerin erken ve geç apoptoz düzeylerini belirlemek için floresan mikroskopta (Leica DMI 4000B, Almanya) FITC filtresi kullanılarak görüntüleme işlemi yapılmıştır. PD ile muamele edilmeyen kontrol grubu ile IC₅₀ (160 μ M) PD'e maruz bırakılan MCF-7 hücreleri karşılaştırıldığında, kontrol hücre grubunda yüzde olarak daha fazla yeşil renkte hücre olduğu ve 160 μ M PD'e 24 saat boyunca maruz kalan meme kanseri hücrelerinde ise daha fazla turuncu renkte hücreler olduğu gözlenmiştir. PD ile muamele edilmeyen kontrol hücre grubunda canlılık düzeylerinin yüksek olduğu, PD'e maruz kalan meme kanseri hücrelerinde ise kontrol hücre grubuna kıyasla erken ve geç apoptotik hücre sayısında görsel bir artış olduğu belirlenmiştir. Apoptotik hücre miktarının özellikle PD varlığındaki hücre grubunda yüksek oranda gözlemlenmesi daha fazla hücrenin apoptoza gittiğini göstermektedir. Hücre morfolojisindeki değişimlere bakıldığında IC₅₀ PD uygulaması sonrasında hücre membran kabarması ve hücre çekirdeğinde meydana gelen kromatin kondensasyonu varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4. 4. Polidatin varlığında 24 saat sonra AO/EB ile boyanmış MCF-7 hücrelerinde canlı ve apoptotik hücre görüntüleri (kalın ok : canlı hücre, kesikli ok: geç apoptotik hücre, normal ok: erken apoptotik hücre)

4.3. Mikroarray Aracılığıyla lncRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

IC₅₀ dozu olan 160 µM PD uygulanan meme kanseri hücrelerinin 24 saat sonra elde edilen cDNA'larında ve kontrol grubu meme kanseri hücrelerinin elde edilen cDNA'larında mikroarray yöntemi aracılığıyla toplam uzun kodlamayan RNA ekspresyon analizi yapılarak uzun kodlamayan RNA'ların ekspresyonlarına bakılmıştır. LncRNA SLC9A3-AS1'in ekspresyonunun IC₅₀ dozunda 2,3 kat ve IC₈₀ dozunda 3 kat azaldığı belirlenmiştir (Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.). Bu aşamadan sonraki deneysel işlemler için, IC₈₀ dozunda ekspresyonu en fazla kat değişimine uğrayan LncRNA olan ve IC₅₀ dozunda ekspresyonu LncRNA MALAT1'den sonra en fazla kat değişimine uğrayan LncRNA SLC9A3 seçilmiş olup tüm deneysel işlemler LncRNA SLC9A3-AS1 üzerinden gerçekleştirilmiştir. LncRNA SLC9A3'ün devam edecek olan deneysel işlemler için seçilme nedeni, IC₅₀ ve IC₈₀ dozu beraber ele alındığında endramatik ekspresyon değişimine uğrayan LncRNA olması ve MALAT1'in meme kanserinde daha önceden çalışılmış olmasıdır.

Tablo 4. 1. IC80 Polidatin dozu uygulanan MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki mikroarray sonucu dramatik ekspresyon değişimi olan uzun kodlamayan RNA 'lar

No	Doz1 (IC80=100µM)	Kontrol	Değişim Katsayısı	Uzun kodlamayan RNA	Tanımı
1	7.9	6.31	3	SLC9A3- AS1(LOC10028 8152)	SLC9A3 antisense RNA 1
2	12.33	11	2.52	MALAT1	Metastaz ilişkili akciğer adenokarsinomu transkript 1
3	10.99	9.76	2.34	SNHG12	Küçük nükleolar RNA konak geni 12
4	11.2	10.17	2.04	MIR22HG	MIR22 konak geni
5	8.05	7.04	2.02	SNHG7; SNORA17B	Küçük nükleolar RNA konak geni 7; küçük nükleolar RNA, H/ACA kutusu 17B

IC₈₀ PD dozu uygulanan MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki en dramatik LncRNA ekspresyon kat değişimleri sırasıyla LncRNA SLC9A3-AS1'de 3 kat, LncRNA MALAT1'de 2,52 kat, LncRNA SNHG12'de 2,34 kat, MIR22HG'de 2,04 kat ve LncRNA SNHG7'de 2,02 kat olarak saptanmıştır.

Tablo 4. 2. IC50 Polidatin dozu uygulanan MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki mikroarray sonucu

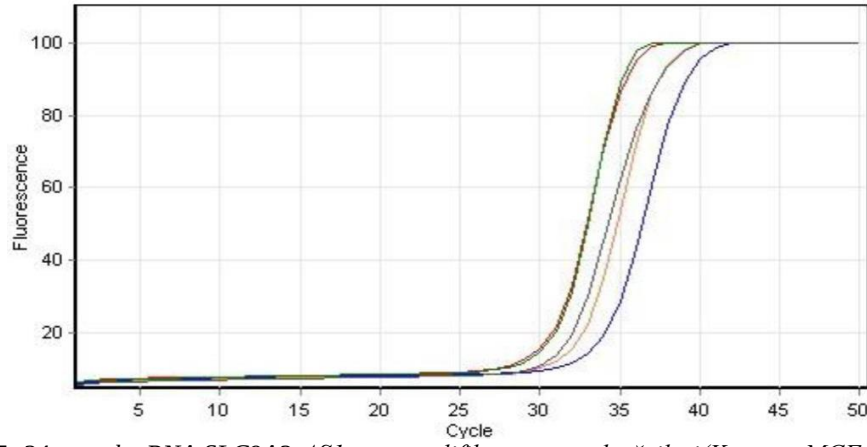
No	Doz2 (IC50=160µM)	Kontrol	Değişim Katsayısı	Uzun Kodlamayan RNA	Tanımı
1	12.36	11	2.58	MALAT1	metastaz ilişkili akciğer adenokarsinomu transkript 1
2	7.51	6.31	2.3	SLC9A3- AS1(LOC100288 152)	SLC9A3 antisense RNA 1
3	10.71	9.51	2.3	PILRB; STAG3L5P- PVRIG2P-PILRB	eşleştirilmiş immünogloblin benzeri tip 2 reseptör beta
4	10.25	9.05	2.3	SNHG7	küçük nükleolar RNA konak geni 7
5	10.92	9.76	2.23	SNHG12	küçük nükleolar RNA konak geni 12
6	6.86	5.65	2.01	ST20	tümör baskılayıcı gen 20

IC₅₀ PD dozu uygulanan MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki en dramatik LncRNA ekspresyon kat değişimleri sırasıyla LncRNA MALAT1’de 2,58 kat, LncRNA SLC9A3-AS1’de 2,3 kat, LncRNA PILRB’de 2,3 kat, LncRNA SNHG7’de 2,3 kat, LncRNA SNHG12’de 2,23 kat ve LncRNA ST20’de 2,01 kat olarak belirlenmiştir.

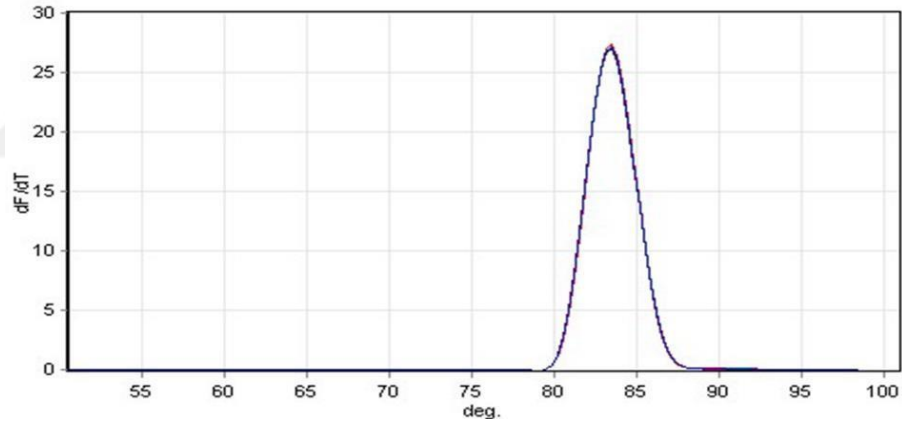
4.4. SLC9A3-AS1 ’in Susturma İşleminin Başarısının Belirlenmesi

MCF-7 meme kanseri hücrelerine 25 nM SLC9A3-AS1-siRNA ve 25 nM Negatif kontrol-siRNA ’ların transfekte ve 160 µM PD maruziyetinden sonra oluşturulan 5 farklı grupta 24 saat sonra SLC9A3-AS1’in ifade edilme düzeyleri saptanmıştır. RT-PCR cihazından elde edilmiş olan SLC9A3-AS1 geninin 24 saat sonraki amplifikasyon eğrilerine ait örnekler Şekil 4.5. ’de, 24 saat sonraki erime eğrileri Şekil 4.6. ’de

gösterilmektedir.



Şekil 4. 5. 24. saat lncRNA SLC9A3-AS1 gen amplifikasyon örnek eğrileri (Kırmızı: MCF-7 hücre hattına ait eğri, Yeşil: Negatif kontrol-siRNA transfekte edilmiş MCF-7 hücre hattına ait eğri, Mavi: SLC9A3-AS1-siRNA havuzu transfekte edilmiş MCF-7 hücre hattına ait eğri, Turuncu: Polidatin uygulanmış MCF-7 hücre hattına ait eğri, Mor: Polidatin+SLC9A3-AS1-siRNA havuzu transfekte edilmiş MCF-7 hücre hattına ait eğri.)



Şekil 4. 6. 24. saat örnek erime eğrileri

RT-PCR Değişim Katsayısı Hesabı = $2^{-(Ct_{örnek} - Ct_{kontrol})}$

MCF-7 Hücre Hattı Gen Değişimi Hesabı: $2^{-(25,24-15,18) - (25,46-15,36)} = 2^{0,04}$

$2^{0,04} = 1,02$ MCF-7 hücre grubu Negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında 1,02 kat gen ekspresyonunda artış olduğunu gösterir. Yani %2 artmıştır.

MCF-7 siRNA-SLC9A3-AS1+ PD gen değişimi Hesabı: $2^{-(27,22-15,39) - (25,46-15,36)} = 2^{-1,73}$

3,31 kat gen ekspresyonu negatif kontrol grubuna göre azalmıştır. Yani %30,21'e düşmüştür. Sonuç olarak %69,79 oranında azalmıştır.

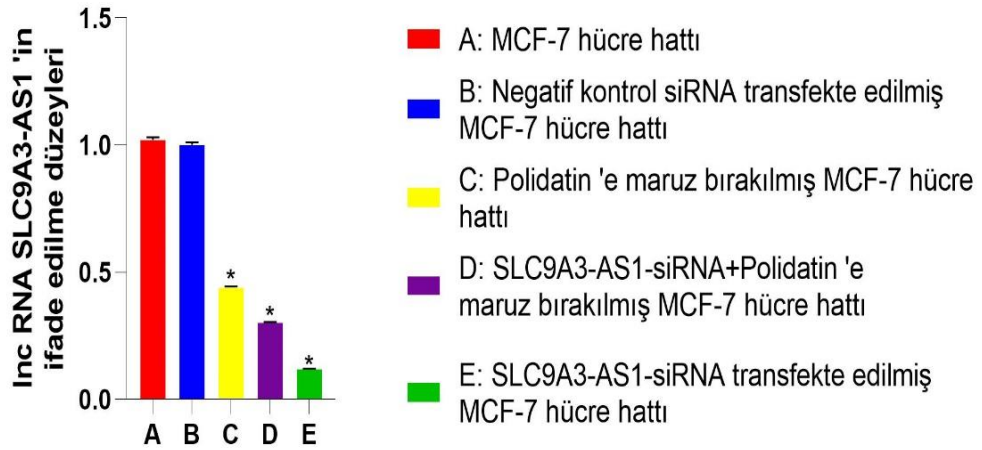
MCF-7 siRNA -SCL9A3-AS1 gen değişimi Hesabı: $2^{-(28,47-15,30) - (25,46-15,36)} = 2^{-3,07}$

8,39 kat gen ekspresyonu negatif kontrole göre azalmıştır. Yani %11,90'a düşmüştür. Sonuç olarak %88,1 oranında susturulmuştur.

MCF-7 hücre hattı+PD gen değişim Hesabı: $2^{-(26,41-15,13) - (25,26-15,36)} = 2^{-1,18}$ 2,26 kat gen ekspresyonu negatif kontrole göre azalmıştır. Yani %44,24'e düşmüştür. Sonuç olarak %55,76 oranında gen ekspresyonu azalmıştır (Şekil 4.7.).

Tablo 4. 3. Her bir hücre örneğindeki genlerin ortalama Ct değerleri(24.saat)(N=5)

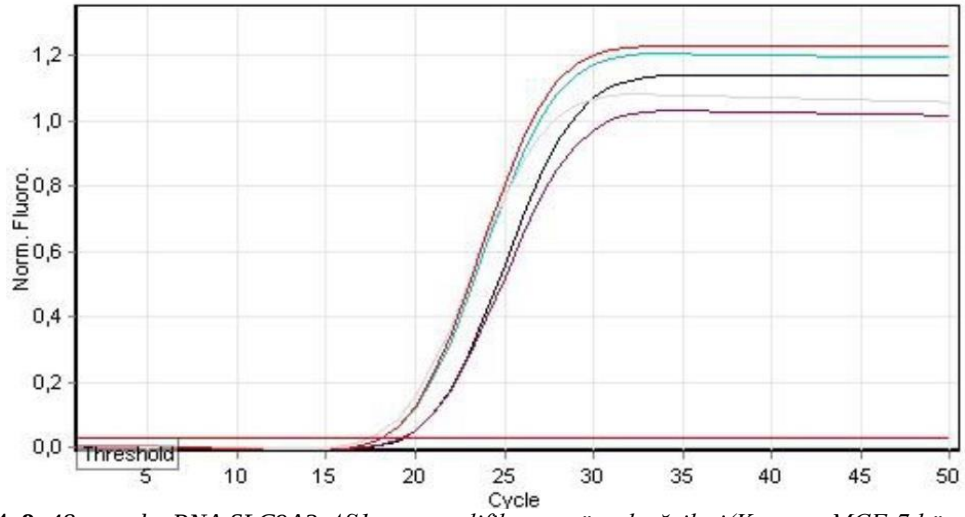
	lncRNA SLC9A3-AS1	GAPDH
MCF-7 hücre hattı örneğine ait ortalama Ct değeri	25,24±0,14	15,18±0,12
SLC9A3-AS1-siRNA havuzu transfekte edilmiş MCF-7 hücre hattı+PD örneğine ait ortalama Ct değeri	27,22±0,21	15,39±0,14
SLC9A3-AS1-siRNA havuzu transfekte edilmiş MCF-7 hücre hattı örneğine ait ortalama Ct değeri	28,47±0,16	15,30±0,13
Negatif kontrol-siRNA transfekte edilmiş MCF-7 hücre hattı örneğine ait ortalama Ct değeri	25,46±0,25	15,36±0,18
MCF-7 hücre hattı+PD örneğine ait ortalama Ct değeri	26,41±0,15	15,13±0,11



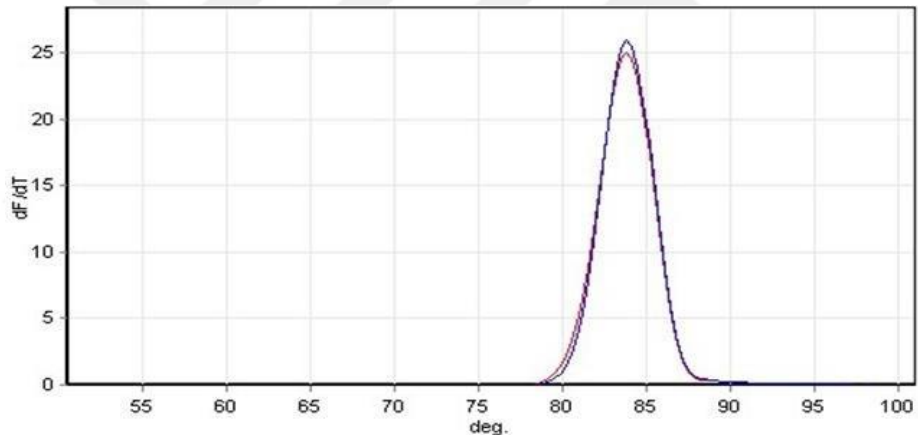
Şekil 4. 7. MCF-7 hücre hatlarında SLC9A3-AS1 'in ifade edilme düzeyleri (24.saat) (* $P < 0.05$)($N=5$)

Negatif kontrol-siRNA transfekte edilen MCF-7 hücre hattı ile SLC9A3-AS1-siRNA transfekte edilen MCF-7 hücre hattı arasındaki SLC9A3-AS1 'in ifade düzeyleri karşılaştırıldığında, SLC9A3-AS1-siRNA transfeksiyonunun ardından SLC9A3-AS1'in ifadesinin %88 oranında susturulduğu görülmektedir. Buna karşın, negatif kontrol-siRNA transfekte edilen MCF-7 hücre hattı ile SLC9A3-AS1-siRNA transfekte edilen ve PD'e maruz bırakılan MCF-7 hücre hattı arasındaki SLC9A3-AS1 'in ifade düzeyleri karşılaştırıldığında ise, SLC9A3-AS1 'in ifadesinin % 68 oranında susturulduğu, negatif kontrol-siRNA transfekte edilen MCF-7 hücre hattı ile PD'e maruz bırakılan MCF-7 hücre hattı karşılaştırıldığında SLC9A3-AS1 'in ifadesinin %58 oranında susturulduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.7). Buna göre, MCF-7 hücrelerine SLC9A3-AS1-siRNA transfeksiyonunun SLC9A3-AS1'in ekspresyonunu en etkili şekilde baskıladığı saptanmıştır.

MCF-7 meme kanseri hücrelerine 25 nM SLC9A3-AS1-siRNA ve 25 nM Negatif kontrol-siRNA 'ların transfekte ve 160 μ M PD maruziyetinden sonra oluşturulan 5 farklı grupta 48 saat sonra SLC9A3-AS1 'in ifade edilme düzeyleri saptanmıştır. RT-PCR cihazından elde edilmiş olan SLC9A3-AS1 geninin 48. saat sonraki amplifikasyon eğrilerine ait örnekler Şekil 4.8. 'de, 48. saat sonraki erime eğrileri Şekil 4.9. 'de gösterilmektedir.



Şekil 4. 8. 48. saat lncRNA SLC9A3-AS1 gen amplifikasyon örnek eğrileri (Kırmızı: MCF-7 hücre hattına ait eğri, Yeşil: Negatif kontrol-siRNA transfekte edilmiş MCF-7 hücre hattına ait eğri, Mavi: SLC9A3-AS1-siRNA havuzu transfekte edilmiş MCF-7 hücre hattına ait eğri, Turuncu: Polidatin uygulanmış MCF-7 hücre hattına ait eğri, Mor: Polidatin+SLC9A3-AS1-siRNA havuzu transfekte edilmiş MCF-7 hücre hattına ait eğri)



Şekil 4. 9. 48. saat örnek erime eğrileri

Tablo 4. 4. Her bir hücre örneğindeki genlerin ortalama Ct değerleri(48..saat)(N=5)

	lncRNA SLC9A3-AS1	GAPDH
MCF-7 hücre hattı örneğine ait ortalama Ct değeri	19,44±0,18	16,59±0,09
SLC9A3-AS1-siRNA havuzu transfeke edilmiş MCF-7 hücre hattı+PD örneğine ait ortalama Ct değeri	18,05±0,13	14,20±0,11
SLC9A3-AS1-siRNA havuzu transfeke edilmiş MCF-7 hücre hattı örneğine ait ortalama Ct değeri	19,21±0,14	15,41±0,10
Negatif kontrol-siRNA transfeke edilmiş MCF-7 hücre hattı örneğine ait ortalama Ct değeri	17,59±0,12	14,77±0,13
MCF-7 hücre hattı+PD örneğine ait ortalama Ct değeri	18,22±0,21	14,91±0,14

MCF-7 Hücre Hattı Gen Değişimi Hesabı: $2^{-(19,44-16,59)-(17,59-14,77)} = 2^{-0,03}$

Negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında 1,02 kat gen ekspresyonunda azalmıştır. Yani

%98,03'e düşmüştür. Sonuç olarak %1,97 oranında azalmıştır.

MCF-7 siRNA-SLC9A3-AS1+ PD gen değişimi Hesabı: $2^{-(18,05-14,40)-(17,59-14,77)} = 2^{-0,83}$

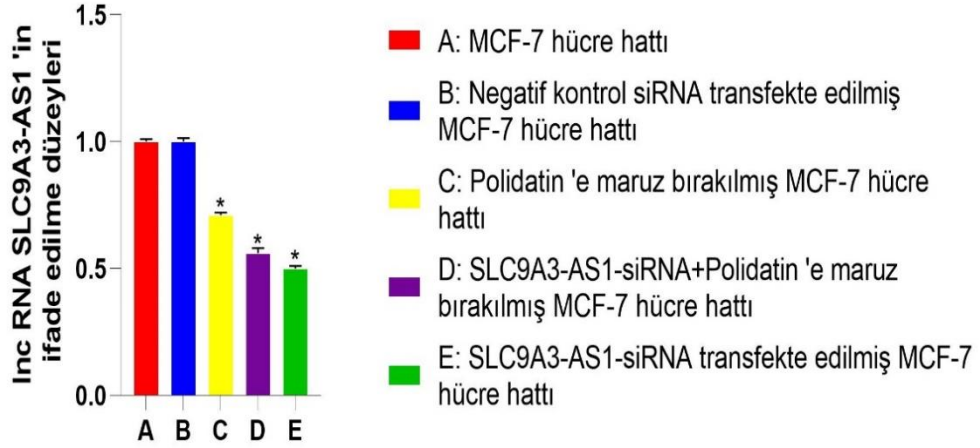
1,77 kat gen ekspresyonu negatif kontrol grubuna göre azalmıştır. Yani %56,49'a düşmüştür. Sonuç olarak %43,51 oranında azalmıştır

MCF-7 siRNA -SCL9A3-AS1 gen değişimi Hesabı: $2^{-(19,21-15,41)-(17,59-14,77)} = 2^{-0,98}$

1,97 kat gen ekspresyonu negatif kontrole göre azalmıştır. Yani %50,76'a düşmüştür. Sonuç olarak %49,24 oranında susturulmuştur.

MCF-7 hücre hattı+PD gen değişim Hesabı: $2^{-(18,22-14,91)-(17,59-14,77)} = 2^{-0,49}$

1,40 kat gen ekspresyonu negatif kontrol grubuna göre azalmıştır. Yani %71,42'e düşmüştür. Sonuç olarak %28,58 oranında azalmıştır (Şekil 4.10.).



Şekil 4. 10. MCF-7 hücre hatlarında SLC9A3-AS1 'in ifade edilme düzeyleri (48.saat) (*P < 0.05)(N=5)

Negatif kontrol-siRNA transfekte edilen MCF-7 hücre hattı ile SLC9A3-AS1-siRNA transfekte edilen MCF-7 hücre hattı arasındaki SLC9A3-AS1 'in ifade düzeyleri karşılaştırıldığında, SLC9A3-AS1-siRNA transfeksiyonunun ardından SLC9A3-AS1'in ifadesinin %51 oranında susturulduğu, negatif kontrol-siRNA transfekte edilen MCF-7 hücre hattı ile SLC9A3-AS1-siRNA transfekte edilen ve PD'e maruz bırakılan MCF-7 hücre hattı arasındaki SLC9A3-AS1'in ifade düzeyleri karşılaştırıldığında, SLC9A3-AS1 'in ifadesinin %56 oranında susturulduğu, negatif kontrol-siRNA transfekte edilen MCF-7 hücre hattı ile PD'e maruz bırakılan MCF-7 hücre hattı karşılaştırıldığında SLC9A3-AS1'in ifadesinin %71 oranında susturulduğu belirlenmiştir (p < 0.05) (Şekil 4.10.). PD'e maruz bırakılan MCF-7 hücrelerindeki SLC9A3-AS1 'in ifade düzeylerinde 24 ve 48. saatler arasında azalma olduğu belirlenmiştir. PD'e maruz bırakılan, SLC9A3-AS1-siRNA transfekte edilip PD'e maruz bırakılan ve sadece SLC9A3-AS1-siRNA transfekte edilen MCF-7 hücrelerindeki SLC9A3-AS1'in ifade düzeyleri zamana bağlı olarak 24.saat ve 48.saat kıyaslandığında SLC9A3-AS1'in ifade düzeylerinin 48. saatte artmış olduğu saptanmıştır. Bu durum siRNA kit protokolünde de belirtildiği gibi SLC9A3-AS1-siRNA transfeksiyonunun 24.saat sonrasında gen ekspresyonunu baskılayıcı etkisinin zamana bağlı olarak azalmasından kaynaklandığını göstermektedir.

4.5. Proliferasyon ve Apoptoz ile ilişkili genlerin profillerinin belirlenmesi

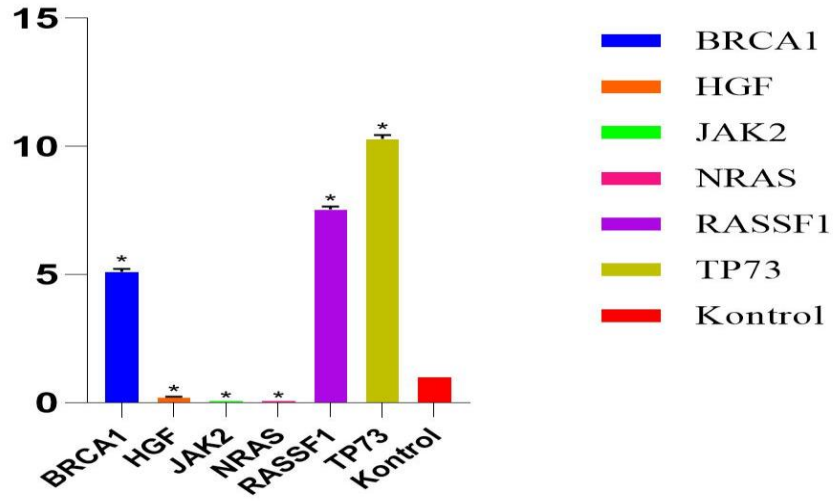
Negatif kontrol-siRNA transfekte edilmiş MCF-7 meme kanseri hücreleri ile SLC9A3-AS1-siRNA havuzu transfekte edilmiş MCF-7 meme kanseri hücrelerinde proliferasyon ve apoptoz ile ilişkili genlerin profilleri belirlenmiştir (Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.).

Tablo 4. 5. MCF-7 hücrelerinde proliferasyon ile ilişkili genlerin ifade edilme kat regülasyonları(K=25 nM Negatif kontrol-siRNA transfekte edilmiş MCF-7 hücre hattı, N=25 nM SLC9A3-AS1-siRNA transfekte edilmiş MCF-7 hücre hattı. K için, iç kontrol ortalama Ct değeri 20,10 olarak saptanmıştır. N için ise, iç kontrol ortalama Ct değeri 18,45 olarak saptanmıştır.)(N=1)

GEN ADI	Ortalama Ct değeri		Ortalama ΔCt		Kat değişimi $2^{(-\Delta\Delta Ct)} \cdot 10^3$		Kat Farkı
	K	N	K	N	K	N	N/K
JAK2	33.01	35.05	12.91	16.55	0.130	0.010	-12.52
NRAS	29.38	31.19	9.28	12.74	1.613	0.146	-11.05
TP73	31.03	26.01	10.93	7.56	0.514	5.292	10.30
RASSF1	31.59	27.02	11.49	8.57	0.349	2.628	7.54
BRCA1	30.30	26.29	10.20	7.84	0.853	4.358	5.11
HGF	28.29	28.79	8.19	10.34	3.434	0.770	-4.46

SLC9A3-AS1'i susturulan MCF-7 meme kanseri hücreleri ile negatif kontrol siRNA transfekte edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki proliferasyon ile ilişkili her bir genin RT-PCR işlemi sonrasında qiagen firmasının online programı aracılığıyla ortalama Ct değerleri belirlenmiştir. Bu ortalama Ct değerleri tabloda verilmiştir. Ortalama Ct değerlerinden yararlanılarak $2^{(-\Delta\Delta Ct)} \cdot 10^3$ formülü üzerinden tabloda da gösterildiği üzere genlerin ekspresyon kat farkları belirlenmiştir. Elde ettiğimiz verilerden yararlanılarak çizilen Tablo 4.5. 'da tümör süpressör genlerin ekspresyonlarının artış gösterdiği, aksine proliferasyonu indükleyici şekilde hareket eden genlerin ise ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir.

JAK proteini reseptöre ligand bağlanması ardından oluşan sinyalin çekirdeğe ulaştırılması için sinyal yolundaki moleküllerin aktivasyonunu sağlayan gendir. SLC9A3-AS1 geninin siRNA aracılığıyla susturulmasının ardından MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki JAK2 ekspresyon seviyelerinin 12,52 kat azaldığı saptanmıştır ($p < 0.05$) (Tablo 4.5.). NRAS proteini reseptöre ligand bağlanması ile aktif hale geldiğinde sinyalin çekirdeğe iletilmesi için sinyal yolu proteinleri ve lipidlerle etkileşime giren Ras ailesi proteinidir. SLC9A3-AS1 geni susturulan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde NRAS ekspresyonunun 11,05 kat azaldığını göstermiştir ($p < 0.05$) (Tablo 4.5.). TP73, kök hücrelerin biyolojisinde, embriyonik gelişim aşamasında, hücrelerin farklılaşmamasında ve çoğalmasında, hücrelerin metabolik süreçlerinde, DNA 'da meydana gelen hasarın onarımı safhası gibi birçok biyolojik süreçte rol oynayan proteindir SLC9A3-AS1 'in ifadesinin azaltılmasının ardından MCF-7 meme kanseri hücrelerinde TP73 ekspresyonunun 10,30 kat artmıştır ($p < 0.05$) (Tablo 4.5.). RASSF1 tümör süpressör bir gendir. RASSF1A inaktivasyonu tümör süpressör etkinin ortadan kalkarak kanser gelişiminin başlamasına ve hücre proliferasyonunda artış sonucu kanserin ilerlemesine neden olmaktadır. RASSF1A genine ait promotör bölge metilasyonu aracılığıyla ortaya çıkan RASSF1A inaktivasyonu hücrelerin apoptozunu da inhibe etmektedir. siRNA aracılığıyla susturulan SLC9A3-AS1 'in MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki RASSF1 ekspresyonunu 7,54 kat arttığı görülmüştür ($p < 0.05$) (Tablo 4.5.). BRCA1 kalıtsal olarak ortaya çıkan meme kanserinin gelişimiyle ilişkili olan bir tümör baskılayıcı gendir. BRCA1 geninin üzerinde bulunan mutasyonlar meme kanserinin gelişimine ve ilerlemesine neden olmaktadır. BRCA1 hücre döngüsünü ve apoptozu düzenleyerek hücre proliferasyonunu engellemektedir. siRNA aracılığıyla susturulan SLC9A3-AS1'in MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki BRCA1'in ekspresyonunu 5,11 kat arttığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 4.5.). HGF tarafından ligandların iletimi, ligand aktivasyonunu yolu ile Met tirozin kinaz aktivasyonu sağlanmaktadır. SLC9A3-AS1'in siRNA aracılığıyla susturulmasının ardından MCF-7 hücrelerinde HGF 'nin ekspresyonunun 4,46 kat azalmıştır ($p < 0.05$) (Tablo 4.5.).



Şekil 4. 11. MCF-7 hücre hatlarında proliferasyon ile ilişkili genlerin ifade edilme düzeyleri (Kontrol grubu: 25 nM Negatif kontrol-siRNA transfekte edilmiş MCF-7 hücre hattı) (*P < 0.05)(N=1)

Tümör süpressör genlerden olan TP73, RASSF1 ve BRCA1'in SLC9A3-AS1'in susturulması ile birlikte ifadelerinde meydana gelen artış meme kanseri hücrelerinde proliferasyonunun baskılanmasına bu genlerin aracılık ettiğini desteklemektedir. Bununla birlikte, proliferasyonda görev alan genlerden olan JAK2, NRAS ve HGF 'nin ifadelerindeki azalış ise SLC9A3-AS1'i susturulan MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki proliferasyonunun baskılanmasına pozitif yönde ek katkı sağladığını söylemek mümkündür.

Tablo 4. 6. MCF-7 hücrelerinde apoptoz ile ilişkili genlerin ifade edilme kat regülasyonları ((K=25 nM Negatif kontrol-siRNA transfekte edilmiş MCF-7 hücre hattı, N=25 nM SLC9A3-AS1-siRNA transfekte edilmiş MCF-7 hücre hattı. K için, iç kontrol ortalama Ct değeri 20,04 olarak saptanmıştır. N için ise, iç kontrol ortalama Ct değeri 19,55 olarak saptanmıştır.)(N=1)

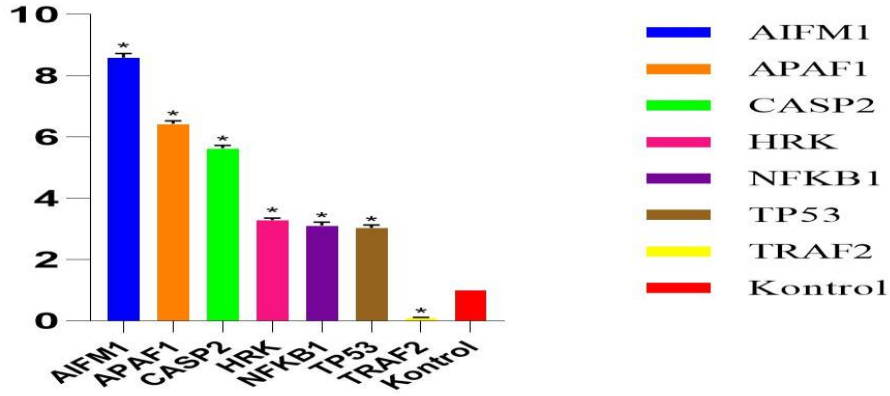
GEN ADI	Ortalama Ct değeri		Ortalama ΔCt		Kat değişimi $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.10 ³		Kat Farkı
	K	N	K	N	K	N	
TRAF2	30.35	33.07	10.31	13.52	0.787	0.085	-9.22
AIFM1	30.65	27.06	10.61	7.51	0.639	5.501	8.61
APAF1	25.50	22.33	5.46	2.78	22.687	145.996	6.44
TP53	24.22	21.24	6.94	5.09	55.093	310.787	5.64
HRK	33.60	31.40	13.56	11.85	0.083	0.272	3.29
NFKB1	27.66	25.54	7.62	5.99	5.076	15.777	3.11
CASP2	28.83	26.74	8.79	7.19	2.256	6.867	3.04

SLC9A3-AS1'i susturulan MCF-7 meme kanseri hücreleri ile negatif kontrol siRNA transfekte edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki apoptoz ile ilişkili her bir genin RT-PCR işlemi sonrasında ortalama Ct değerleri ve genlerin ekspresyon kat farkları Tablo 4.6.' daki şekilde belirlenmiştir. Tablo 4.6.' da apoptozu indükleyen genlerin ekspresyonlarının artış gösterdiği, apoptozu inhibe eden genin ise ekspresyonunda azalma meydana geldiği gösterilmiştir.

TRAF2 proteini tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili TNF reseptörü 2 (TNFR2) 'ye bağlanan bir faktör proteindir. TRAF2, hücre proliferasyonu ile ilişkili MAPK yolunun sinyallenmesinin indüklenmesinde rol oynamaktadır. TRAF2 proteini bir

onkogen olarak Wnt/ β -katenin yolunun düzenlenmesinde de görev yapmaktadır. Kanser hücrelerinin oluşumu, proliferasyonu ve göçünde bu sinyal yolu üzerine aktivasyonu TRAF2'ye onkogen görevi kazandırmaktadır. MCF-7 hücrelerinde SLC9A3-AS1'in susturulmasının ardından TRAF2 ekspresyonunun 9,22 kat azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 4.6.). AIFM1 mitokondri ile ilişkili hücre apoptozunu kaspazların aktive olduğu yoldan farklı şekilde indükleyen bir proteindir. SLC9A3-AS1'in susturulmasının ardından MCF-7 hücrelerinde AIFM1 geninin ekspresyonunun 8.61 kat artmıştır ($p < 0.05$) (Tablo 4.6.). APAF1 proteini intrinsik yolun üzerinde bulunan bu yolun aktivasyonunda görevli bir proteindir. Özellikle, kanserde APAF1 ekspresyonundaki azalış kanserli hücrelerin apoptoz düzeylerinde de azalmaya aracılık ederek kanserin hızlı bir şekilde gelişmesine ve metastaz aracılığıyla yayılmasına neden olmaktadır. SLC9A3-AS1'in susturulması ile birlikte, çalışmamızda APAF1'in ekspresyonunun 6,44 kat arttığı gözlenmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 4.6.). TP53 tümör süpressör gen ailenin bir üyesidir. TP53'ün artan ekspresyonu hücre büyümesi ve çoğalmasını inhibe edici yönde etki etmektedir. Ayrıca, onkojenik değişikliklere maruz kalan hücrelerin hayatta kalıp kalmayacaklarına karar veren mekanizmaları düzenler. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde SLC9A3-AS1'in susturulması sonucunda TP53'ün 5,64 kat arttığı belirlenmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 4.6.). HRK geni ilk olarak hematopoietik hücreler ile nöron hücrelerinde azalan sitokin düzeylerine yanıt olarak sentezlendiği ve proapoptotik bir gen olduğu bildirilmiştir. HRK geninde meydana gelen ekspresyon düzeylerindeki azalmanın en önemli nedeninin genin promotör bölgesindeki CpG adalarının anormal metilasyonu sonucu gerçekleştiği bildirilmiştir. HRK geninin birçok kanser türünde epigenetik olarak düzenlenmesi kanser gelişimine ve ilerlemesine katkı sağlamaktadır. SLC9A3-AS1 geni susturulan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde HRK ekspresyonunun 3,29 kat arttığı gözlenmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 4.6.). NF- κ B sinyal yolu kanser oluşumu ile yakın ilişkilidir. Apoptoz kontrolü NF- κ B sinyal yolu aracılığıyla sağlanmaktadır. DNA hasarı olduğunda NF- κ B proteinleri hücresel yanıtın oluşturulmasında aktif rol oynamaktadır. NF- κ B1 proteini özellikle DNA 'nın alkilasyon hasarında hücresel yanıtı oluşturup tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır. SLC9A3-AS1 geni susturulan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde NFKB1 ekspresyonu 3,11 kat artış göstermiştir ($p < 0.05$) (Tablo 4.6.). Kaspaz2 (CASP2) proteini hücre apoptozu ve inflamasyon ile ilgili hücresel işlevlerde görev alan ve kaspaz ailesine ait olan bir moleküldür. CASP2, hücrelerde apoptozu indüklediği için tümör baskılayıcı gen olarak ifade edilmektedir.

SLC9A3-AS1 geni susturulan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde CASP2 ekspresyonu 3,04 kat artış göstermiştir ($p < 0.05$) (Tablo 4.6.).

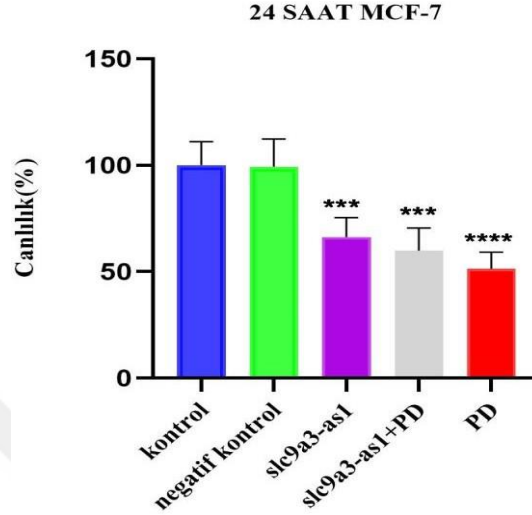


Şekil 4. 12. MCF-7 hücre hatlarında apoptoz ile ilişkili genlerin ifade edilme düzeyleri (Kontrol grubu: 25 nM Negatif kontrol-siRNA transfekte edilmiş MCF-7 hücre hattı) (* $P < 0.05$)(N=1)

Apoptozu indükleyici olarak davranan genlerden olan AIFM1, APAF1, TP53, HRK, NFKB1 ve CASP2'nin SLC9A3-AS1'in susturulması ile birlikte ifadelerinde meydana gelen artış, meme kanseri hücrelerinde apoptozun indüklenmesine bu genlerin aracılık ettiğini desteklemektedir. Apoptozun inhibe edilmesinde görev alan TRAF2'nin ekspresyonunun azalması ise indüklenen apoptoza pozitif yönde katkı sağladığını bildirmektedir. Bu durum, SLC9A3-AS1'i susturulan MCF-7 meme kanseri hücrelerinin apoptoza yatkın hale geldiğini ve hücre proliferasyonunun inhibe olduğunu göstermektedir.

4.6. MTT Yöntemi Aracılığıyla Susturma Sonrası % Canlılık Değerlerinin Belirlenmesi

Susturma işleminden 24 saat sonra MCF-7 meme kanseri hücrelerinin % canlılık değerleri MTT yöntemi aracılığıyla belirlenmiştir (Şekil 4.13.).



Şekil 4. 13. MCF-7 hücre hatlarının % canlılık düzeyleri(*** $P < 0.001$ **** $p < 0.0001$)($N=3$)

Şekil 4.13’ de üç bağımsız veriden elde edilen sonuçlara göre kontrol grubu ve negatif kontrol-siRNA transfekte edilmiş MCF-7 hücre hatları arasında % canlılık açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ancak, SLC9A3-AS1-siRNA havuzu transfekte edilmiş MCF-7 hücre hattı ile negatif kontrol-siRNA transfekte edilmiş MCF-7 hücre hatlarının % canlılık değerleri kıyaslandığında, SLC9A3-AS1-siRNA havuzu transfekte edilen MCF-7 hücre hattı grubundaki hücre canlılığının anlamlı bir şekilde

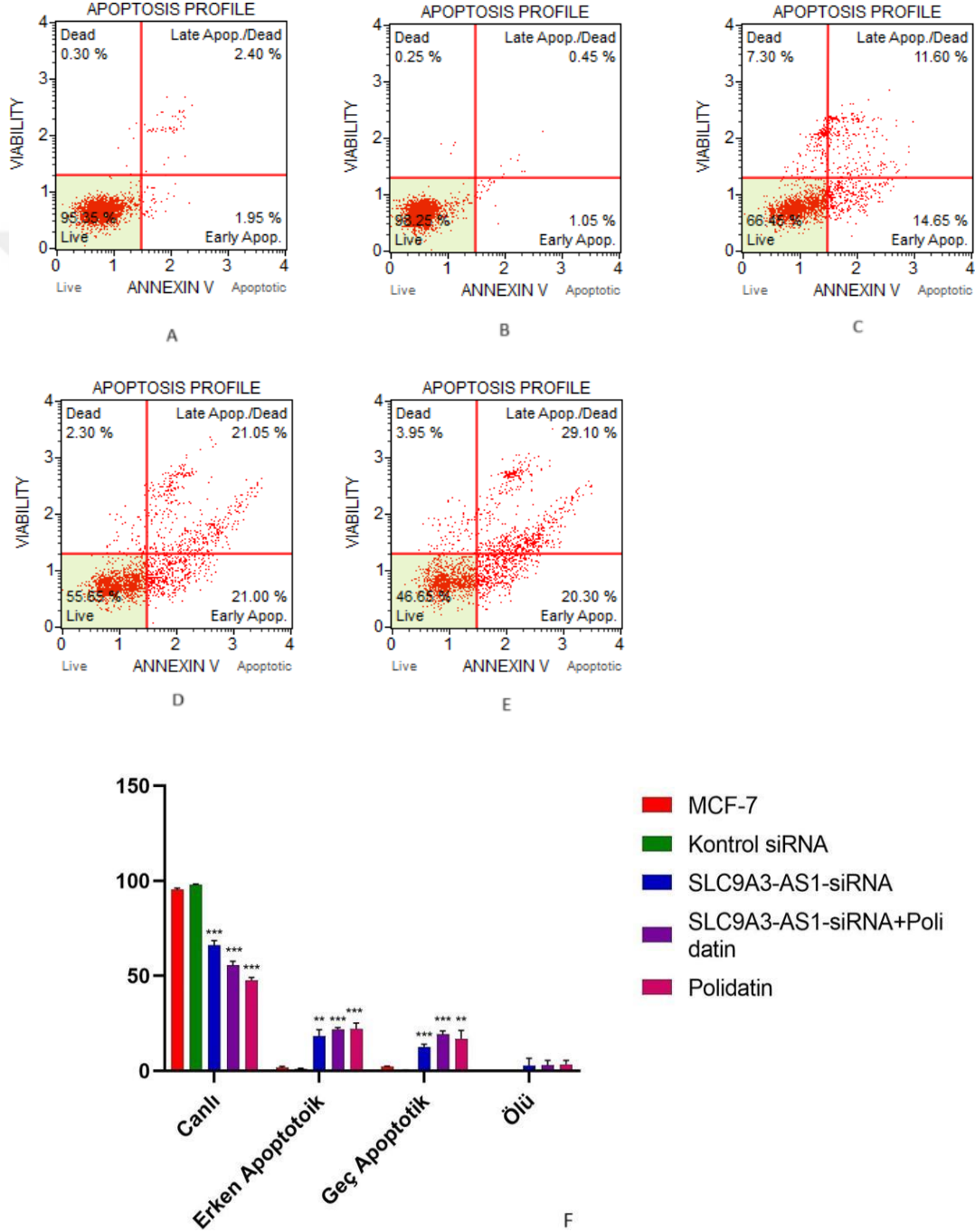
%66 ‘a düştüğü ($P < 0.001$), SLC9A3-AS1-siRNA havuzu transfekte edilen ve 160 μ M PD’e maruz bırakılan MCF-7 hücre hattı grubundaki hücre canlılığının %56.7’ye düştüğü ($P < 0.001$) ve 160 μ M PD eklenen MCF-7 hücre hattı grubundaki hücre canlılığının %51.2’ye düştüğü ($P < 0.0001$) belirlenmiştir.

SLC9A3-AS1-siRNA havuzu transfekte edilmiş MCF-7 hücrelerinde tümör baskılayıcı ve apoptozu indükleyici genlerin ekspresyonlarında meydana gelen artışlar ile proliferasyonu indükleyici ve apoptozu baskılayan genlerin ifadelerinde azalmalar, Şekil

4.13.’ de de gösterildiği üzere SLC9A3-AS1-siRNA havuzu transfeksiyonu sonrası ortaya çıkan meme kanseri hücre canlılığındaki azalmayı desteklemektedir. PD’de SLC9A3-AS1 ve diğer kanser ile ilişkili LncRNA ve diğer faktörleri baskılayarak meme kanseri hücrelerinin canlılığını azalttığını ve anti-kanser etki gösterdiğini söylemek mümkündür.

4.7. Flowsitometre yöntemi ile Apoptoz düzeyinin belirlenmesi

Tüm MCF-7 meme kanseri hücre gruplarındaki erken apoptoz düzeyleri, yapılan transfeksiyon ve IC₅₀ PD uygulaması işlemlerinden 24 saat sonra Muse Annexin V apoptoz kiti aracılığıyla saptanmıştır (Şekil 4.14.).

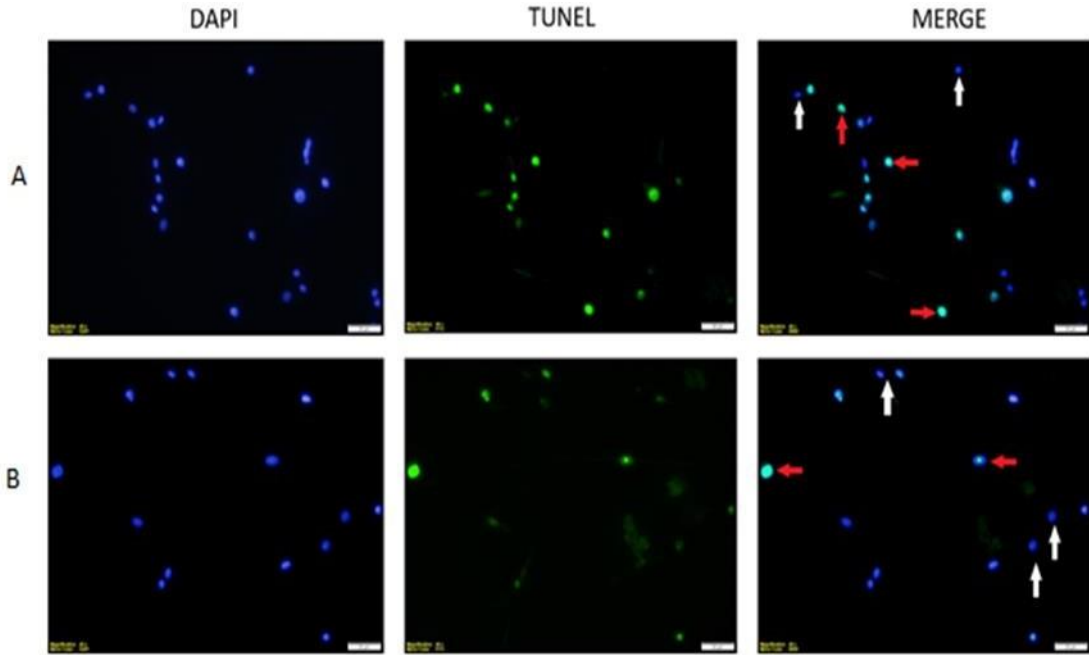


Şekil 4. 14. MCF-7 hücre hatlarındaki apoptoz düzeyleri (A: MCF-7 hücre hattı, B: Kontrol siRNA, C: SLC9A3-siRNA, D:SLC9A3-siRNA+Polidatin, E: Polidatin) (**P < 0.01, ***P < 0.001, *P < 0.05)(N=3)

Şekil 4.14 ‘de gösterilen üç bağımsız veriden elde edilen ortalamalara göre, SLC9A3-AS1-siRNA havuzu transfekte edilmiş MCF-7 hücre popülasyonundaki apoptotik hücre oranı 26.25%, SLC9A3-AS1-siRNA transfekte edilmiş ve 24 saat boyunca 160 μ M PD’e maruz bırakılan MCF-7 hücre popülasyonundaki apoptotik hücre oranı 42.05% ve sadece 160 μ M PD uygulanan MCF-7 hücre popülasyonundaki apoptotik hücre oranı ise 49.40% olarak belirlenmiştir. SLC9A3-AS1-siRNA havuzu transfekte edilmiş MCF-7 hücre popülasyonundaki hücre ölümü 7.30%, SLC9A3-AS1-siRNA transfekte edilmiş ve 24 saat boyunca 160 μ M PD’e maruz bırakılan MCF-7 hücre popülasyonundaki hücre ölümü 2.30% ve sadece 160 μ M PD uygulanan MCF-7 hücre popülasyonundaki hücre ölümü ise 3.95% olarak belirlenmiştir. Erken apoptotik hücre sayısı PD uygulaması sonrasında en yüksek artışı göstermiştir. PD ‘nin SLC9A3-AS1’in ekspresyonunu baskılamasının yanında birçok apoptoz ile ilgili genlerin ifadelerini düzenlemesi meme kanseri hücrelerinde PD’in meme kanseri hücrelerini daha fazla apoptoza yönlendirdiğini desteklemektedir.

4.8. TUNEL analizi

Hücre gruplar arasında geç apoptozun belirlenmesi için yapılan TUNEL boyama ile apoptotik hücre çekirdeklerinin yeşil renkte ışıma verdiği, alanda fotoğraflanan tüm hücrelerin çekirdeklerinin DAPI boyama ile mavi renkte ışıma verdiği görülmüş, farkın anlaşılır olması için iki fotoğraf birleştirilmiştir (Şekil 4.15.). Buna göre, SLC9A3-AS1-siRNA ile transfeke edilen hücre hattında, negatif kontrol siRNA transfeke edilen kontrol grubu hücre hattına oranla daha fazla TUNEL pozitif hücre belirlenmiştir. Apoptotik hücre sayısı SLC9A3-AS1-siRNA ile susturulan MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuna göre daha fazladır.



Şekil 4. 15. TUNEL analizi (A: SLC9A3-AS1-siRNA ile transfeke edilen hücre hattı, B: Negatif kontrol siRNA transfeke edilen kontrol grubu hücre hattı)(N=3)

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Meme kanseri 2022 yılında tanı alan kanser hastalarının verilerine göre %23.8 oranla kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür (ME vd., 2024). Kişilerin genetik yapısı, stromal etkiler veya makrofajlar kanserin ortaya çıkışında önemli rol oynar (Sun vd., 2017). Son yıllarda meme kanseri hastalarının tedaviye yanıt oranı her ne kadar yüksek olsa da hastaların çoğunun nüksettiği veya tedaviye dirençli kaldığı görülmektedir. Bu nedenle meme kanseri için yeni terapötik stratejiler bulmak büyük önem taşımaktadır.

PD , *Polygonum cuspidatum* bitkisinin kökü ve rizomundan ekstrakte edilen ve resveratrolün bir hidroksil grubu yerine C-3 pozisyonuna bir glikozit bağlanan formudur. (Chen ve Sijia, 2017). PD, resveratrolün glikozillenmiş formu olup trans(E) formda stilben türevidir. Stilben türevi olması ve glikozillenmiş olması bileşiğin biyotransformasyonu hakkında önemli rol oynar. Stilbenler biyoaktiviteleri nedeniyle Faz II'yi tercih ederler. Glikolizasyon stilbenlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirebilen ikincil metabolitlerde gözlenen en sık değişiklik olarak tanımlanır (Mendonça vd., 2024). Önceki çalışmalar PD'in lösemi, meme kanseri, akciğer kanseri, rahim ağzı kanseri ve karaciğer kanseri gibi çeşitli tümörlerin çoğalmasının engellenmesinde potansiyel bir rol oynadığı ve MDA-MB231, MCF-7 gibi farklı meme kanseri hücre dizilerinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği görülmektedir (Zhang vd., 2014). PD'in kanser hücrelerinde apoptozu indükleyen iyi bir terapötik ajan olduğu bilinmektedir (Neto vd., 2008). Bu çalışmada, PD'in MCF-7 meme kanseri hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücrelerin çoğalmasını bastırdığını ve apoptozu artırdığını gözlemlenmiştir.

PD'in MCF-7 meme kanserindeki lncRNA'lar üzerinden anti-kanser etkisinin belirlenebilmesi ve lncRNA'lar üzerinden etki mekanizmasının aydınlatılması amacıyla, ilk olarak PD'in meme kanser hücrelerindeki % canlılık göstergesi olan IC₅₀ dozu ve bu IC₅₀ dozunda en dramatik ekspresyon değişimine maruz kalan lncRNA tarafından düzenlenen proliferasyon ve apoptoz ilişkili genlerin ekspresyonlarının düzeyleri saptanmıştır. PD'e 24 saat boyunca maruz bırakılan MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki IC₅₀ dozu 162,60 µmol/L olarak, 48. saatteki IC₅₀ dozu ise 105,5 µmol/L olarak saptanmıştır. Bu konuda yapılan çalışmalara bakıldığında, PD uygulamasının multiple myeloma kanseri hücrelerinde proliferasyon, apoptoz ve otofajideki rolünün araştırıldığı bir çalışmada PD'in 24. saatindeki IC₅₀ dozu 131 µmol/L olarak belirlenmiştir (Yang ve

Zhao, 2017). Yine PD'in kolon kanseri hücreleri üzerine hücre farklılaşması ve hücre döngüsündeki etkisinin incelendiği başka bir araştırmada Caco-2 hücrelerinin 24. saat IC₅₀ dozu 72 µmol/L olarak saptanmıştır (De Maria vd., 2013). Çalışmamıza yakın olarak yapılan, PD ve 2-deoksi glukozun meme kanserindeki etkisini ayrı ayrı ve 2 'li kombin şeklinde incelendiği araştırmada PD'in MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki IC₅₀ dozu 103,1 µmol/L olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2019).

Tümörlerde anormal şekilde eksprese edilen lncRNA'lar onkogeneze ve kanserin ilerlemesinde önemli işlevleri yerine getirir (Ghafouri-Fard vd., 2020; McCabe ve Rasmussen, 2021). LncRNA'lar kanserin etkisinde önemi büyük olan epigenetik yolların değişimine aracılık ederler. Ayrıca hücre proliferasyonunu etkileyen birçok genin ifadesini artırarak kanserin ortaya çıkmasında büyük rol oynarlar (Kazimierczyk ve Wrzesinski, 2021). İnsan genomunda 50.000'den fazla lncRNA mevcuttur (Xu vd., 2017). Ancak bunların çoğu meme kanserinde araştırılmamıştır ve bu nedenle daha fazla araştırmaya gerek duyulmuştur.

PD'in 24 saat süresince IC₅₀ dozu uygulanan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde mikroarray aracılığıyla lncRNA ekspresyon taraması sonucunda en dramatik değişimin lncRNA SLC9A3-AS1 'de olduğu belirlenmiştir. Daha önce akciğer kanseri ve nazofarenks kanseri ile yapılan bir çalışmada lncRNA SLC9A3-AS1'in susturulması sonucu hücre proliferasyonunun azaldığı, hücre hatlarında göç ve istila yeteneklerinin baskılandığını gözlemlenmiştir (Huang vd., 2022).

PD'in lncRNA SLC9A3-AS1 üzerinden gösterdiği anti-kanser etkinin moleküler mekanizmalarını saptamak amacıyla, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde lncRNA SLC9A3-AS1 'in susturulmasının ardından proliferasyon ile ilişkili genlerden JAK2, NRAS, TP73, RASSF1, BRCA1, HGF 'nin ve apoptoz ile ilişkili genlerden TRAF2, AIFM1, APAF1, TP53, HRK, NFkB1, CASP2 'nin ifade edilme düzeylerinde anlamlı değişiklikler gözlenmiştir (p<0,005).

JAK proteini molekül ağırlığı 120 ile 140 kDa 'dır. JAK bir tirozin kinaz olmasına rağmen tirozin kinaz reseptörü değildir. JAK proteini reseptörlere ligand bağlanmasının ardından oluşan sinyalin çekirdeğe ulaştırılması için sinyal yolundaki molekülerin aktivasyonunu sağlamaktadır. JAK tirozin kinaz proteini ya da enzimi 4 adet üyeden oluşmaktadır. Bunlar JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2 dir. JAK2 hemen hemen tüm doku

ve tüm hücrelerde eksprese edilip sinyal iletim süreçlerinde rol almaktadır. JAK2 kanserde anormal olarak artan sinyallenmesi nedeniyle hücre proliferasyonu ve hücrelerin hayatta kalmasına katkı sağladığı için kanserin patofizyolojisinde önemli rolleri bulunmaktadır. Bu nedenle, kanserin tedavisinde hedef alınan moleküllerden biri olmuştur (Huang vd., 2022).

JAK2 sinyal yolu kanserin oluşumu ve ilerlemesinin yanında kanserdeki kök hücre biyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Birçok kanser türünde olduğu gibi kolorektal kanserinde de mezenkimal kök hücreler tümör mikro ortamının oluşumuna katılarak kanser hücrelerinin büyümesinde, kanser hücrelerinin yakın ve uzak dokulara istilasında önemli görevlere sahiplerdir. Kolorektal kanseri kaynaklı mezenkimal kök hücreler epitelyalden mezenkimal geçişi indükleyerek kolorektal kanseri oluşumunu tetiklemektedirler. Kolorektal kanseri kaynaklı mezenkimal kök hücreler kanserin oluşumuna ve ilerlemesine sağladıkları katkı salgıladıkları interlökin-6 (IL-6) aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. IL-6 'nın artan düzeyleri kolorektal hücrelerinde PI3K/AKT 'yi aktive ederek indüklenen IL-6/JAK2/STAT3 sinyali yoluyla kolorektal kanserinin ilerlemesine katkı sağlamaktadır. Bu nedenle, IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolunun kolorektal kanserin önlenmesinde ve tedavisinde hedef olabileceği bildirilmiştir (Zhang vd., 2018).

Meme dokusunun gelişiminde JAK2 ve STAT 5 'in meme epitel hücrelerinin büyümesi ve hayatta kalabilmesi açısından büyük önemi vardır. STAT 5 meme kanserinin oluşumunda proto-onkogen olarak rol almaktadır. Meme kanserinde metastaz süreci Jak2/Stat5 yolunun da dahil olduğu bir dizi biyolojik süreç sonucunda gerçekleşir (Wagner ve Rui, 2008). Bununla birlikte, IL-6 'nın artan sentezinin Jak2/Stat3 sinyallenmesini indükleyerek meme kanserinde özellikle kanserin metastatik ilerlemesine neden olduğu gösterilmiştir (Kim vd., 2015).

Tez çalışmamızda, lncRNA SLC9A3-AS1 geninin siRNA aracılığıyla susturulmasının ardından MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki JAK2 ekspresyon seviyelerinin 12,52 kat azaldığı saptanmıştır. JAK2 ile ilgili literatür çalışmalarına dayanarak lncRNA SLC9A3-AS1 'i susturulan meme kanseri hücre hatlarında azalan proliferasyona, JAK2 'nin sentez düzeylerindeki azalışın neden olduğu JAK2/STAT3 sinyallenmesindeki inhibisyonun katkı sağladığını, bu nedenle meme kanseri tedavisinde JAK2 'nin hedef moleküllerden biri olabileceği söylenebilir.

Ras ailesinin proteinleri hücrelerin bölünüp çoğalmasını, hücreler olarak farklılaşma mekanizmalarını ve hücrelerin tüm zor şartlar altında dahi apoptozun inhibe edilerek hayatta kalmasını indükleyen sinyal akışını aktive eder. Ras ailesi proteinlerin üç üyesi bulunmaktadır. Bunlardan biri NRAS 'dır. Ras proteinleri, reseptöre ligand bağlanması ya da mutasyonlar aracılığıyla aktif hale geldiğinde, sinyalin çekirdeğe ulaştırılabilmesi için diğer sinyal yolu proteinleri ve lipitlerle etkileşime girerler. Ras proteinlerinin yapısal olarak sürekli aktif bir halde olmasına aracılık eden Ras mutasyonları kanserde sıklıkla karşılaşılan mutasyonlardandır. Bu mutasyonlar sonucu Ras yolu aktifleşerek kanserin ortaya çıkışına neden olan hücre farklılaşmasının olmasına ve hücrelerin hızlı bir şekilde büyüüp bölünmesi sonucu tümör dokusunun ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Prior vd., 2020).

Kolorektal kanserli hastaların tümör doku örneklerinde yapılan NRAS mutasyonu taramalarında bu hastaların %2,2 sinde NRAS proteinin kodlayan gen üzerinde mutasyon olduğu saptanmıştır (Irahara vd., 2010). Yine kolorektal kanserde yapılan bir meta analiz çalışmasında NRAS geninde meydana gelen mutasyonların kolorektal kanserli hastalarda zayıf prognozun göstergesi olduğu saptanmıştır. NRAS geninde mutasyon olan kolorektal kanserli kişilerin diğer NRAS geninde mutasyon olmayan kolorektal kanserli hastalara göre yaşam süreleri ciddi oranda azalmaktadır. Bu nedenle NRAS proteininin terapötik hedef molekül olarak görülerek kolorektal kanserinin tedavisi konusundaki çalışmalar için odak olabileceği bildirilmiştir (Hu vd., 2018).

Akciğer kanserli hastalar üzerinde yapılan NRAS mutasyon taramasında hastaların %30 gibi büyük bir oranında NRAS mutasyonları saptanmıştır. NRAS mutasyonları uzun süredir sigara kullanan bireylerde daha yaygın olmasına karşın direkt olarak sigara içilen süre ile ilişkilendirilememiştir. Akciğer kanserinde yüksek oranda NRAS mutasyonu ile karşılaşılması, bu kanser türünde NRAS mutasyonlarının neden olduğu sinyal yolu aktivasyonunun akciğer kanserinde meydana gelen hızlı hücre çoğalmasının ve hücre farklılaşmasının nedenlerinden biri olabileceğine işaret olarak görülebilir (Ohashi vd., 2013). Akciğer kanserinde yapılan başka bir çalışmada, akciğer kanserli hastaların kanlarında KRAS ve NRAS ekspresyon düzeyleri araştırılmış, akciğer kanseri hastalarında KRAS ve NRAS ekspresyon düzeylerinin anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada KRAS ve NRAS ekspresyon düzeylerinin akciğer kanserinin tespitinde ve akciğer kanserinin invaziv olmayan geniş çaplı taramalarında

biyobelirteç olarak kullanılabileceği öngörülmüştür (Rikhtegar, 2018).

Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler, lncRNA SLC9A3-AS1 geni susturulan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde NRAS ekspresyonunun 11,05 kat azaldığını göstermiştir. NRAS ile ilgili olarak yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, NRAS düzeylerindeki azalmanın hücre çoğalmasını engelleyerek meme kanseri hücrelerinde azalan proliferasyona katkı sağladığı söylenebilir. siRNA-SLC9A3-AS1 aracılığıyla meme kanserinde NRAS ekspresyonunun inhibe edilmesi meme kanserinin tedavisine önemli oranda katkı sağlayabilir.

TP73, birçok kanserde türünde değişen ekspresyonları ile ilişkili olarak bildirilen TP53 ailesinin üyesi olan bir proteindir. TP73 geniş biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Özellikle, kök hücrelerin biyolojisinde, embriyonik gelişim aşamasında, hücrelerin farklılaşmamasında ve çoğalmasında, hücrelerin metabolik süreçlerinde, DNA 'da meydana gelen hasarın onarımı safhasında, hücre yaşlanma ve epigenetik kontrol mekanizmaları ile kanserde hücre bölünmesinin ve çoğalmasının inhibe edilmediği biyolojik süreçlerde rol almaktadır (Costanzo vd., 2014).

TP73 konusunda gastrointestinal ve karaciğer kanserinde yapılan çalışmalarda TP73 promotör bölgesinde meydana gelen metilasyonların gastrointestinal ve karaciğer kanseri hücrelerinde TP73 ekspresyonunu negatif yönde düzenleyerek kanserin oluşumuna zemin hazırladığı gösterilmiştir (Yao vd., 2019). Rahim ağzı kanserinde TP73 ile ilgili olarak yapılan çalışmada ise rahim ağzı kanserine sahip hastaların tümör dokularındaki TP73 ekspresyon düzeyleri artışı ile hastalığın iyi prognozu ve hastaların yaşam sürelerinin artışı arasında pozitif yönde bir ilişki bulunmuştur (Ye ve Guo, 2019). Hastalardan elde edilen medulloblastoma doku örnekleri ile medulloblastoma hücre hatlarındaki TP73 ekspresyon düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmada ise medulloblastomada artan TP73 düzeylerinin hastaların prognozuna olumlu katkı sağladığı ve kanserde herhangi bir ilerleme olmadan hastaların sağkalımını artırdığı belirlenmiştir (Castellino vd., 2017).

Elde ettiğimiz verilere göre lncRNA SLC9A3-AS1 geni susturularak lncRNA SLC9A3-AS1 'in ifadesinin azaltılmasının ardından MCF-7 meme kanseri hücrelerinde TP73 ekspresyonunun 10,30 kat artmıştır. Literatürde TP73 konusunda daha önce yapılmış çalışmaların ışığında, TP73 düzeylerindeki artmanın lncRNA SLC9A3-AS1 'in susturulması sonrası meme kanseri hücrelerinde meydana gelen hücre

proliferasyonundaki azalmaya apoptoz üzerinden aracılık edebilir. Ancak, bu etkinin kanıtlanabilmesi için TP73, meme kanseri ve lncRNA 'lar ile ilişkili yeni ve ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

RASSF1A tümör süpressör bir gendir. RASSF1A inaktivasyonu birçok kanser türünün ortaya çıkışından sorumlu tutulmaktadır. Bu genin inaktivasyonu genin silinmesi ya da gen mutasyonları aracılığıyla ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte RASSF1A 'ın promotör bölgesinde meydana gelen metilasyonlar ekspresyonda azalmaya neden olarak RASSF1A 'ın inaktivasyonuna neden olmaktadır. Epigenetik mekanizmalar aracılığıyla ortaya çıkan aktive kaybı, RASSF1A inaktivasyonundan en çok sorumlu olan mekanizmadır. RASSF1A inaktivasyonu tümör süpressör etkinin ortadan kalkarak kanser gelişiminin başlamasına ve hücre proliferasyonunda artış sonucu kanserin ilerlemesine neden olmaktadır. RASSF1A proteini normal olarak herhangi bir enzimatik aktivite içermemektedir. Ras proteini ile birleşme domaini içermesi nedeniyle Ras için bir efektör görevi görmektedir. Bu yolla RASSF1A, hücrelerin apoptoza gidişinde ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Donninger vd., 2007).

3p21.3 lokusunda bulunan RASSF1A geni birçok kanser dokusunda epigenetik yollarla inaktive duruma getirilmiş olarak bulunmaktadır. RASSF1A, siklin D1 sentezini birikimini inhibe edip hücre döngüsünün durması aracılık etmektedir. Fakat, tümör hücrelerinden izole edilen RASSF1A proteininin defektler içerdiği, bu protein defektlerinin RASSF1A proteininin siklin D1 birikimini inhibe etme yeteneğinde kayba neden olarak hücre döngüsünün ilerlemesini durduramayan proteinlerin kodlanmasına ve sentez edilmesine neden olmaktadır. RASSF1A kanserde hücre döngüsünün G1/S fazının ilerlemesini durdurduğu için kanserin durdurulmasına aracılık eden önemli tümör baskılayıcı proteinlerin arasındadır (Shivakumar vd., 2002). RASSF1A geninin promotör bölgesinde meydana gelen hipermetilasyon rahim ağzı kanserinde sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Rahim ağzı skuamöz karsinomda ise nadir olarak görülmektedir. Rahim ağzı kanserine neden olan HPV enfeksiyonu ile RASSF1A geni metilasyonu arasında herhangi bir ilişki bulunmamaktadır. Fakat, rahim ağzı kanserinde HPV enfeksiyonundan bağımsız olarak RASSF1A 'nın epigenetik yollar aracılığıyla susturulmasının rahim ağzı kanserinin gelişimine katkı sağladığı gösterilmiştir (Cohen vd., 2003).

RASSF1A genine ait promotör bölge metilasyonu aracılığıyla ortaya çıkan RASSF1A inaktivasyonu hücrelerin apoptozunu da inhibe etmektedir. RASSF1A

bağlayıcı bir protein olan MOAP-1 proteini aracılığıyla apoptozda rol alan BAX 'a bağlanmakta ve bu yolla hücrelerdeki apoptoz indüklenmektedir. RASSF1A promotör bölgesinin metilasyonu sonucu ekspresyon düzeylerindeki azalma sonucu MOAP-1 proteini ile RASSF1A arasındaki etkileşim sayılarında da düşüşler olacağı için BAX üzerinden apoptoz indüklenme seviyelerindeki azalma apoptozun inhibisyonuna neden olmaktadır. Bununla birlikte, RASSF1A geni üzerinde oluşan mutasyonlar sonucu sentezlenen mutant RASSF1A proteini MOAP-1 ile etkileşim konusunda etkisiz kalmaktadır. Kanserde mutant RASSF1A proteini ile MOAP-1 etkileşiminin gerçekleşmemesi BAX aktivasyonunu engelleyeceği için kanser hücrelerinin apoptozunu engelleyerek kanserin ilerlemesine neden olmaktadır (Vos vd., 2006).

Meme kanserinde de RASSF1A genine ait promotör bölge metilasyonu aracılığıyla genin epigenetik düzenleme aracılığıyla ekspresyonun azaltılması sonucu tümör baskılayıcı özelliklerinin ortadan kaldırılması bu hastalıkta sıklıkla görülen bir durumdur. RASSF1A geninin metilasyona uğramasının hastaların tümör boyutları ile birebir olarak ilişkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca, RASSF1A geninin promotör bölge metilasyonunun meme kanseri hastalarında tümörün histolojik olarak derecesini de doğrudan etkilediği saptanmıştır. Meme kanseri hastalarında RASSF1A geni metilasyonunun belirlenmesinin hastalarının prognozunun önceden tahmin edilmesinde ve tedavi sürecinde hastalığın ilerlemesinin değerlendirilmesinde yarar sağlayabileceği bildirilmiştir (Gupta vd., 2021).

Tez çalışmamızın verilerine göre siRNA aracılığıyla susturulan lncRNA SLC9A3-AS1 'in MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki RASSF1 ekspresyonunun 7,54 kat arttığı görülmüştür. RASSF1 ile ilgili çalışmaların sonuçlarıyla bulduğumuz sonuçları derlediğimizde, lncRNA SLC9A3-AS1 'in ekspresyonunun azalmasının ardından meme kanseri hücrelerindeki apoptoz düzeyindeki artış ve hücre proliferasyonundaki azalmanın RASSF1 geninin artan düzeyiyle ilişkili olabileceğini söyleyebiliriz.

BRCA1 geninin meme kanseri ile yakın bir ilişkisi bulunmaktadır. BRCA1 geninde meydana gelen mutasyonlar meme kanserinin yaklaşık %40-45'inden sorumludur. BRCA1 kalıtsal olarak ortaya çıkan meme kanserinin gelişimiyle ilişkili olan bir tümör baskılayıcı gendir. BRCA1 geninin üzerinde bulunan mutasyonlar meme kanserinin gelişimine ve ilerlemesine neden olmaktadır. BRCA1 hücre döngüsünü ve apoptozu düzenleyerek hücre proliferasyonunu engellemektedir. BRCA1 proteini bu

biyolojik rollerini protein-protein etkileşimi aracılığıyla gerçekleştirmektedir. DNA hasarı oluştuğunda hücre döngüsü spesifik fosforilasyon olayları aracılığıyla durdurulmaktadır (Rosen vd.,2003).

Meme tümörlerinde yapılan BRCA1 ekspresyon düzeylerinin araştırıldığı çalışmada meme kanserli hastaların tümör dokularının %15 'inde genin nükleer ekspresyonunun gerçekleşmediği gösterilmiştir. BRCA1 geninin nükleer ekspresyonunun azalması ya da tamamen durması süreci duktal karsinomda ve medüller karsinomda daha sık olarak saptanmıştır. BRCA1 ekspresyonunun azalması meme kanserinin yüksek derecesi ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte meme tümörlerinde azalan BRCA1 ekspresyonu lenf nodülüne metastaz, meme kanser türünün hormon pozitif olması, uzak doku ya da organlara yayılım ile de ilişkilendirilmiştir. BRCA1 geninin sitoplazmik ekspresyonunun ise meme kanserinin nüks durumunda ortaya çıktığı bildirilmiştir (Rakha vd., 2008).

Çalışmamızın elde edilen sonuçlarına göre lncRNA SLC9A3-AS1 'in ekspresyonunun azaltılmasının MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki BRCA1 'in ekspresyonunu 5,11 kat artırdığını saptadık. BRCA1 geni ile ilgili literatürdeki bilgilere bakıldığında BRCA1 genin de meydana gelen mutasyonlar veya ekspresyondaki değişimlerin meme hücre döngüsünün sürdürülmesinde rol oynayıp kanserinin oluşumuna ve gelişimine katkı sağladığı görülmektedir. LncRNA SLC9A3-AS1 'in susturulması ile birlikte meme kanseri hücrelerindeki proliferasyon düzeylerinde oluşan azalmanın bir nedeni de BRCA1 ekspresyon düzeylerindeki azalmaya bağlanabilir.

HGF tarafından ligandların iletimi, ligand aktivasyonunu yolu ile Met tirozin kinaz aktivasyonu sağlanmaktadır. Kanserlerde, hastalığın oluşum mekanizmasında, kanserli hücrelerin hızlı bir şekilde büyüüp uzak doku ve organlara yayılmasında HGF/Met sinyallemedeki artışın büyük önemi vardır. Özellikle tümör dokularında HGF/Met yolu aktivasyonuna sık olarak rastlanıldığı için kanser tedavisi için yapılan çalışmalar için hedef sinyal yollarından biridir. HGF/Met sinyal yolu inhibitörleri laboratuvarla sentetik olarak üretilmekte ve özellikle tirozin kinaz inhibitörü olarak görev almaktadır (Cecchi vd., 2010).

MET onkogeni, hücre çoğalması ve metastazını indükleyen HGF 'nin ifade edilmesini ve ifade düzeyini düzenlemektedir. Yumurtalık kanserinde MET/HGF

reseptör geninin DNA mutasyonlarının ve ekspresyon düzeylerinin analiz edildiği çalışmada, yumurtalık tümörlerinde Met/HGF reseptörü geninde 50 kat oranına kadar artış meydana geldiği saptanmıştır. Yumurtalık kanserinde MET/HGF reseptörü geninin ekspresyonunda aşırı düzeyde artış meydana gelen hastaların prognozunun diğer hastalarla karşılaştırıldığında daha kötü olduğu gösterilmiştir (Di Renzo vd., 1994).

MET onkogeni ve onun ligandı olan HGF proteini, mitojenle aktive edilen protein kinaz (ERK/MAPK) yolunun sinyallenmesini indükleyerek aktive etmesinin yanında fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K/AKT) sinyallenmesini de indükleyerek aktive etmektedir. ERK/MAPK ve PI3K/AKT yolları kanseri patogenezinde ve ilerlemesinde rol almaktadır. MET/HGF üzerinden ERK/MAPK ve PI3K/AKT yollarının düzenlenmesi MET/HGF 'in karsinogenezdeki rolünün birçok hücre proliferasyonunu indükleyici yol üzerinden gerçekleştirdiği göstermektedir. Kanserde ortaya çıkan anormal MET/HGF sinyalleme, kanserli hücrelerin proliferasyonunu, apoptozun inhibisyonu ile hücre göçünü teşvik etmektedir. Bununla birlikte, MET/HGF aktivasyonunu akciğer kanserlerinde olumsuz prognoz ile de ilişkilendirilmektedir (Raghav vd., 2012).

LncRNA SLC9A3-AS1 'in siRNA aracılığıyla susturulmasının ardından MCF-7 hücrelerinde HGF 'nin ekspresyonunun 4,46 kat azaldığını belirledik. HGF kanserin oluşumu, ilerlemesi ve hücre göçünün aktivasyonu ile kanseri tetikler yönde rol almasından dolayı meme kanserinde lncRNA SLC9A3-AS1 'in bu genin ifadesini azaltması kanserin tedavisine katkı sağlayabilir. LncRNA SLC9A3-AS1 susturulduktan sonra meme kanseri proliferasyonundaki azalmanın bir sebebi de HGF düzeylerinin azalması sonucu ERK/MAPK ve PI3K/AKT gibi yolların inhibe edilmesi olabilir.

PD 'in meme kanseri MCF-7 hücre hücrelerinde lncRNA SLC9A3-AS1 'in ifadesini azaltarak, tümör baskılayıcı genleri (TP73, RASSF1, BRCA1) ve proliferasyon genlerini (JAK2, NRAS ve HGF) düzenlemesi aracılığıyla hücre proliferasyonunun inhibisyonu üzerinde çok önemli rollerinin olduğunu belirledik. Elde edilen verilerin ışığında, meme kanserinde lncRNA SLC9A3-AS1 'in, proliferasyonu indükleyici davranarak kanser gelişiminde ve ilerlemesinde rolünün olabileceği söylenebilir. Meme kanserinde PD uygulaması üzerinden lncRNA SLC9A3-AS1 ekspresyonundaki azalma ile hücre proliferasyonunun inhibisyonu arasındaki ilişkinin tam ve net olarak ortaya konulabilmesi için bu konuda yapılacak daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. PD 'in meme kanserinde proliferasyonu özellikle lncRNA 'lar üzerinden engellemesi sebebiyle, polidatinin meme kanserinin tedavisinde terapötik bir ajan olarak

kullanılabileceği öngürülebilir.

Tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörü ile ilişkili faktör-2 (TRAF2) proteini TNF reseptörü 2 (TNFR2) 'ye bağlanan bir faktör proteindir. TRAF2 bununla birlikte TNF reseptörlerine de bağlanmaktadır. TRAF2, hücre proliferasyonu ile ilişkili MAPK yolunun sinyallenmesinin indüklenmesinde rol oynamaktadır. TRAF2 proliferasyonla ilişkisinin yanında apoptozun inhibisyonunda ve otofaji de önemli görevleri vardır. TRAF2 proteini bir onkogen olarak Wnt/ β -katenin yolunun düzenlenmesinde de görev yapmaktadır. Kanser hücrelerinin oluşumu, proliferasyonu ve göçünde bu sinyal yolu üzerine aktivasyonu TRAF2 'ye onkogen görevi kazandırmaktadır. Kanser hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilen TRAF2 bağışıklık sisteminin baskılanmasında da rol almaktadır (Siegmond vd., 2022).

Mide kanserli hastaların tümör dokularında yapılan ekspresyon analizlerinde TRAF2 ekspresyonunun dramatik düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, bu dokularda TRAF2 'nin protein düzeylerinde de anlamlı bir azalma saptanmıştır. TRAF2 'nin ekspresyon ve protein düzeylerindeki bu azalmanın mide kanserinde apoptozun indüklenmesi sonucu hücre proliferasyonunun durdurulmasına aracılık ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, TRAF2 'nin sentezindeki azalmanın hücre göçü ya da metastazı da inhibe ettiği bulunmuştur. Mide kanserindeki ekspresyon taramalarında TRAF2 geninin ekspresyonu ile CHIP genin ekspresyonlarının ters orantılı olarak değişiklik gösterdiği, düşen CHIP geni ekspresyonu ile artan TRAF2 geni ekspresyonunun mide kanserli hastaların prognozunu olumsuz olarak etkilediği saptanmıştır. Mide kanserinde yüksek TRAF2 ekspresyonu düşük sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Dai vd., 2019).

Karaciğer kanseri hücrelerinde ve karaciğer kanserli hastalardan elde edilen dokularda TRAF2 geninin yüksek düzeyde eksprese edildiği ve yüksek düzeyde eksprese edilen TRAF2 'nin hastaların prognozunu olumsuz olarak etkilediği ve yaşam sürelerini önemli oranda azalttığı saptanmıştır. Ayrıca karaciğer kanseri dokularında yapılan protein düzey taramalarında TRAF2 ile p62 protein tersi düzeylerde sentezlendiği belirlenmiştir. Karaciğer kanserinde p62 ekspresyon ve ardından protein düzeylerindeki artışının TRAF2 düzeylerinde azalmaya aracılık ederek kanserli hücrelerin proliferasyonunu ve çoğalmasını durdurduğu gösterilmiştir (Liang vd., 2023). Meme kanserinin metastazında transkripsiyonel faktör nükleer faktör-kappaB (NF- κ B) 'in önemli görevleri bulunmaktadır. Meme kanseri hücrelerinde artan CHIP ekspresyonunun NF- κ B sentezini

inhibe ettiği saptanmıştır. Bununla birlikte CHIP düzeylerindeki artışın mide kanseri hücrelerinde olduğu gibi meme kanseri hücrelerinde de TRAF2 geninin ekspresyonunu engellediği gösterilmiştir. Meme kanserinde TRAF2 geninin siRNA aracılığıyla susturulmasının bu meme kanser hücrelerinde hücre istilasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte meme kanseri hücrelerinde CHIP ekspresyonu siRNA aracılığıyla engellendiğinde artan TRAF2 ekspresyonu ve artan NF- κ B sinyal aktivasyonu ile birlikte bu hücrelerde hücre göçünün indüklendiği belirlenmiştir (Jang vd., 2011).

MCF-7 hücrelerinde lncRNA SLC9A3-AS1 'in susturulmasının ardından TRAF2 ekspresyonunun 9,22 kat azaldığını saptadık. TRAF2 ile ilgili olarak literatürdeki bilgilere dayanarak kanser hücrelerinde artan apoptoz inhibisyonu aracılığıyla artan hücre proliferasyonundan ve hücre göçünden sorumlu olduğunu söyleyebiliriz. Bizim tez çalışmamızda, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde lncRNA SLC9A3-AS1 'in siRNA aracılığıyla susturulmasının ardından flowsitometri aracılığıyla meme kanseri hücrelerinde erken ve geç apoptoz düzeylerinde dramatik artışlar olduğunu gösterdik. Ayrıca lncRNA SLC9A3-AS1 ekspresyonu azaltılan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde TUNEL yöntemi yardımıyla floresan mikroskopta da apoptotik hücre sayısında artış olduğunu belirledik. LncRNA SLC9A3-AS1 'i susturulan MCF-7 meme kanseri hücrelerinin apoptoza gitmesini moleküler düzeyde incelediğimizde, nedenlerden birinin susturma işlemi sonrasında TRAF2 'nin azalan ekspresyonu ile ilişkili olabileceğini söyleyebiliriz. LncRNA SLC9A3-AS1 aracılığıyla TRAF2 'nin hedef alınması meme kanserinin tedavisine katkı sağlayabilir. Fakat, bu konuda net konuşabilmek adına yapılacak ek çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Apoptoz indükleyici faktör mitokondri ile ilişkili 1 (AIFM1) proteini hücre apoptozunu kaspazların aktive olduğu yoldan farklı şekilde indüklemektedir. Hepatoselüler karsinomda yapılan çalışmalarda AIFM1 'in ekspresyonunun azaltılmasının kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, AIFM1 geninin artan ekspresyonunun hepatoselüler karsinom hücrelerinde kaspaz 3 'ün aktivitesini düzenlediği de bildirilmiştir. AIFM1 'nin kaspaz 3 'ün aktivitesini düzenlemesi, AIFM1 'nin kaspazlardan bağımsız olarak apoptozu düzenlediği gibi kaspazların aktivitesini indükleyerek kaspazlar üzerinden de hücre apoptozunu indüklediğini göstermektedir (Liu vd., 2018). Akciğer kanserinin patogenezinde de AIFM1 ekspresyonunda düzensizliklerin ortaya çıktığı saptanmıştır. Bu nedenle, akciğer kanserinin tedavisinde AIFM1 'in terapötik bir hedef olabileceği

düşünüldüğü için bu gen ile ilişkili deneysel bir model oluşturabilmek adına AIFM1 geni CRISPR/Cas9 vektörü aracılığıyla nakavt edilmiştir (Tang vd., 2023).

Çalışmamızda, PD uygulaması sonucu MCF-7 meme kanseri hücrelerinde en dramatik ekspresyon düşüşü olan uzun kodlamayan RNA SLC9A3-AS1 'in ekspresyonunun azaltılmasından sonra AIFM1 geninin ekspresyonunun 8.61 kat arttığını belirledik. LncRNA SLC9A3-AS1 'in meme kanseri hücrelerinde susturulmasının ardından flowsitometri ve TUNEL yöntemi aracılığıyla da ortaya konulan apoptoz düzeyindeki artışa literatürdeki bilgiler ışığında AIFM1 'in ekspresyon düzeylerindeki artışında pozitif oranda katkı sağladığını söyleyebiliriz.

APAF1 proteini intrinsik yolun üzerinde bulunan bu yolun aktivasyonunda görevli bir proteindir. APAF1 düzeylerindeki düzensizleşmeler en başta kanser olmak üzere birçok hastalığın patogenezinin sorumlu tutulmaktadır. Özellikle, kanserde APAF1 ekspresyonundaki azalış kanserli hücrelerin apoptoz düzeylerinde de azalmaya aracılık ederek kanserin hızlı bir şekilde gelişmesine ve metastaz aracılığıyla yayılmasına neden olmaktadır (Shakeri vd., 2021).

Kolorektal kanserin prognozunun APAF1 ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada, kolorektal tümör dokularından elde edilen örneklerde APAF1 ekspresyon düzeyleri saptanmıştır. APAF1 'in ekspresyon düzeylerinin kolorektal kanserde sıklıkla azaldığı, ekspresyon düzeylerindeki azalmanın tümörün büyümesi ve ilerlemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. APAF1 'in kolorektal kanserde azalan ekspresyon düzeyinin APAF1 geninin promotör bölgesindeki metilasyonlarla ilişkisine de bakılmış, APAF1 geninin promotör bölgesinde herhangi bir anlamlı metilasyon düzeyine rastlanılmamıştır (Zlobec vd., 2007).

Pankreas kanserli hastaların prognozlarına ve yaşam sürelerine ATF6, EMC6, XBP1, CHOP ve APAF1 genlerinin düzeyleri etkisinin araştırıldığı yapılan bir çalışma da ise, APAF1 geninin ekspresyonunun pankreas kanserli hastaların hasta dokularındaki ekspresyonunun dramatik olarak azaldığı saptanmıştır. Pankreas kanserli hastalarda azalan APAF1 ekspresyon düzeylerinin hastaların kötü prognozu ile korelasyon içerisinde olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, pankreas kanseri tedavi çalışmalarının merkezinde terapötik hedef olarak APAF1 'in olması gerektiği bildirilmiştir (Xiao vd., 2022).

Meme kanserinde APAF1 ve miRNA 'lar üzerine yapılan başka bir çalışmada, meme kanseri hücrelerinde miR-937 'in ekspresyonunun arttığı bu artışın hastaların

yaşam sürelerinde kısaltmaya aracılık ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte yüksek miR-937 ekspresyonunun hücre döngüsünü hızlandırarak apoptozun inhibe edilerek kanser hücrelerinin hücre proliferasyonunu arttırdığı saptanmıştır. Meme kanserinde miR-937 'nin hücre proliferasyonunu indükleyici bu etkilerini APAF1 geninin APAF1-3'UTR 'ye bağlanması aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Bu bağlanma sonucu APAF1 ekspresyon düzeylerinde azalma sonucu apoptoz inhibe olmaktadır (Fang vd., 2019).

MCF-7 meme kanseri hücrelerinde lncRNA SLC9A3-AS1 'in susturulması ile birlikte, çalışmamızda APAF1 'in ekspresyonunun 6,44 kat arttığını belirledik. Literatürdeki bilgilere göre APAF1 'in apoptozu indükleyen bir molekül olduğundan yola çıkarak, çalışmamızda MCF-7 meme kanseri hücrelerinde uzun kodlamayan RNA SLC9A3-AS1 'in susturulmasının ardından, APAF1 meme kanseri hücrelerinde meydana gelen apoptoz düzeyindeki artışa diğer ekspresyonları düzensizleşen genlerle birlikte aracılık ediyor olabilir.

TP53 geni hemen hemen tüm kanser türünde mutasyona uğrayabilmektedir. Kanserli hastalarına ait tümör dokularının büyük çoğunluğunda TP53 geni mutasyona uğramış olarak bulunmaktadır. Bu nedenle kanser tedavisinde en sık olarak üzerine ilaç çalışmaları yapılan genlerden biridir. TP53 tümör süpressör gen dediğimiz ailenin bir üyesidir. TP53 'ün artan ekspresyonu hücre büyümesi ve çoğalmasını inhibe edici yönde etki etmektedir. Ayrıca, onkojenik değişikliklere maruz kalan hücrelerin hayatta kalıp kalmayacaklarına karar veren mekanizmaları düzenlerler (Guimaraes ve Hainaut, 2002).

Akciğer kanserli hastaların tümör dokularında yapılan analizlerde TP53 geninde mutasyon ve ekspresyon anormalliklerinin sıklıkla görüldüğü saptanmıştır. TP53 geninde meydana gelen bu anormallikler akciğer epitel hücrelerinde apoptozun engellenerek hücre büyümesi ve çoğalmasındaki artış ile tümör oluşumuna zemin hazırlar. Özellikle küçük hücreli dışı akciğer kanserine sahip ve TP53 geninde mutasyon taşıyan hastaların yaşam sürelerinin kısa ve hastalık prognozlarının kötü olduğu bildirilmiştir (Mogi ve Kuwano, 2011).

Meme kanserinde de TP53 geninde mutasyonların olduğu bildirilmiştir. Meme tümör dokularında meydana gelen TP53 mutasyonlarının tümörün büyüklüğü ve hastalığın evresi ile birebir ilişkili olduğu saptanmıştır. TP53 geni meme kanserli hastaların yaklaşık olarak %20-40 'ında farklılaşmış olarak bulunmaktadır. TP53 geninde olan mutasyon çok çeşitli olmasına rağmen bu mutasyonlar meme dokusunda hücre

büyümesini indükleyici yönde etkilere sahiptir. Ayrıca, TP53 mutasyonlarının meme kanseri tedavisine karar verirken alınacak yanıt için öngörücü olarak görülebileceği bildirilmiştir (Børresen-Dale, 2003).

Tez çalışmamızda, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde PD uygulaması ile en fazla ekspresyonu azalan lncRNA olan SLC9A3-AS1 'in susturulması sonucunda 5,64 kat artan TP53 ekspresyonunun, bu konuda daha önce yapılmış çalışmaların sonuçlarına bakarak, meme kanseri hücrelerinde meydana gelen apoptoza pozitif yönde katkı sağlamış olabilir. Bu yönüyle bakıldığında meme kanserinde PD uygulamasının TP53 geni üzerinden anti proliferasyon ve apoptoz indükleyicisi etkisi nedeniyle, PD'in meme kanserinin tedavisinde ilaç olarak kullanılabileceği öngörülebilir.

HRK geninin ilk olarak hematopoetik hücreler ile nöron hücrelerinde azalan sitokin düzeylerine yanıt olan sentezlendiği ve proapoptotik bir gen olduğu bildirilmiştir. Bu genin ekspresyon düzeylerindeki azalma kanser hücrelerinde apoptozun inhibe olması sonucu hücre proliferasyonunun artmasına neden olmaktadır. HRK geninde meydana gelen ekspresyon düzeylerindeki azalmanın en önemli nedeninin genin promotör bölgesindeki CpG adalarının anormal metilasyonu sonucu gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu genin birçok kanser türünde epigenetik olarak düzenlenmesi kanser gelişimine ve ilerlemesine katkı sağlamaktadır (Nakamura vd., 2008).

Kolorektal tümörü dokularında HRK ekspresyonunun normal kolorektal dokulara göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Kolorektal kanseri konusunda yapılan bu çalışmada, HRK ekspresyonunun artışı ile birlikte apoptozun indüklendiği, hücre çoğalması ve hücre göçünün ise inhibe edildiği gösterilmiştir. HRK ekspresyonunun düşüklüğü kolorektal kanser hücrelerinin apoptoza gitmesini azaltmasının yanında PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunda aktivasyonuna neden olmaktadır. HRK düzeylerindeki azalma sonucu PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunda ortaya çıkan aktivasyon kolorektal kanserli hücrelerin hızlı bir şekilde çoğalmasına aracılık etmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada HRK geninin kolorektal kanser tedavisinde terapötik bir hedef olarak seçilebileceğinden bahsedilmiştir (Wang vd., 2022). Nöroblastoma tümör hücrelerinde ise HRK 'nın Yes ile ilişkili proteinin (YAP) ile baskılanarak bu kanser hücrelerinde apoptozun engellediği, tümör büyümesi ile ilaç direncinin arttığı bildirilmiştir (Shim vd., 2020). HRK konusunda prostat kanserinde yapılan başka bir çalışmada da prostat tümör dokularında HRK 'nın ifadesinin azaldığı saptanmıştır. HRK 'nın tümör dokusundaki ifadesinin azalmasının genin promotör bölgesinde meydana

gelen hipermetilasyon sonucu olduğu ve bu durumun prostat kanserli hücrelerin apoptotik hücre ölümünü negatif yönde düzenleyerek ederek hücre proliferasyonuna ve prostat kanserinin ilerlemesine neden olduğu gösterilmiştir (Higuchi vd., 2008).

Çalışmamızdan elde edilen verilere göre, lncRNA SLC9A3-AS1 geni susturulan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde HRK ekspresyonunun 3,29 kat arttığını saptadık. HRK ile ilgili olarak yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, HRK gen ekspresyonundaki artışın, siRNA-SLC9A3-AS1 aracılığıyla susturma işlemine tabi tutulan meme kanseri hücrelerinde bu işlem sonucu ortaya çıkan apoptoz düzeyindeki artışa katkı sağladığını söyleyebiliriz.

NF-κB sinyal yolu kanser oluşumu ile yakın ilişkilidir. Apoptoz kontrolü NF-κB sinyal yolu aracılığıyla sağlanmaktadır. Bu nedenle NF-κB sinyal yolunda oluşan farklılaşmalar kanserin oluşumuna ve ilerlemesine doğrudan katkı sunmaktadırlar. NF-κB proteininin beş adet alt birimi bulunmaktadır (Concetti ve Wilson, 2018). DNA hasarı olduğunda NF-κB proteinleri hücresel yanıtın oluşturulmasında aktif rol oynamaktadır. NF-κB1 proteini özellikle DNA 'nın alkilasyon hasarında hücresel yanıtı oluşturup tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır (Voce vd., 2015). Mide kanseri üzerine NFKB1 konusunda yapılan çalışmalarda, NFKB1 geni nakavt farelerde TNF ekspresyonunun dramatik düzeyde arttığı ve STAT1 aktivasyonuna neden olarak inflamasyonu destekleyerek mide kanseri gelişimine zemin hazırladığı bildirilmiştir (Low vd., 2020).

Kaspaz2 (CASP2) proteini hücre apoptozu ve inflamasyon ile ilgili hücresel işlevlerde görev alan ve kaspaz ailesine ait olan bir moleküldür. CASP2 hücrelerde apoptozu indüklediği için tümör baskılayıcı gen olarak ifade edilmektedir. Fakat, tümör baskılayıcı özelliklerinin hangi moleküler mekanizmalar ile gerçekleştirildiği hala tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. CASP2 hakkında son yıllara kadar apoptozu indüklediği bilinmesine rağmen bunu tam olarak nasıl yaptığı bilinmediği için bu konuda çelişkili kanıtlar ya da çalışmalar vardı. Son çalışmalar ise CASP2 'nin özellikle hücre döngüsünde rol aldığı ve hücrelerde oluşabilecek genomik düzensizleşmelere karşı hücrede koruma sağladığı belirlenmiştir (Brown-Suedel ve Bouchier-Hayes, 2020).

CASP2 'nin tümör oluşumunu baskıladığına ve bu yönüyle tümör süpressör bir gen olduğuna dair birçok kanser türünde çalışma bulunmaktadır. Lenfoma hücrelerinde CASP2 geninin silinmesinin hücre proliferasyonunu hızlandırdığı saptanmıştır. Bununla birlikte CASP2 geni silinen fare fibroblastlarında hücre farklılaşması düzeylerinde artış

olduğu belirlenmiştir. CASP2 geninin ekprese edilmesi tümör oluşumuna karşı hücrel süreçleri düzenlemesi aracılığıyla önemli bir koruma sağlamaktadır. CASP2 proteinin tümörü iki ana mekanizma ile baskılamaktadır. Bunlardan ilki apoptozu durdurması ile mümkün olmaktadır. İkincisi ise hücre döngüsünün durmasını sağlaması ile gerçekleşmektedir. CASP2 özellikle hücrelerde çevresel faktörler nedeniyle oluşan DNA hasarından sonra hücre döngüsünün durmasını indüklemektedir (Bouchier-Hayes, 2010).

MCF-7 meme kanseri hücrelerinde uzun kodlamayan RNA SLC9A3-AS1 'in susturulmasının ardından NFKB1 3,11 kat ve CASP2 3,04 kat artış göstermiştir. Yukarıdaki çalışmaların sonuçlarına bakıldığında bu iki genin apoptoz indükleyici özelliklerinin olduğu gözükmemektedir. PD aracılığıyla lncRNA SLC9A3-AS1 üzerinden gerçekleşen apoptozun moleküler aşamasında literatür bilgilerine bakarak NFKB1 ve CASP2 'nin rolünün olabileceğini söyleyebiliriz.

MCF-7 meme kanseri hücrelerinde PD uygulaması sonrasında ekspresyonu dramatik düzeyde azalan lncRNA SLC9A3-AS1 'in epigenetik yollar aracılığıyla apoptoz ile ilişkili genleri (AIFM1, APAF1, TP53, HRK, NFKB1 ve CASP2) ve anti-apoptotik genlerini (TRAF2) düzenlemesi yoluyla meme kanser hücrelerindeki apoptozun indüklenmesinde görev aldığını saptadık.

PD uygulanan, lncRNA SLC9A3-AS1 'i susturulan ve PD uygulanıp lncRNA SLC9A3-AS1 'i susturulan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde flow sitometri aracılığıyla erken ve geç apoptotik hücre oranının anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir ($p<0,005$). Çalışmamızda lncRNA SLC9A3-AS1'in susturulması sonrasında elde ettiğimiz flow sitometri sonucunda hücre canlılığı 66.45% bulunmuştur. Daha önce de belirttiğimiz gibi nazofarenks kanseri ile yapılan çalışmada ise lncRNA SLC9A3-AS1'in susturulması sonucu hücre canlılığı bizim verilerimize yaklaşık bir değer olarak 70.15% bulunmuştur (Li vd., 2021) Ayrıca, lncRNA SLC9A3-AS1 'i susturulan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde TUNEL kit aracılığıyla apoptotik hücre sayısında artış olduğu saptanmıştır. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ile yapılan bir çalışmada TUNEL yöntemi uygulanmış ve bizim çalışmamıza örnek olmuştur (Sozmen vd., 2021) Böylece flowsitometri ve TUNEL yöntemi ile PD uygulamasından sonra apoptozun arttığı gösterilmiştir.

Bu çalışma ile PD ve SLC9A3-AS1'in beraber ya da ayrı ayrı uygulanması sonucunda MCF-7 meme kanseri hücrelerinin apoptozu üzerine etkilerinin belirlenmesi

amaçlanmıştır. Meme kanserinde bitkisel kaynaklı bir bileşik olan PD uygulamasının anti proliferatif ve apoptozu indükleyici özellikleri nedeniyle meme kanserinin tedavisinde ilaç olarak kullanılabılme potansiyelinin olduğu düşünülmektedir. Ancak, her ne kadar PD ve kanser üzerine yapılan çalışmalar olsa da, doğal bir bileşik olan PD'e kanser etken madde diyebilmek için bu konuda yapılacak ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte meme kanseri çalışmaları için lncRNA SLC9A3-AS1 'de terapötik bir hedef olarak seçilmesi uygun olabilir.



KAYNAKÇA

- Adishesh, M. A., Baird, D. M., R. E., S., S., B. L., Hapangama, .. &, & K., D. (2020). Human endometrial carcinogenesis is associated with significant reduction in long non-coding RNA, TERRA. . *International journal of molecular sciences*, , 8686.
- Amati, B. A. (1998). Myc and the cell cycle. *Front Biosci*, 3(3),. d250-68.
- Bahar, M. E. (2023). Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: from mechanism to clinical studies. *Signal transduction and targeted therapy*,, 8(1), 455.
- Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., & Moradi-Kalbolandi, S. .. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. 84,. *International immunopharmacology*,, 106535.
- Bhan, A. S. (2017). Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm. *Cancer research*, , 77(15), 3965-3981.
- Bhan, A., Soleimani, M., & M., & S., S. (2017). Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm. *Cancer research*,, 3965-3981.
- Bite, S. (2004). Lifetime Probability among Females of Dying of Cancer. . *JNCI J. Natl. Cancer Inst*, 96, 1311-1321.
- Blume-Jensen, P., & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411(6835),, 355-365.
- Børresen-Dale, A. L. (2003). TP53 and breast cancer. *Human mutation*, 21(3), 292-300.
- Bouchier-Hayes, L. (2010). The role of caspase-2 in stress-induced apoptosis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(6a), 1212-1224.
- Brinton, L. A., Schairer, C., Hoover, R. N., & & F. (1988). Menstrual factors and risk of breast cancer. *Cancer investigation*, 6(3),. 245-254.
- Britt, K. (2012). Menarche, menopause, and breast cancer risk. *The lancet oncology* , 13(11), 1071-1072.
- Brown-Suedel, A. N.-H. (2020). Caspase-2 substrates: to apoptosis, cell cycle control, and beyond. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, , 8, 610022.
- Castellino, R. C. (2007). Overexpressed TP73 induces apoptosis in medulloblastoma. *BMC cancer*, 7,, 1-16.
- Cecchi, F., Rabe, D. C., & Bottaro, D. P. (2010). Targeting the HGF/Met signalling

- pathway in cancer. *European journal of cancer*, 46(7), 1260-1270.
- Chen, H. Z., Tsai, S. Y., & Leone, G. (2009). Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nature reviews cancer*, 9(11), 785-797.
- Chen, Q., Z. X., Y., L., Y, Y., & Meng, Z. Q. (2014). Epigenetic regulation and cancer. *Oncology reports*, 31(2), 523-532.
- Chen, S., Tao, J., Zhong, F., Jiao, Y. X., J., S. Q., & Y. (2017). Polydatin down-regulates the phosphorylation level of Creb and induces apoptosis in human breast cancer cell. *PLoS One*, 12(5), e0176501.
- Cohen, Y. S. (2003). The RASSF1A tumor suppressor gene is commonly inactivated in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Clinical cancer research*, 9(8), 2981-2984.
- Concetti, J. &. (2018). NFKB1 and cancer: friend or foe?. *Cells*, 7(9), 133.
- Costanzo, A. P. (2014). TP63 and TP73 in cancer, an unresolved “family” puzzle of complexity, redundancy and hierarchy. *FEBS letters*, 588(16), 2590-2599.
- Cui, Y. L. (2023). Fructose promotes angiogenesis by improving vascular endothelial cell function and upregulating VEGF expression in cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 42(1), 184.
- Cusanelli, E. &. (2015). elomeric repeat-containing RNA TERRA: a noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity. *Frontiers in genetics*, 6, 137906.
- Dai, H., Chen, H., Xu, J. Z., J., S. Z., Yang, H., & Guo, F. (2019). he ubiquitin ligase CHIP modulates cellular behaviors of gastric cancer cells by regulating TRAF2. *Cancer Cell International*, 19, 1-19.
- Dai, J. M. (2019). Polydatin protects H9c2 cells from hypoxia-induced injury via up-regulating long non-coding RNA DGCR5. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 52, e8834.
- Dang, C. V. (2012). MYC on the path to cancer. *Cell*, 149(1), 22-35.
- Das, S., Shukla, N., Singh, S. S., Kushwaha, S., & Shrivastava, R. (2021). Mechanism of interaction between autophagy and apoptosis in cancer. *Apoptosis*, 1-22.
- De Maria, S., Scognamiglio, I., Lombardi, A., Amodio, N. C., Carteni, & M., .. &. (2013). Polydatin, a natural precursor of resveratrol, induces cell cycle arrest and

- differentiation of human colorectal Caco-2 cell. *Journal of translational medicine*, 11, 1-11.
- Di Fiore, R., D'Anneo, A., T., & V. (2013). RB1 in cancer: different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *Journal of cellular physiology*, 228(8), 1676-1687.
- Di Renzo, M. F., Katsaros, D., & Crepaldi, T. G. (1994). Overexpression of the Met/HGF receptor in ovarian cancer. *International journal of cancer*, 58(5), 658-662.
- Donninger, H., & Vos, M. D. (2007). The RASSF1A tumor suppressor. *Journal of cell science*, 120(18), 3163-3172.
- DP, G. (2002). TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie*, 84, 83-93.
- Du, H, Q., P. C., & Zhang, H. (2013). Polydatin: a review of pharmacology and pharmacokinetics. *Pharmaceutical biology*, 51(11), 1347-1354.
- Du, Q. H. (2013). Polydatin: a review of pharmacology and pharmacokinetics. *Pharmaceutical biology*, 51(11), 1347-1354.
- Duffy, M. J., O'Grady, S., Tang, M., & Crown, J. (2021). MYC as a target for cancer treatment. *Cancer treatment reviews*, 94, 102154.
- Fabris, S., Momo, F., Ravagnan, G., & Stevanato, R. (2008). Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. *Biophysical chemistry*, 135(1-3), 76-83.
- Fang, H., Jiang, W., Jing, Z., Mu, X., & Xiong, Z. (2019). miR-937 regulates the proliferation and apoptosis via targeting APAF1 in breast cancer. *OncoTargets and therapy*, 5687-5699.
- Ghafouri-Fard, S., Shoorei, H., Anamag, F. T., & Taheri, M. (2020). The role of non-coding RNAs in controlling cell cycle related proteins in cancer cells. *Frontiers in oncology*, 10, 608975.
- Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S. R., Yeganeh, B., Xiao, W., & Eshraghi, M. .. (2009). Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *ournal of medical genetics*, 46(8), 497-510.
- Greenwald, P., Sherwood, K., & McDonald, S. S. (1997). Fat, caloric intake, and obesity: lifestyle risk factors for breast cancer. *Journal of the American Dietetic Association*, 97(7), S24-S30.

- Gupta, V., Agarwal, P., & Deshpande, P. (2021). Impact of RASSF1A gene methylation on clinico-pathological features of tumor and non-tumor tissue of breast cancer. *Annals of diagnostic pathology*, 52, 151722.
- Gültekin, M., & Boztaş, G. (2014). Türkiye kanser istatistikleri. Sağlık Bakanlığı, *Türkiye Halk Sağlığı Kurumu*, 43, , Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 43, .
- Han, P., & Chang, C. P. (2015). Long non-coding RNA and chromatin remodeling. *RNA biology*, 12(10), 1094-1098.
- Hauptman, N., & Glavač, D. (2013). Long non-coding RNA in cancer. *International journal of molecular sciences*, 4655-4669.
- Higuchi, T., Nakamura, M., Shimada, K., Ishida, E., Hirao, K., & Konishi, N. (2008). HRK inactivation associated with promoter methylation and LOH in prostate cancer. *The Prostate*, 68(1), 105-113.
- Hu, T. F., Su, H., & Xie, R. (2019). Polydatin inhibits proliferation and promotes apoptosis of doxorubicin-resistant osteosarcoma through LncRNA TUG1 mediated suppression of Akt signaling. *Toxicology and applied pharmacology*, 371, 55-62.
- Hu, Y., Tao, S. Y., Deng, J. M., Hou, Z. K., Liang, J. Q., Huang, Q. G., & ... & Liu, H. (2018). Prognostic value of NRAS gene for survival of colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 19(11) 3001.
- Huang, B., Lang, X., & Li, X. (2022). The role of IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway in cancers. *Frontiers in oncology*, 12, 1023177.
- Huang, L. J. (2001-2020). Tyrosine kinase inhibitors for solid tumors in the past 20 years. *Journal of hematology & oncology*, 13, 1-23.
- Huang, L., Guo, Z., Wang, F., & Fu, L. (2021). KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 386.
- Huang, N. S., Chi, Y. Y., Xue, J. Y., Liu, M. Y., Huang, S., Mo, M., & ... & Wu, J. (2016). Long non-coding RNA metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) interacts with estrogen receptor and predicted poor survival in breast cancer. *Oncotarget*, 7(25), 37957.
- Huang, X. H. (2022). Lncrna Slc9a3-As1 promotes oncogenesis of nslc Via sponging

- microrna-760 and may serve as a prognosis predictor of nsclc patients. *Cancer Management and Research*, 1087-1098.
- Huang, X. L., Khan, M. I., Wang, J. A., Ali, S. W., & Kazmi, A. .. (2021). Role of receptor tyrosine kinases mediated signal transduction pathways in tumor growth and angiogenesis—New insight and futuristic vision. *International Journal of Biological Macromolecules*, 180,, 739-752.
- Incio, J. L., McManus, D. T., Suboj, P., Jung, K., Kawaguchi, K., & ... & Jain, R. K. (2018). Obesity promotes resistance to anti-VEGF therapy in breast cancer by up-regulating IL-6 and potentially FGF-2. . *Science translational medicine*, 10(432), eaag0945.
- Irahara, N., Baba, Y., Noshio, K., Shima, K., Yan, L. D.-S., & ... & Ogino, S. (2010). NRAS mutations are rare in colorectal cancer. *Diagnostic molecular pathology*, 19(3), 157-163.
- Jang, K. W., Lee, K. H., Kim, S. H., Jin, T., Choi, E. Y., Jeon, H. J., & ... & Chung, J. H. (2011). Ubiquitin ligase CHIP induces TRAF2 proteasomal degradation and NF- κ B inactivation to regulate breast cancer cell invasion. *Journal of cellular biochemistry*, 112(12), 3612-3620.
- Jiang, C. Q., Ma, L. L., Lv, Z. D., Feng, F., Chen, Z., & & Liu, Z. D. (2020). Polydatin induces apoptosis and autophagy via STAT3 signaling in human osteosarcoma MG-63 cells. *Journal of natural medicines*, 74,, 533-544.
- Jin, Y. L., Xin, L. M., Zhou, C. C., & & Ren, Y. (2019). Polydatin exerts anti-tumor effects against renal cell carcinoma cells via induction of caspase-dependent apoptosis and inhibition of the PI3K/Akt pathway [Retraction]. *ncoTargets and Therapy*, 12,, 4321-4322.
- Jin, Y., Zhan, X., Zhang, B., Chen, Y., Liu, C., & & Yu, L. (2020). Polydatin exerts an antitumor effect through regulating the miR-382/PD-L1 axis in colorectal cancer. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 35(2), 83-91.
- Jiralerspong, S., & & Goodwin, P. J. (2016). Obesity and breast cancer prognosis: evidence, challenges, and opportunities. *Journal of Clinical Oncology*, 34(35), 4203-4216.
- Katti, A., Diaz, B. J., Caragine, C. M., Sanjana, N. E., Dow, & E., L. (2022). CRISPR in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 22(5), 259-279.

- Kazimierczyk, M., & Wrzesinski, J. (2021). Long non-coding RNA epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 6166.
- Kim, M. S., Lee, W. S., Jeong, J., Kim, S. J., & Jin, W. (2015). Induction of metastatic potential by TrkB via activation of IL6/JAK2/STAT3 and PI3K/AKT signaling in breast cancer. *Oncotarget*, 6(37), 40158.
- Kimura, Y., & Okuda, H. (2000). Effects of naturally occurring stilbene glucosides from medicinal plants and wine, on tumour growth and lung metastasis in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52(10), 1287-1295.
- Kitagawa, M., Kitagawa, K., Kotake, Y., Niida, H., & Ohhata, T. (2013). Cell cycle regulation by long non-coding RNAs. *Cellular and molecular life sciences*, 70,, 4785-4794.
- Kopnin, B. P. (2000). Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *BIOCHEMISTRY C/C OF BIOKHIMIJA*, 65(1), 2-27.
- Kops, G. J., Foltz, D. R., & Cleveland, D. W. (2004). Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(23), 8699-8704.
- Lanzilli, G. C. (2012). Anti-inflammatory effect of resveratrol and polydatin by in vitro IL-17 modulation. *Inflammation*, 35, 240-248.
- Li, J. L., Zhang, X., Li, C., & Zhu, F. (2021). Long noncoding RNA SLC9A3-AS1 increases E2F6 expression by sponging microRNA-486-5p and thus facilitates the oncogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Oncology Reports*, 46(2), 1-13.
- Li, R. P., Wang, Z. Z., Sun, M. X., Hou, X. L., Sun, Y., Deng, Z. F., & Xiao, K. (2012). Polydatin protects learning and memory impairments in a rat model of vascular dementia. *Phytomedicine*, 19(8-9), 677-681.
- Li, W., Zhang, Q., Chen, K., Sima, Z., Liu, J., Yu, Q., & Liu, J. (2019). 2-Ethoxystypanthrone, a novel small-molecule STAT3 signaling inhibitor from *Polygonum cuspidatum*, inhibits cell growth and induces apoptosis of HCC cells and HCC Cancer stem cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 19, 1-13.
- Li, X., Song, Y., Liu, F., Liu, D., Miao, H., Ren, J., & ... & Zhao, G. (2017). Long non-

- coding RNA MALAT1 promotes proliferation, angiogenesis, and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by inducing VEGF and IDO. *Journal of cellular biochemistry*, 118(9), 2780-2791.
- Liang, X., Yao, J., Cui, D., Zheng, W., Liu, Y., Lou, G., & ... & Zheng, M. (2023). The TRAF2-p62 axis promotes proliferation and survival of liver cancer by activating mTORC1 pathway. *Cell Death & Differentiation*, 30(6), 1550-1562.
- Liu, D., Liu, M., Wang, W., Pang, L., Wang, Z., Yuan, C., & & Liu, K. (2018). Overexpression of apoptosis-inducing factor mitochondrion-associated 1 (AIFM1) induces apoptosis by promoting the transcription of caspase3 and DRAM in hepatoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 498(3), 453-457.
- Liu, H., Zhao, S., Zhang, Y., Wu, J., Peng, H., Fan, J., & & Liao, J. (2011). Reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction contribute to polydatin-induced apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma CNE cells. *Journal of cellular biochemistry*, 112(12), 3695-3703.
- Lossi, L. (2022). The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. *Biochemical Journal*, 479(3), 357-384.
- Low, J. T., Christie, M., Ernst, M., Dumoutier, L., Preaudet, A., N. Y., & ... & O'Reilly, L. A. (2020). Loss of NFKB1 results in expression of tumor necrosis factor and activation of signal transducer and activator of transcription 1 to promote gastric tumorigenesis in mice. *Gastroenterology*, 159(4), 1444-1458.
- Łukasiewicz, Czeczelewski, M., Forma, A., B. J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—an updated review. *Cancers*, 13(17). 4287.
- Luo, J., Solimini, N. L., & & Elledge, S. J. (2009). Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, 136(5), 823-837.
- Luo, S. F., Yu, C. L., & & Zhang, P. W. (1990). Influences of 3, 4, 5-trihydroxystibene-3-beta-mono-D-glucoside on beat rate and injury of cultured newborn rat myocardial cells. *Zhongguo yao li xue bao = Acta Pharmacologica Sinica*, 11(2), 147-150.
- Ma, M. Z., Chu, B. F., Zhang, Y., Weng, M. Z., Qin, Y. Y., Gong, W., & & Quan, Z. W. (2015). Long non-coding RNA CCAT1 promotes gallbladder cancer development

- via negative modulation of miRNA-218-5p. *Cell death & disease*, 6(1), , e1583-e1583.
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. . *Nature reviews cancer*, 9(3), 153-166.
- Marandel, L., Labbe, C., Bobe, J., & Le Bail, P. Y. (2012). Evolutionary history of c-myc in teleosts and characterization of the duplicated c-myca genes in goldfish embryos. *Molecular reproduction and development*, 79(2), 85-96.
- McCabe, E. M., & Rasmussen, T. P. ((2021, October)). lncRNA involvement in cancer stem cell function and epithelial-mesenchymal transitions. *In Seminars in cancer biology (Vol. 75, pp. 38-48)*. Academic Press.
- ME, J. F., S., L., R., Soerjomataram, I., D., M., Jemal, A., & M., D. V. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.
- Merry, C. R., F. M., Sabers, J. N., B. L., Gao, X. H., Hatzoglou, M., & .. &. (2015). DNMT1-associated long non-coding RNAs regulate global gene expression and DNA methylation in colon cancer. *Human molecular genetics*, 24(21), 6240-6253.
- Miao, Q., Wang, S. M., Wang, J., Xie, Y., & Yang, Q. (2011). Cardioprotective effect of polydatin against ischemia/reperfusion injury: roles of protein kinase C and mito KATP activation. *Phytomedicine*, 19(1), 8-12.
- Mirzaei, H., & Hamblin, M. R. (2020). Regulation of glycolysis by non-coding RNAs in cancer: switching on the Warburg effect. *Molecular Therapy-Oncolytics*, 19,, 218-239.
- Mogi, A., & Kuwano, H. (2011). TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *BioMed Research International*, 2011.
- Muller, P. A., & Vousden, K. H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nature cell biology*, 15(1), 2-8.
- Nakamura, M., Shimada, K., & Konishi, N. (2008). he role of HRK gene in human cancer. *Oncogene*, 27(1), , S105-S113.
- Narod, S. A. (2011). Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. . *Nature reviews Clinical oncology*, 8(11), 669-676.

- Neto, C. C., Amoroso, J. W., & Liberty, A. M. (2008). Anticancer activities of cranberry phytochemicals: an update. *Molecular nutrition & food research*, 52(S1), S18-S27.
- Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A., & Kitano, H. (2005). A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular systems biology*, 1(1), 2005-0010.
- Ohashi, K., Sequist, L. V., Arcila, M. E., Lovly, C. M., Chen, X., Rudin, C. M., & ... & Pao, W. (2013). Characteristics of lung cancers harboring NRAS mutations. *Clinical Cancer Research*, 19(9), 2584-2591.
- Peng, Y., Wang, Y., Zhou, C., Mei, W., & Zeng, C. (2022). PI3K/Akt/mTOR pathway and its role in cancer therapeutics: are we making headway?. *Frontiers in oncology*, 12, 819128.
- Prior, I. A., Hood, F. E., & Hartley, J. L. (2020). The frequency of Ras mutations in cancer. *Cancer research*, 80(14), 2969-2974.
- Qian, S., Wei, Z., Yang, W., Huang, J., Yang, Y., & Wang, J. (2022). The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Frontiers in oncology*, 12, 985363.
- Raghav, K. P., Gonzalez-Angulo, A. M., & Blumenschein Jr, G. R. (2012). P. S., Gonzalez-Angulo, A. M., & Blumenschein Jr, G. R. (2012). Role of HGF/MET axis in resistance of lung cancer to contemporary management. *Translational lung cancer research*, 1(3), 179.
- Rakha, E. A., El-Sheikh, S. E., Kandil, M. A., El-Sayed, M. E., Green, A. R., & Ellis, I. O. (2008). Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. *Human pathology*, 39(6), 857-865.
- Religioni, U. (2020). Cancer incidence and mortality in Poland. *Clinical Epidemiology and Global Health*, 8(2), 329-334.
- Rikhtegar, S. (2018). Investigation of KRAS and NRAS expression levels in lung cancer patients compared to normal patients. *Yafte*, 20(3).
- Rivière, C. P., Delchier, N., Andriamanarivo, S., Waffo-Teguo, P., & ... & Monti, J. P. (2010). New stilbene dimers against amyloid fibril formation. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(11), 3441-3443.

- Rosen, E. M., Fan, S. P., & & Goldberg, I. D. (2003). BRCA1 gene in breast cancer. *Journal of cellular physiology*, 196(1), 19-41.
- San Tang, K., & & Tan, J. S. (2019). The protective mechanisms of polydatin in cerebral ischemia. *European journal of pharmacology*, 842,, 133-138.
- Seiler, A., Chen, M. A., Brown, R. L., & & Fagundes, C. P. (2018). Obesity, dietary factors, nutrition, and breast cancer risk. *Current breast cancer reports*, 10,, 14-27.
- Shakeri, R. K., & & Davoodi, J. (2021). Contribution of Apaf-1 to the pathogenesis of cancer and neurodegenerative diseases. *Biochimie*, 190, 91-110.
- Shi, Y. W., Wang, C. P., Liu, L., Liu, Y. L., Wang, X., Hong, Y., & ... & Kong, L. D. (2012). Antihyperuricemic and nephroprotective effects of resveratrol and its analogues in hyperuricemic mice. *Molecular nutrition & food research*, 56(9), 1433-1444.
- Shim, J. L., Arnold, A., Schnepf, R. W., Janssen, K. M., & ... & Goldsmith, K. C. (2020). YAP-mediated repression of HRK regulates tumor growth, therapy response, and survival under tumor environmental stress in neuroblastoma. *Cancer Research*, 80(21), 4741-4753.
- Shiovitz, S., & & Korde, L. A. (2015). Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Annals of Oncology*, 26(7), 1291-1299.
- Shivakumar, L., Minna, J., Sakamaki, T., Pestell, R., & & White, M. A. (2002). The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Molecular and cellular biology*, 22(12), 4309-4318.
- Siegmund, D., Wagner, J., & & Wajant, H. (2022). TNF receptor associated factor 2 (TRAF2) signaling in cancer. *Cancers*, 14(16), 4055.
- Sozmen, F., Kucukoflaz, M., Ergul, M., & & Inan, Z. D. (2021). Nanoparticles with PDT and PTT synergistic properties working with dual NIR-light source simultaneously. *RSC Advances*, 11(4), 2383-2389.
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., & ... & Zhu, H. P. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *International journal of biological sciences*, 13(11), 1387.
- Suzuki, R., Orsini, N., Saji, S., Key, T. J., & & Wolk, A. (2009). Body weight and

- incidence of breast cancer defined by estrogen and progesterone receptor status—a meta-analysis. . *International journal of cancer*, 124(3), 698-712.
- Şöhretoğlu, D., Baran, M. Y., Arroo, R., & Kuruüzüm-Uz, A. (2018). Recent advances in chemistry, therapeutic properties and sources of polydatin. . *Phytochemistry Reviews*, 17, 973-1005.
- Takayama, K. I., Horie-Inoue, K., Katayama, S., Suzuki, T., Tsutsumi, S., Ikeda, K., & ... & Inoue, S. (2013). Androgen-responsive long noncoding RNA CTBP1-AS promotes prostate cancer. *The EMBO journal*, 32(12), 1665-1680.
- Tang, X., Li, N., Yu, H. J., Chen, X. Y., Huang, X. Q., Jia, Y. F., & ... & Zhang, H. T. (2023). Application of CRISPR/Cas9 technology to establish a stable lung cancer cell line with knockdown of AIFM1 gene.
- Tripathi, V., Shen, Z., Chakraborty, A., Giri, S., Freier, S. M., Wu, X., & ... & Prasanth, K. V. (2013). Long noncoding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB. *PLoS genetics*, 9(3), e1003368.
- Turati, F. C., Bravi, F., Ferraroni, M., Serraino, D., Montella, M., & ... & La Vecchia, C. (2018). Mediterranean diet and breast cancer risk. *Nutrients*, 10(3), 326.
- Vendrell, J., Broch, M., Vilarrasa, N., Molina, A., Gómez, J. M., Gutiérrez, C., & ... & Richart, C. (2004). Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obesity research*, 12(6), 962-971.
- Voce, D. J., Schmitt, A. M., Uppal, A., McNerney, M. E., Bernal, G. M., Cahill, K. E., & ... & Yamini, B. (2015). Nfkb1 is a haploinsufficient DNA damage-specific tumor suppressor. *Oncogene*, 34(21), 2807-2813.
- Vos, M. D., Eckfeld, K., Allen, N. P., Donniger, H., Hesson, L. B., & ... & Clark, G. J. (2006). The RASSF1A tumor suppressor activates Bax via MOAP-1. . *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 4557-4563.
- Wagner, K. U., & Rui, H. (2008). Jak2/Stat5 signaling in mammary gland biology and neoplasia, 13, 93-103.
- Wang, D. G., L. W., & Chen, G. T. (2013). A simple method for the isolation and purification of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *Journal of pharmaceutical analysis*, 241-247.

- Wang, H., Chen, Y., Yuan, Q., Chen, L., Dai, P., & Li, X. (2022). HRK inhibits colorectal cancer cells proliferation by suppressing the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Frontiers in Oncology*, 12, 1053510.
- Wang, J., Liu, X., Wu, H., Ni, P. G., Qiao, Y., & ... & Fan, Q. (2010). CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. . *Nucleic acids research*, 38(16), 5366-5383.
- Wang, W., Min, L., Qiu, X., Wu, X., Liu, C., Ma, J., & ... & Zhu, L. (2021). Biological function of long non-coding RNA (LncRNA) Xist. . *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 645647.
- Xiao, W., Cao, R. C., Y. W., Tan, J. H., R. Q., K., H. P., .. &, & P. (2022). Roles and clinical significances of atf6, emc6, and apaf1 in prognosis of pancreatic cancer. *Frontiers in genetics*, 730874.
- Xie, X., Peng, J., Huang, K., Huang, J., Shen, X., Liu, P., & Huang, H. (2012). Polydatin ameliorates experimental diabetes-induced fibronectin through inhibiting the activation of NF- κ B signaling pathway in rat glomerular mesangial cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 362(1-2), 183-193.
- Xing, Z., Lin, A., Li, C., Liang, K., Wang, S., Liu, Y., & ... & Yang, L. (2014). lncRNA directs cooperative epigenetic regulation downstream of chemokine signals. *Cell*, 159(5), 1110-1125.
- Xu, G., Kuang, G., Jiang, W., Jiang, R., & Jiang, D. (2016). Polydatin promotes apoptosis through upregulation the ratio of Bax/Bcl-2 and inhibits proliferation by attenuating the β -catenin signaling in human osteosarcoma cells. *American journal of translational research*, 8(2), 922.
- Xu, J. B. (2017). A comprehensive overview of lncRNA annotation resources. *Briefings in bioinformatics*, 18(2), 236-249.
- Yang, B., & Zhao, S. (2017). Polydatin regulates proliferation, apoptosis and autophagy in multiple myeloma cells through mTOR/p70s6k pathway. *OncoTargets and therapy*, 935-944.
- Yang, L., Han, Y., Saurez Saiz, F., & Minden, M. D. (2007). A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*, 21(5), 868-876.
- Yao, Z. Z. (2020). Long noncoding RNA PCED1B-AS1 promotes the Warburg effect and tumorigenesis by upregulating HIF-1 α in glioblastoma. *Cell Transplantation*,

29, 0963689720906777.

- Yao, Z., Di Poto, C., Mavodza, G., Oliver, E., Ransom, H. W., & Sherif, Z. A. (2019). DNA methylation activates TP73 expression in hepatocellular carcinoma and gastrointestinal cancer. *Scientific reports*, 9(1), 19367.
- Ye, H., & Guo, X. (2019). TP73 is a credible biomarker for predicting clinical progression and prognosis in cervical cancer patients. *Bioscience reports*, 39(8), BSR20190095.
- Yoon, J. H., You, B. H., Park, C. H., Kim, Y. J., Nam, J. W., & Lee, S. K. (2018). The long noncoding RNA LUCAT1 promotes tumorigenesis by controlling ubiquitination and stability of DNA methyltransferase 1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer letters*, 417, 47-57.
- Zhang, L. P., Ma, H. J., Bu, H. M., Wang, M. L., Li, Q., Qi, Z., & Zhang, Y. (2009). Polydatin attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis in myocardium of the rat. *Sheng Li Xue Bao*, 61(4), 367-372.
- Zhang, T., Zhu, X., Wu, H., Jiang, K., Zhao, G., Shaukat, A., & ... & Qiu, C. (2019). Targeting the ROS/PI3K/AKT/HIF-1 α /HK2 axis of breast cancer cells: Combined administration of Polydatin and 2-Deoxy-d-glucose. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(5), 3711-3723.
- Zhang, X., Hu, F., Li, G., Li, G., Yang, X., Liu, L., & ... & Feng, Y. (2018). Human colorectal cancer-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through IL-6/JAK2/STAT3 signaling. *Cell death & disease*, 9(2), 25.
- Zhang, Y., Zhuang, Z., Meng, Q., Jiao, Y., Xu, J., & Fan, S. (2014). Polydatin inhibits growth of lung cancer cells by inducing apoptosis and causing cell cycle arrest. *Oncology letters*, 7(1), 295-301.
- Zhao, K. S., Jin, C., Huang, X., Liu, J., Yan, W. S., Huang, Q., & Kan, W. (2003). The mechanism of Polydatin in shock treatment. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 29(3-4), 211-217.
- Zhou, C. C. (2016). Systemic genome screening identifies the outcome associated focal loss of long noncoding RNA PRAL in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 63(3), 850-863.
- Zhou, C. C., Yang, F., Yuan, S. X., Ma, J. Z., Liu, F., Yuan, J. H., & ... & Sun, S. H. (2016). Systemic genome screening identifies the outcome associated focal loss

of long noncoding RNA PRAL in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 63(3), 850-863.

Zhu, L. X., & Jin, Z. Y. (2006). Effect of polydatin on metabolism of blood lipid of hyperlipidemia rats and its antioxidation. *Chin Trad Patent Med*, 28 260-1.

Zilfou, J. T., & Lowe, S. W. (2009). Tumor suppressive functions of p53. . *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(5), a001883.

Zlobec, I., Minoo, P., Baker, K., Haegert, D., Khetani, K., Tornillo, L., & ... & Lugli, A. (2007). Loss of APAF-1 expression is associated with tumour progression and adverse prognosis in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 43(6), 1101-1107.

Zou, J., Yang, Y., Yang, Y., & Liu, X. (2018). Polydatin suppresses proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer cells by inhibiting NLRP3 inflammasome activation via NF- κ B pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 130-136.

http-1: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176501.g001> Erişim tarihi (21.04.2024)

http-2: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC9A3-AS1> Erişim tarihi (17.05.2024)

EKLER

EK-1. IC₅₀ Polidatin içeren ilaç grubu ve kontrol grubu microarray gen listesi

ilac1 Avg (log2)	kontrol Avg (log2)	Fold Change	Gene Symbol	Chrom osome
7.74	6.33	2.66	FOS	chr14
8.1	6.76	2.53	FOS	chr14
10.82	9.75	2.1	CGB; CGB1; CGB2; CGB5; CGB7; CGB8	chr19
9.25	8.2	2.07	AMY1A; AMY1B; AMY1C; AMY2A; AMY2B; AMYP1	chr1
7.73	8.98	-2.38	IFITM1	chr11
7.53	8.66	-2.19	IFITM1	chr11
8.43	7.37	2.08	RGS2	chr1
9.91	11.95	-4.12	SGK1	chr6
7.99	6.92	2.1	CYTH2	chr19
9.92	8.75	2.25	GDF15	chr19
9	7.46	2.89	GDF15	chr19
12.01	10.87	2.21	HMOX1	chr22
6.54	7.92	-2.6	DNER	chr2
7.55	8.84	-2.45	GBP2	chr1
10.33	11.42	-2.13	VGF	chr7
10.33	11.47	-2.2	VGF	chr7
7.57	8.79	-2.32	CYP1B1	chr2
7.42	8.63	-2.31	CYP1B1	chr2
7.13	8.51	-2.59	CYP1B1	chr2
10.01	7.94	4.19	PABPC1L	chr20
9.26	8.03	2.35	COL7A1	chr3
6.2	5.16	2.07	BDP1	chr5
6.18	7.23	-2.08	TRIM2	chr4
9.67	10.7	-2.03	KIF20A	chr5
6.8	5.76	2.07	HSPA6	chr1
6.53	7.62	-2.13	SEMA3C	chr7
8.99	10.24	-2.39	SEMA3C	chr7
7.54	6.48	2.09	TEP1	chr14
8.79	7.75	2.06	BTNL9	chr5
8.18	6.92	2.41	EPM2AIP1	chr3
8.92	7.83	2.13	GAD1	chr2
5.98	7.66	-3.2	PRDM1	chr6
6.83	8.45	-3.08	CYP1A1	chr15
7.82	6.8	2.04	ITGA10	chr1
6.3	5.16	2.22	SLC25A27	chr6
6	4.99	2.01	SLC25A27	chr6
8.07	6.79	2.43	CFAP70	chr10
7.77	6.73	2.05	WDR33	chr2
10.71	9.51	2.3	PILRB; STAG3L5P-PVRIG2P-PILRB	chr7

5.51	6.95	-2.72	FAM13C	chr10
7.25	5.87	2.6	TPM1	chr15
7.43	6.27	2.23	CCDC150	chr2
10.28	9.16	2.18	OGT	chrX
9.8	11.23	-2.7	ARL4C	chr2
6.21	7.69	-2.78	VIPR1	chr3
7.02	5.94	2.11	SYCP2L	chr6
9.81	11.96	-4.44	SGK1	chr6
8.52	7.17	2.55	GABRE	chrX
10.46	8	5.5	GOLGA8A; GOLGA8B	chr15
7.29	6	2.45	GOLGA8A; GOLGA8B	chr15
6.81	5.41	2.63	GOLGA8A; GOLGA8B; NXF3	chr15
10.93	9	3.82	GOLGA8A; GOLGA8B	chr15
8.35	10.44	-4.25	SGK1	chr6
9.92	12.05	-4.37	SGK1	chr6
7.67	6.3	2.58	CSAG2; CSAG3	chrX
6.29	7.92	-3.09	GAP43	chr3
7.13	9.04	-3.75	GAP43	chr3
9.38	8.22	2.23	PSMA1	chr11
9.26	8.15	2.17	HNRNPA2B1	chr7
8.88	7.69	2.28	PILRB; STAG3L5P-PVRIG2P-PILRB	chr7
6.86	5.85	2.01	ST20	chr15
6.72	5.52	2.3	HNRNPU	chr1
10.4	8.12	4.87	GOLGA8A	chr15
10.07	8.19	3.68	GOLGA8A	chr15
7.2	6	2.3	AMY2B	chr1
11.59	10.56	2.04	LOC105369248; NPIP11; NPIP3; NPIP4; NPIP5	chr16
8.73	7.63	2.14	ANKRD36; ANKRD36B; ANKRD36C	chr2
12.36	11	2.58	MALAT1	chr11
9.47	8.18	2.44	MALAT1	chr11
7.51	6.31	2.3	LOC100288152	chr5
7.03	5.81	2.33	GOLGA8A	chr15
8.57	7.06	2.85	GOLGA8A; GOLGA8B	chr15
9.53	7.8	3.32	CCNL2	chr1
9.32	8.08	2.36	HERC2; HERC2P2; HERC2P9; LOC105369242	chr15
8.63	7.34	2.45	ANKRD36; ANKRD36C	chr2
5.6	6.86	-2.4	CYP1B1	chr2
6.98	5.87	2.16	PMS2CL	chr7
8.29	7.06	2.34	CAPRIN2	chr12
5.58	6.84	-2.39	SEMA3C	chr7
7.09	6.09	2.01	FOS	chr14
9.3	8.24	2.08	TRIB3	chr20
6.64	5.63	2.02	MIR17HG; MIR18A; MIR19A; MIR19B1; MIR20A; MIR92A1	chr13
7.05	5.56	2.8	ANKRD36	chr2
9.97	8.65	2.5	HMOX1	chr22

10.76	9.46	2.47	HMOX1	chr22
10.92	9.76	2.23	SNHG12	chr1
7.51	6.32	2.28	SUN3	chr7
8.77	10.11	-2.53	ARL4C	chr2
7.33	6.05	2.43	ZNF767P	chr7
7.37	6.17	2.29	CRYGS	chr3
8.32	7.04	2.42	SNHG7; SNORA17B	chr9
10.25	9.05	2.3	SNHG7	chr9
7.92	6.82	2.15	RBM33	chr7
9.84	8.4	2.72	CCNL2	chr1
11.14	10.04	2.13	CAPRIN2	chr12
7.34	6.03	2.48	HBEGF	chr5
7.43	5.94	2.81	HSPA8	chr11
8.74	7.65	2.13	SNHG12; SNORA61	chr1
8.6	7.37	2.35	HNRNPU	chr1
8.22	7.07	2.23	NFKBIZ	chr3
12.12	11.07	2.08	LOC100996763; NBPF10; NBPF11; NBPF14; NBPF15; NBPF19; NBPF25P; NBPF26; NBPF8; NBPF9	chr1
11.37	10.34	2.04	KLF2	chr19
5.43	6.54	-2.15	CNTN1	chr12
8.86	7.01	3.61	ZFAS1	chr20
9.21	7.93	2.42	MGEA5	chr10
8.72	6.72	4.02	RSRP1	chr1
6.62	5.6	2.02	GCLC	chr6
7.37	5.55	3.54	NSUN5P1; NSUN5P2	chr7
7.13	6.06	2.1	CASP4	chr11
7.06	5.7	2.57	IFI44	chr1
6.93	5.57	2.56	IFI44	chr1
9.96	8.3	3.16	IFI44	chr1
9.14	7.97	2.25	SRSF5	chr14
7.68	6.59	2.13	PNISR	chr6
6.93	5.37	2.94	NDUFS2	chr1
10.36	9.13	2.34	SRSF5	chr14
7.37	5.78	3.01	NSUN5P1; NSUN5P2	chr7
7.1	6.04	2.09	RBM8A	chr1
8.71	7.48	2.35	ANKRD10	chr13
7.69	6.14	2.92	HNRNPD	chr4
9.03	7.69	2.54	SRSF11	chr1
8	6.72	2.44	RPS4X	chrX
8.23	6.98	2.38	CBWD1; CBWD2; CBWD3; CBWD4P; CBWD5; CBWD6; CBWD7	chr2
8.74	7.61	2.18	PABPN1	chr14
9.33	8.26	2.1	NSUN5P1; NSUN5P2	chr7
7.09	5.68	2.67	NABP1	chr2
7.32	6.12	2.29	PCBP2	chr12

9	7.92	2.1	CCDC93	chr2
7.82	6.18	3.12	CCDC93	chr2
6.05	4.48	2.97	RSRP1	chr1

Ek-2 IC₈₀ Polidatin içeren örnek grubu ve kontrol grubu microarray gen listesi

ilac2 Avg (log2)	kontrol Avg (log2)	Fold Change	Gene Symbol	Chromo some
10.42	8	5.34	GOLGA8A; GOLGA8B	chr15
10.5	8.12	5.22	GOLGA8A	chr15
9.07	7.01	4.19	ZFAS1	chr20
10.33	8.3	4.11	IFI44	chr1
8.72	6.72	4.02	RSRP1	chr1
9.81	7.94	3.65	PABPC1L	chr20
10.5	8.65	3.61	HMOX1	chr22
11.26	9.46	3.5	HMOX1	chr22
8.12	6.32	3.47	SUN3	chr7
10.75	9	3.37	GOLGA8A; GOLGA8B	chr15
7.89	6.14	3.36	HNRNPD	chr4
7.67	5.94	3.33	HSPA8	chr11
7.41	5.7	3.27	IFI44	chr1
7.28	5.57	3.27	IFI44	chr1
8.42	6.72	3.26	RPS4X	chrX
9.89	8.19	3.25	GOLGA8A	chr15
7.56	5.87	3.23	TPM1	chr15
7.95	6.27	3.2	CALD1	chr7
12.52	10.87	3.14	HMOX1	chr22
9.27	7.63	3.11	HDAC9	chr7
9.42	7.8	3.08	CCNL2	chr1
7.16	5.55	3.07	NSUN5P1; NSUN5P2	chr7
7.78	6.18	3.04	CCDC93	chr2
10.26	8.66	3.04	PTPRR	chr12
9.23	7.65	3	SNHG12; SNORA61	chr1
7.9	6.31	3	LOC100288152	chr5
6.05	4.48	2.97	RSRP1	chr1
10.67	9.13	2.89	SRSF5	chr14
9.36	7.83	2.89	GAD1	chr2
7.39	5.86	2.88	FGF1	chr5
9.45	7.93	2.86	MGEA5	chr10
9.73	8.22	2.85	PSMA1	chr11
8.49	6.98	2.85	CBWD1; CBWD2; CBWD3; CBWD4P; CBWD5; CBWD6; CBWD7	chr2
7.77	6.27	2.84	CCDC150	chr2
8.28	6.79	2.82	CFAP70	chr10
7.15	5.68	2.78	NABP1	chr2
10.15	8.68	2.77	ABCC5	chr3

8.77	7.31	2.77	C3orf52	chr3
9.44	7.97	2.76	SRSF5	chr14
9.86	8.4	2.76	CCNL2	chr1
7.24	5.78	2.76	NSUN5P1; NSUN5P2	chr7
7.4	5.94	2.74	SYCP2L	chr6
7.92	6.48	2.7	TEP1	chr14
8.47	7.04	2.7	SLC25A37	chr8
7.53	6.1	2.69	S1PR1	chr1
11.16	9.75	2.66	CGB; CGB1; CGB2; CGB5; CGB7; CGB8	chr19
11.45	10.07	2.6	AMIGO2	chr12
7.44	6.06	2.6	CASP4	chr11
11.08	9.71	2.59	CGB; CGB1; CGB2; CGB5; CGB7; CGB8	chr19
11.42	10.05	2.58	AMIGO2	chr12
9.06	7.69	2.58	SRSF11	chr1
7.67	6.3	2.58	CSAG2; CSAG3	chrX
7.4	6.03	2.58	HBEGF	chr5
10.79	9.42	2.58	PODXL	chr7
7.82	6.46	2.57	IGFBP3	chr7
8.51	7.15	2.57	FAM24B	chr10
7.48	6.12	2.56	PCBP2	chr12
7.4	6.05	2.55	ZNF767P	chr7
11.1	9.76	2.54	CGB; CGB1; CGB2; CGB5; CGB7; CGB8	chr19
8.03	6.69	2.54	C11orf73	chr11
10.46	9.12	2.52	SLC7A5	chr16
12.33	11	2.52	MALAT1	chr11
8.94	7.61	2.51	PABPN1	chr14
8.76	7.46	2.46	GDF15	chr19
9.44	8.14	2.46	SERPINB7	chr18
6.71	5.41	2.46	PLGLB2	chr2
8.92	7.62	2.45	PTPRR	chr12
8.66	7.37	2.45	RGS2	chr1
6.85	5.55	2.45	TCHH	chr1
8.21	6.92	2.45	CYTH2	chr19
7.92	6.64	2.44	MKRN3	chr15
7.33	6.04	2.44	RBM8A	chr1
7.23	5.95	2.43		chr1
8.03	6.75	2.43	MARS	chr12
9.78	8.51	2.41	PLK2	chr5
6.64	5.37	2.41	NDUFS2	chr1
11.26	9.99	2.41	CGB; CGB1; CGB2; CGB5; CGB7; CGB8	chr19
6.89	5.63	2.4	MIR17HG; MIR18A; MIR19A; MIR19B1; MIR20A; MIR92A1	chr13
6.08	4.82	2.4	NNMT	chr11
6.55	5.3	2.39		chr1
6.55	5.3	2.39		chr1
6.82	5.56	2.39	ANKRD36	chr2

6.94	5.7	2.36	EID3	chr12
9.36	8.12	2.36	SLC25A37	chr8
10.02	8.79	2.35	CTGF	chr6
8.67	7.44	2.35	SERTAD4	chr1
10.99	9.76	2.34	SNHG12	chr1
7.4	6.17	2.34	CRYGS	chr3
7.68	6.45	2.34	ZNF385B	chr2
8.4	7.17	2.34	GABRE	chrX
9.49	8.27	2.33	PTPRR	chr12
7.87	6.65	2.33	ANKRD19P	chr9
6.94	5.73	2.32	PLEKHA8P1	chr12
9.05	7.84	2.32	RHEBL1	chr12
8.28	7.07	2.32	NFKBIZ	chr3
8.76	7.55	2.31	RFXAP	chr13
10.37	9.16	2.31	OGT	chrX
9.39	8.19	2.31		chr17
6.2	4.99	2.31	SLC25A27	chr6
10.46	9.26	2.3	HBEGF	chr5
8.26	7.06	2.3	CAPRIN2	chr12
9.87	8.68	2.29	PLK2	chr5
10.94	9.76	2.28	GOS2	chr1
6.2	5.01	2.28	CALD1	chr7
6.79	5.6	2.28	SUGP2	chr19
8.67	7.48	2.28	ANKRD10	chr13
7.32	6.14	2.26	ADARB1	chr21
7.91	6.73	2.26	WDR33	chr2
9.32	8.15	2.26	HNRNPA2B1	chr7
8.09	6.92	2.25	EPM2AIP1	chr3
9.24	8.08	2.24	HERC2; HERC2P2; HERC2P9; LOC105369242	chr15
7.82	6.67	2.22	CLDN1	chr3
7.22	6.07	2.21	CHAC1	chr15
6.07	4.93	2.2	PTPRB	chr12
12.1	10.96	2.2	AMIGO2	chr12
11.18	10.04	2.2	CAPRIN2	chr12
5.73	4.6	2.2	ZDHHC11; ZDHHC11B	chr5
6.21	5.08	2.2	DACH1	chr13
8.67	7.54	2.19	PLK2	chr5
8.5	7.37	2.19	HNRNPU	chr1
7.99	6.86	2.19	SALL3	chr18
8.88	7.75	2.18	BTNL9	chr5
9.28	8.15	2.18	CALD1	chr7
11.56	10.44	2.17	PODXL	chr7
9.55	8.43	2.17	PRPF4B	chr6
10.18	9.06	2.17	SLC25A37	chr8
7.81	6.69	2.16	DPY19L2; DPY19L2P1	chr12
8.11	6.99	2.16	SOCS3	chr17

7.83	6.72	2.15	SIVA1	chr14
8.44	7.34	2.15	ANKRD36; ANKRD36C	chr2
8.15	7.05	2.15	RNF144B	chr6
7.67	6.57	2.14	ARHGEF10	chr8
6.17	5.07	2.14	TMEM144	chr4
7.14	6.04	2.14	CALD1	chr7
9.12	8.03	2.13	COL7A1	chr3
7.15	6.06	2.13	LOC100130428	chr11
8.3	7.21	2.13	TBRG1	chr11
9.23	8.14	2.12	PLAGL1	chr6
8.12	7.03	2.12	LVRN	chr5
7.23	6.15	2.12	SGK494	
7.88	6.8	2.12	FMN1	chr15
10.28	9.2	2.11	SLC7A11	chr4
7.24	6.17	2.1	RPS27A	chr2
6.35	5.28	2.1	GPC2	chr7
11.36	10.29	2.1	CYR61	chr1
7.26	6.19	2.1	DPY19L2	chr12
9.82	8.75	2.1	GDF15	chr19
10.08	9.02	2.09	SNHG12	chr1
9.87	8.8	2.09	PLAGL1	chr6
6.22	5.16	2.09	SLC25A27	chr6
9.96	8.9	2.08	LOC102724993; LOC105376752; NPIP; NPIPA5; NPIPA7; NPIPA8; PKD1P1	chr16
8.87	7.81	2.08	SERPINB8	chr18
5.63	4.57	2.08	MIR17HG; MIR18A; MIR19A; MIR19B1; MIR20A; MIR92A1	chr13
7.06	6	2.08	AMY2B	chr1
7.77	6.72	2.08	STK4	chr20
6.7	5.65	2.08	CCDC150	chr2
11.39	10.34	2.08	KLF2	chr19
8.84	7.79	2.08	ZNF345	chr19
10.62	9.57	2.07	RPL10	chrX
11.17	10.13	2.07	CTGF	chr6
8.06	7.01	2.07	AHSA2	chr2
6.09	5.04	2.06	CDKAL1	chr6
6.81	5.77	2.06	NR4A2	chr2
6.1	5.06	2.06	MYSM1	chr1
7.27	6.23	2.06	ZNF76	chr6
7.56	6.52	2.06	ZNF345	chr19
9.22	8.18	2.06	MALAT1	chr11
8.29	7.25	2.06	PCBP2	chr12
8.84	7.81	2.05	CBS; CBSL	chr21
8.96	7.92	2.05	CCDC93	chr2
9.51	8.48	2.05	TBRG1	chr11
8.84	7.8	2.05	WDR90	chr16

11.2	10.17	2.04	MIR22HG	chr17
8.37	7.34	2.04	RC3H1	chr1
6.65	5.63	2.04		chr19
9.47	8.44	2.04	LOC100506548; RPL37	chr5
9.89	8.86	2.04	STX3	chr11
9.52	8.5	2.03	LRIG1	chr3
6.83	5.81	2.03	GOLGA8A	chr15
8.78	7.75	2.03	KLHDC4; LOC105371397	chr16
7.93	6.91	2.03	VPS50	chr7
5.5	4.48	2.03	MIR17HG; MIR18A; MIR19A; MIR19B1; MIR20A; MIR92A1	chr13
6.58	5.56	2.03	ITGAM	chr16
6.81	5.79	2.03	GAD1	chr2
9.47	8.46	2.02	WHAMMP2; WHAMMP3	chr15
9.94	8.92	2.02	NPC1	chr18
10.26	9.25	2.02	SUSD5	chr3
9.33	8.32	2.02	ADTRP	chr6
8.05	7.04	2.02	SNHG7; SNORA17B	chr9
6.88	5.87	2.02	PMS2CL	chr7
7.83	6.82	2.01	RBM33	chr7
10.43	9.42	2.01	FRMD6	chr14
6.42	5.41	2.01	GOLGA8A; GOLGA8B; NXF3	chr15
9.2	8.19	2.01	HNRNPDL	chr4
6.38	5.38	2.01	VPS13A	chr9
9.21	8.2	2.01	WNT5B	chr12
9.06	8.06	2	PRPF4B	chr6
6.69	7.69	-2	VIPR1	chr3
9.42	10.42	-2.01	HPCAL1	chr2
6.9	7.92	-2.02	DNER	chr2
8.31	9.34	-2.04	S100A4	chr1
9.99	11.02	-2.05	ST3GAL5	chr2
8.25	9.29	-2.05	TNC	chr9
7.51	8.56	-2.06		
8.93	9.99	-2.08	TM7SF2	chr11
8.9	9.97	-2.09	TM7SF2	chr11
8.11	9.19	-2.1	S100A4	chr1
7.59	8.66	-2.1	IFITM1	chr11
9.16	10.24	-2.11	SEMA3C	chr7
5.25	6.33	-2.12	NUDT16	chr3
9	10.08	-2.12	F2RL1	chr5
9.06	10.15	-2.12	TM7SF2	chr11
8.2	9.28	-2.12	CRABP2	chr1
5.83	6.95	-2.17	FAM13C	chr10
7.81	8.98	-2.25	TNC	chr9
11.37	12.56	-2.27	IMMT	chr2
8.12	9.35	-2.35	HTRA1	chr10

8.31	9.62	-2.47	REEP2	chr5
8.46	9.79	-2.52	F2RL1	chr5
7.1	8.45	-2.55	CYP1A1	chr15
10.07	11.42	-2.55	VGF	chr7
7.62	8.98	-2.56	IFITM1	chr11
6.47	7.92	-2.73	GAP43	chr3
9.77	11.23	-2.76	ARL4C	chr2
9.99	11.47	-2.79	VGF	chr7
6.15	7.66	-2.85	PRDM1	chr6
8.54	10.11	-2.95	ARL4C	chr2
7.19	8.84	-3.16	GBP2	chr1
10.22	11.95	-3.32	SGK1	chr6
7.3	9.04	-3.32	GAP43	chr3

EK-3. MCF-7 hücrelerinde proliferasyon ile ilişkili tüm genlerin ortalama kat regülasyonları

Gen Adı	Ortalama CT Değeri		Ortalama Average CT		2 ^Δ CT Değeri		Kat Değişimi
	Kontrol	Numune	Kontrol	Numune	Kontrol	Numune	N/K
AKT1	23.74	21.45	3.64	3.00	0.0804	0.1250	1.56
APC	29.61	26.87	9.51	8.42	0.0013	0.0029	2.12
ATM	31.03	29.89	10.93	11.44	0.00051	0.00035	-1.43
BAX	20.91	18.62	0.81	0.17	0.5719	0.8876	1.55
BCL2	23.07	20.62	2.97	2.17	0.1279	0.2219	1.73
BCL2L1	25.79	23.43	5.69	4.98	0.0194	0.0316	1.64
BCR	23.38	22.78	3.28	4.33	0.1032	0.0496	-2.08
BRCA1	30.30	26.29	10.20	7.84	0.00085	0.0043	5.11
BRCA2	29.87	31.90	9.77	10.55	0.0011	0.0006	-1.72
CASP8	30.90	30.42	10.80	11.97	0.00056	0.00024	-2.25
CCND1	17.06	14.76	-3.04	-3.69	8.2477	12.888	1.56
CDH1	28.16	27.03	8.06	8.58	0.0037	0.0026	-1.44
CDK4	26.18	23.87	6.08	5.42	0.0148	0.2332	1.57
CDKN1A	26.83	23.84	6.73	5.39	0.0094	0.0238	2.52
CDKN2A	30.93	30.10	10.83	11.65	0.0005	0.00031	-1.77
CDKN2B	29.11	28.55	9.01	10.10	0.0019	0.0009	-2.13
CDKN3	25.40	22.96	5.30	4.51	0.0254	0.0438	1.72
CTNNB1	22.35	19.83	2.25	1.38	0.2108	0.3842	1.83
E2F1	29.75	26.70	9.65	8.25	0.0012	0.0032	2.64
EGF	25.11	22.51	5.01	4.06	0.0311	0.0599	1.93
ELK1	27.89	25.62	7.79	7.17	0.0045	0.0069	1.54
ERBB2	22.95	20.70	2.85	2.25	0.1390	0.2102	1.51
ESR1	23.76	21.23	3.66	2.78	0.0793	0.1453	1.83
ETS1	28.27	26.45	8.17	8.00	0.0034	0.0039	1.12
FHIT1	24.48	23.57	4.38	5.12	0.0481	0.0287	-1.68
FOS	25.73	23.92	5.63	5.47	0.0202	0.0225	1.11
FOXD3	29.71	26.68	9.61	8.23	0.0012	0.0033	2.59
HGF	28.29	28.29	8.19	10.34	0.0034	0.0007	-4.46

HIC1	26.62	23.57	6.52	5.12	0.0109	0.0287	2.63
HRAS	20.67	18.52	0.57	0.07	0.6754	0.9513	1.41
IGF2R	29.09	28.78	8.98	10.33	0.0019	0.0007	-2.54
JAK2	33.01	35.05	12.91	16.55	0.0001	0.00001	-12.52
JUN	30.16	29.04	10.06	10.59	0.00009	0.00006	-1.45
JUNB	30.58	29.75	10.48	11.30	0.0007	0.00039	-1.77
JUND	23.00	20.60	2.90	2.15	0.1343	0.2250	1.67
KIT	28.77	27.72	8.64	9.27	0.0024	0.0016	-1.52
KITLG	30.42	29.93	10.32	11.48	0.00078	0.00035	-2.23
KRAS	33.69	32.26	13.59	13.81	0.00008	0.00007	-1.17
MCL1	31.55	31.22	11.55	12.77	0.00033	0.0001	-2.33
MDM2	23.73	23.52	3.63	5.07	0.0809	0.0297	-2.72
MEN1	26.87	23.72	6.77	5.27	0.0091	0.0258	2.82
MET	30.51	27.48	10.41	9.03	0.0007	0.0019	2.59
MGMT	28.43	25.68	8.33	7.23	0.0031	0.0066	2.13
MLH1	26.59	24.06	6.49	5.61	0.0111	0.0204	1.83
MOS	27.66	24.58	7.56	6.13	0.0053	0.0142	2.68
MYB	30.04	29.80	9.94	11.35	0.0010	0.0003	-2.67
MYC	24.10	21.58	4.00	3.13	0.0626	0.1140	1.82
MYCN	27.47	24.44	7.37	5.99	0.00060	0.0157	2.59
NF1	33.02	31.03	12.92	12.58	0.00012	0.00016	1.26
NF2	21.40	19.22	1.30	0.77	0.4072	0.5856	1.44
NFKB1	27.72	25.80	7.62	7.35	0.0050	0.0061	1.20
NFKB1A	26.58	25.75	6.48	7.30	0.0112	0.0063	-1.77
NRAS	29.38	31.19	9.28	12.74	0.0016	0.00014	-11.05
PIK3C2A	24.17	22.09	4.07	3.64	0.0597	0.0801	1.34
PIK3CA	31.17	30.98	11.07	12.53	0.0004	0.00016	-2.76
PML	31.55	28.67	11.45	10.22	0.0003	0.0008	2.34
PRKCA	20.77	18.82	0.67	0.37	0.6302	0.7727	1.23
RAF1	23.40	21.16	3.30	2.71	0.1015	0.1526	1.51
RARA	23.78	21.92	3.68	3.47	0.0782	0.0901	1.15
RASSF1	31.59	27.02	11.49	8.57	0.00034	0.0026	7.54
RB1	31.54	30.95	11.44	12.50	0.00036	0.00017	-2.08
REL	33.12	31.30	13.02	12.85	0.00012	0.00013	1.12
RET	23.66	21.53	3.56	3.08	0.0850	0.1180	1.39
ROS1	32.26	28.87	11.90	10.42	0.00026	0.0007	1.39
RUNX1	31.07	28.66	10.97	10.21	0.0005	0.0008	1.69
RUNX3	22.81	21.22	2.71	2.77	0.1532	0.1464	-1.05
S10A4	30.80	29.55	10.70	11.10	0.0006	0.0004	-1.33
SERPINB5	31.37	30.60	11.27	12.15	0.0004	0.0002	-1.85
SH3PXD2A	26.58	24.67	6.48	6.22	0.0112	0.0133	1.19
SMAD4	24.94	22.68	4.84	4.23	0.0350	0.0532	1.52
SRC	25.28	24.17	5.18	5.72	0.0276	0.0189	-1.46
STAT3	24.48	23.21	4.38	4.76	0.0481	0.0368	-1.31
STK11	25.01	24.13	4.91	5.68	0.0333	0.0194	-1.71
TGFB1	28.08	27.07	7.98	8.62	0.0039	0.0025	-1.56

TNF	31.94	31.13	11.84	12.68	0.0002	0.00015	-1.79
TP53	24.28	22.11	4.18	3.66	0.0552	0.0790	1.43
TP73	31.03	26.01	10.93	7.56	0.0005	0.0052	10.30
TSC1	20.07	19.07	-0.03	0.62	1.0238	0.6497	-1.58
VHL	29.87	29.52	9.77	11.07	0.0011	0.0004	-2.46
WT1	29.57	29.17	9.47	10.72	0.0014	0.0005	-2.39
WWOX	25.03	24.00	4.93	5.55	0.0328	0.0213	-1.54
XRCC1	27.13	25.45	7.03	7.00	0.00076	0.0078	1.02
ZHX2	27.83	25.30	7.73	6.85	0.0047	0.0086	1.83
ACTB	11.59	10.09	-8.51	-8.36	365.56	328.10	-1.11
B2M	29.18	25.73	9.08	7.28	0.0018	0.0064	3.47
GAPDH	15.81	14.25	-4.29	-4.20	19.61	18.35	-1.07
HPRT1	24.28	22.59	4.18	4.14	0.0553	0.0566	1.02
RPLPO	19.66	19.58	-0.44	1.13	1.3603	0.4562	-2.98

EK-4. MCF-7 hücrelerinde apoptoz ile ilişkili tüm genlerin ortalama kat regülasyonları

Gen Adı	Ortalama CT Değeri		Ortalama Δ CT		$2^{-\Delta\text{CT}}$ Değeri		Kat Değişimi
	Kontrol	Numune	Kontrol	Numune	Kontrol	Numune	N/K
AIFM1	30.65	27.06	10.61	7.51	0.0006	0.0055	8.61
AKT1	23.74	22.05	3.70	2.96	0.0768	0.1288	1.68
APAF1	25.50	22.33	5.46	2.78	0.0226	0.1459	6.44
BAD	21.90	20.18	1.86	0.63	0.2750	0.6479	2.36
BAG1	28.73	26.75	8.69	7.20	0.0024	0.0068	2.82
BAG3	28.91	27.01	8.87	7.46	0.0021	0.0056	2.67
BAK1	26.97	25.15	6.93	5.60	0.0081	0.0206	2.52
BAX	21.03	19.22	0.99	-0.33	0.5027	0.2605	2.51
BCLIO	28.92	26.93	8.88	7.38	0.0021	0.0060	2.84
BCL2	23.62	21.97	3.58	2.42	0.0835	0.1873	2.24
BCL2A1	35.10	36.03	15.06	15.45	0.00002	0.00002	-1.31
BCL2L1	26.00	24.25	5.96	4.70	0.0160	0.0385	2.40
BCL2L10	30.61	29.25	10.57	9.70	0.0006	0.0012	1.84
BCL2L11	30.27	29.11	10.23	9.56	0.0008	0.00132	1.59
BCL2L2	35.67	35.57	14.96	15.45	0.00003	0.00002	-1.40
BFAR	24.00	23.10	3.96	3.55	0.0641	0.0853	1.33
BID	31.04	31.01	11.00	11.46	0.0004	0.0003	-1.37
BIK	31.56	29.64	11.52	10.09	0.0003	0.0009	2.71
BIRC2	29.12	28.01	9.08	8.46	0.0018	0.0028	1.54
BIRC3	27.62	27.66	7.58	8.11	0.0052	0.0036	-1.44
BIRC5	25.78	24.61	5.74	5.06	0.0186	0.0300	1.61
BIRC6	32.53	32.62	12.49	13.07	0.00017	0.00011	-1.49
BNIP2	33.20	32.76	13.16	13.21	0.0001	0.0001	-1.03
BNIP3	27.63	26.25	7.59	6.70	0.0051	0.0096	1.86
BNIP3L	29.83	29.52	9.81	9.97	0.0011	0.0010	-1.11
BRAF	27.80	26.79	7.76	7.24	0.0049	0.0066	1.43

CASP1	33.49	32.46	13.45	12.91	0.00008	0.0001	1.45
CASP10	35.33	33.95	15.29	14.40	0.00002	0.00004	1.85
CASP14	28.70	28.10	8.86	8.55	0.0022	0.0027	1.24
CASP2	28.83	26.74	8.79	7.19	0.0022	0.0068	3.04
CASP3	27.53	26.33	7.49	6.78	0.0055	0.0091	1.64
CASP4	27.38	26.12	7.34	6.57	0.0061	0.0105	1.71
CASP5	32.30	33.35	12.26	13.80	0.0002	0.00007	-2.90
CASP6	33.57	33.50	13.53	13.95	0.00008	0.00006	-1.34
CASP7	29.84	30.92	9.80	11.37	0.0011	0.0003	-2.96
CASP8	34.90	36.93	14.86	15.45	0.00003	0.00002	-1.51
CASP9	27.13	26.40	7.09	6.85	0.0051	0.0096	1.18
CD27	29.65	27.94	9.61	8.39	0.0012	0.0029	2.34
CD40	28.28	26.94	8.24	7.39	0.0033	0.0059	1.81
CD40LG	23.28	21.62	3.24	2.07	0.1056	0.2388	2.26
CD70	29.61	28.47	9.57	8.92	0.0013	0.0020	1.57
CFLAR	30.31	30.85	10.27	11.30	0.0008	0.0003	-2.03
CIDEA	29.32	28.85	9.28	9.30	0.0016	0.0015	-1.01
CIDEB	29.71	30.27	9.67	10.72	0.0012	0.0005	-2.06
CRADD	28.48	27.08	8.44	7.53	0.0028	0.0054	1.89
CYCS	24.33	23.06	4.29	3.51	0.0510	0.0880	1.72
DAPK1	34.67	33.54	14.63	13.99	0.00003	0.00006	1.56
DFFA	29.68	28.01	9.64	8.46	0.0012	0.0028	2.27
DIABLO	27.88	26.92	7.84	7.37	0.0043	0.0060	1.39
FADD	32.82	33.00	12.78	13.45	0.00014	0.00009	-1.59
FAS	31.44	30.24	11.40	10.69	0.0003	0.0006	1.64
FASLG	28.86	27.09	8.82	7.54	0.0022	0.0053	2.44
GADD45A	32.55	30.61	12.51	11.06	0.0001	0.0004	2.73
HRK	33.60	31.40	13.56	11.85	0.0008	0.0002	3.29
IGF1R	24.81	22.92	4.77	3.37	0.0366	0.0969	2.65
IL10	29.50	28.57	9.46	9.02	0.0014	0.0019	1.36
LTA	24.80	23.48	4.76	3.93	0.0368	0.0657	1.79
LTBR	26.48	24.90	6.44	5.35	0.0115	0.0245	2.14
MCL1	32.42	31.04	12.38	11.49	0.0001	0.0003	1.86
NAIP	30.91	29.90	10.87	10.35	0.0005	0.0007	1.44
NFKB1	27.66	25.54	7.62	5.99	0.0050	0.0157	3.11
NOD1	27.96	26.20	7.92	6.65	0.0041	0.0099	2.42
NOL3	29.32	28.43	9.28	8.88	0.0016	0.0021	1.32
PYCARD	29.24	28.14	9.20	8.59	0.0016	0.0026	1.53
RIPK2	31.48	29.64	11.44	10.09	0.0003	0.0009	2.56
TNF	33.68	32.02	13.64	12.47	0.00007	0.0001	2.26
TNFRFS10A	30.03	29.65	9.99	10.10	0.0009	0.00091	-1.08
TNFRFS10B	28.30	26.76	8.26	7.21	0.0032	0.0067	2.08
TNFRFS11B	26.42	25.83	6.38	6.28	0.00003	0.00002	1.07
TNFRFS1A	26.92	27.32	6.88	7.77	0.0084	0.0045	-1.85
TNFRFS1B	29.85	27.89	9.81	8.34	0.0011	0.0030	2.78
TNFRSF21	32.06	31.42	12.02	11.87	0.0024	0.00027	1.11

TNFRSF25	29.22	28.18	9.18	8.63	0.0017	0.0025	1.46
TNFRSF9	34.66	33.52	14.62	13.97	0.0004	0.00006	1.57
TNFSF10	27.03	26.13	6.99	6.58	0.0078	0.0104	1.33
TNFSF8	30.31	31.30	10.27	11.75	0.0008	0.0002	-2.78
TP53	24.22	21.24	4.18	1.69	0.05509	0.3107	5.64
TP53BP2	32.13	32.07	12.09	12.52	0.0002	0.00017	-1.34
TP73	26.98	25.64	6.94	6.09	0.0081	0.0146	1.80
TRADD	26.28	24.80	6.24	5.25	0.0132	0.0263	1.99
TRAF2	30.35	33.07	10.31	13.52	0.0007	0.00008	-9.22
TRAF3	29.56	30.29	9.52	10.74	0.0013	0.0005	-1.66
XIAP	25.26	24.40	5.19	4.85	0.0273	0.0347	1.27
ACTB	11.71	11.71	-8.33	-7.84	321.34	229.76	-1.40
B2M	27.53	28.38	7.49	8.83	0.0055	0.0022	-2.52
GAPDH	15.94	15.94	-4.10	-3.61	17.12	12.243	-1.40
HPRT1	20.06	19.60	4.91	2.59	0.0332	0.1665	5
RPLPO	20.06	19.60	0.02	0.05	0.9848	0.9686	-1.02

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Canan YILMAZ KAPANCIK

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

2013, Cumhuriyet Üniversitesi/Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü 2012, Teramo
Üniversitesi/Biyoteknoloji

2015, Cumhuriyet Üniversitesi/Eğitim Fakültesi, Pedagojik Formasyon 2016,

Cumhuriyet Üniversitesi/Tıp Fakültesi, Biyokimya ABD

2015, Biyoloji Öğretmenliği, Piramit Etüt Merkezi 2016, Biyoloji Öğretmenliği, Sivas
Koleji

Yayımları ve/veya Bilimsel/Sanatsal Faaliyetleri:

Yılmaz, C. (2016). Ailevi Akdeniz ateşi hastalarında kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9,
granzim-B ve APAF-1 düzeylerinin araştırılması (Master's thesis, Sağlık Bilimleri
Enstitüsü).