



T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**DMBA (7,12-DİMETİLBENZ[A]ANTRASEN) İLE MEME
KANSERİ OLUŞTURULAN RATLARDA MEDİCAGO SATİVA
ÖZÜTÜNÜN KANSERLİ MEME DOKUSU ÜZERİNDE
KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Baran DEMİR

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Mehmet Tolga KAFADAR

DİYARBAKIR- 2024

BEYAN

Bu tezin tamamen tarafıma ait olduğunu, tezin yazımındaki tüm aşamalarda etik dışı yazımın olmadığını ve telif haklarına uygun davrandığımı, edindiğim tüm verileri bilimsel çerçevede temin ettiğimi, belirtmiş olduğum tüm bilgi ve yorumlara da referans gösterdiğimi beyan ederim.

Ağustos 2024

Dr. Baran DEMİR



TEŞEKKÜR

Çalışmamda desteklerini esirgemeyen, uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana yön veren değerli tez hocam Doç. Dr. Mehmet Tolga KAFADAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Genel cerrahi eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan başta sayın Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdullah OĞUZ hocam olmak üzere tüm değerli öğretim üyelerimiz Dr. Öğr. Üyesi Hatice Gülşen YILMAZ, Prof. Dr. Sadullah GİRGİN, Prof. Dr. Ercan GEDİK, Prof. Dr. Mehmet YILMAZ, Prof. Dr. Mehmet Veysi BAHADIR, Prof. Dr. Burak Veli ÜLGER, Doç. Dr. Ulaş ADAY, Doç. Dr. Murat SEVMİŞ hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Eda YILDIZHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca beni her zaman destekleyen bu günlere gelmemi sağlayan kıymetli ailem; annem, babam ve kardeşime teşekkür ederim.

Asistanlığım boyunca maddi ve manevi her türlü desteği ile sürekli yanımda olan değerli eşim Aybüke GÜÇLÜ DEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan onur duyduğum değerli uzman ve asistan doktor arkadaşlarım; Op. Dr. Esra HAMURCU, Op. Dr. M. Ali KIRŞAN, Op. Dr. Gizem YAMAN, Op. Dr. İbrahim Halil ÖCAL, Op. Dr. Mehmet RENÇBER, Op. Dr. Faruk TATLI, Op. Dr. Hikmet ÖZESMER, Op. Dr. Faik Veysel AKPULAT, Op. Dr. Mehmet Mazlum İNAN, Op. Dr. Şakir KOCA, Dr. Azat KÖZGÜN, Dr. Mahsum BARÇİN, Dr. Aydın BARS, Dr. Ömer Serhat DAĞ, Dr. Mazlum GÜNDÜZ, Dr. Ferdi BAYRAK, Dr. Abdülkadir AKBAŞ, Dr. Alper KIZIL, Dr. Ferhat IŞIK, Dr. Mervan KAMAR, Dr. Hasan ALKLAY, Dr. Bilal URUÇ, Dr. Çağrı ARSLAN, Dr. Dilan YILDIZ, Dr. Hasip GÖZÖNÜNDE, Dr. Zehra ŞEKHO, Dr. Ayşe MUTLU, Dr. İsmail ATAM, Dr. Mirkan Can AYHAN, Dr. Veli İÇKE'ye teşekkür ederim.

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığınca TIP.24.007 numaralı proje ile desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
KISALTMALAR	x
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Tarihçe.....	6
2.2. Meme Kanseri	7
2.2.1. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi.....	7
2.2.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri	10
2.2.3. Memenin Embriyolojisi	11
2.2.4. Memenin Anatomisi ve Histolojisi	12
2.2.5. Memenin Fizyolojisi	13
2.2.6. Sıçanlarda Meme Anatomisi ve Histolojisi	14
3. KANSER VE KARSİNOGENEZ SÜRECİ	16
3.1. Karsinogenez Sürecine Etki Eden Faktörler.....	16
3.1.1. Serbest Radikaller ve Etkileyen Faktörler	16
3.2. Lipid Peroksidasyonu ile İlgili Parametre	17
3.2.1. Malondialdehit (MDA)	17
3.2.2. Antioksidanlar ve Etkileyen Faktörler	18
3.3. Meme Kanserini Önlemede Fitoterapinin Yeri ve Polifenol Bileşikler	19
3.4. DMBA (7,12 dimetilbenz[a]antrasen)	20

4. MATERYAL ve METOD	22
4.1. Etik Kurul Onamı ve Proje Desteğinin Alınması.....	22
4.2. Meme Kanserinin Oluşturulması ve Kimyasalının Temini	22
4.3. Medicago Sativa Özüünün Hazırlanması ve Uygulanması	23
4.4. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	26
4.5. Biyokimyasal Analizler	27
4.6. Malondialdehit (MDA) Analizi	28
4.7. Total Antioksidan Statüsü (TAS) Analizi	28
4.8. Total Oksidan Kapasitesi (TOS).....	28
4.9. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)	29
4.10. Rutin Histolojik Takip	29
4.11. Histokimyasal incelemeler	30
4.12. İmmunohistokimyasal incelemeler	32
4.13. İstatistiksel Analiz.....	34
5. BULGULAR	36
5.1. Biyokimyasal Analizler	36
5.1.1. Kan Serum Malondialdehit (MDA) Değerlerinin Öölmesi	36
5.1.2. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS).....	36
5.1.3. Total Oksidan Kapasitesi (TOS)	37
5.1.4. Serum OSI Analizleri.....	38
6. TARTIşMA.....	41
7. SONUÇ	48
KAYNAKÇA	49

TABLO LİSTESİ

TABLO 1. HİSTOLOJİK DOKU TAKİBİNİN AŞAMALARI.....	29
TABLO 2. HEMATOKSİLEN & EOZİN (H&E) BOYAMA İŞLEMİNİN AŞAMALARI	31
TABLO 3. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA İŞLEMİNİN AŞAMALARI	33
TABLO 4. GRUPLAR ARASI ORTALAMASI ALINAN SERUM MDA, TAS, TOS VE OSI DEĞERLERİNİN ORTALAMA±STANDART SAPMALARI.....	40
TABLO 5. GRUPLARDA MDA ORTALAMA DEĞERLERİ	43
TABLO 6. GRUPLARDA TOS ORTALAMA DEĞERLERİ	45
TABLO 7. GRUPLARDA TAS ORTALAMA DİĞERLERİ	45

ŞEKİL LİSTESİ

ŞEKİL 1. TÜRKİYE’DE HER İKİ CİNSİYETTE KANSER İNSİDANSI (4)	8
ŞEKİL 2. TÜRKİYE’DE KADIN CİNSİYETTE KANSER İNSİDANSI (4)	8
ŞEKİL 3. DÜNYADA KADIN CİNSİYETTE KANSER İNSİDANSI (4)	9
ŞEKİL 4. TÜRKİYE’DE KADINLARDA MORTALİTE İNSİDANSI (4)	10
ŞEKİL 5. MEMENİN ANATOMİSİ VE LOBÜLER YAPISI (33)	12
ŞEKİL 6. DIŞI SIÇANLARDA MEME BEZLERİNİN ANATOMİK YERLEŞİMİ (26)	15
ŞEKİL 7. KARSİNOGENEZ BASAMAKLARI (45)	16
ŞEKİL 8. FLAVONOİD GRUBU ÜYELERİ (69)	20
ŞEKİL 9. DMBA (7,12 DİMETİLBENZ[A]ANTRASEN) (72)	21
ŞEKİL 10. SERUM MDA DEĞERLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ SONUCU OLUŞAN ORTALAMALARININ GRAFİĞİ	36
ŞEKİL 11. SERUM TAS DEĞERLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ SONUCU OLUŞAN ORTALAMALARININ GRAFİĞİ.	37
ŞEKİL 12. SERUM TOS DEĞERLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ SONUCU OLUŞAN ORTALAMALARININ GRAFİĞİ.	38
ŞEKİL 13. SERUM OSI DEĞERLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ SONUCU OLUŞAN ORTALAMALARININ GRAFİĞİ.	39
ŞEKİL 14. HÜCREDE APOPTOZ MEKANİZMASI VE AŞAMALARI (139)	47

RESİM TABLOSU

RESİM 1. DMBA’NIN İNTRAPERİTONEAL UYGULANMASI	23
RESİM 2. MEDİCAGO SATİVA BİTKİ TOZUNUN MANYETİK KARIŞTIRICI İÇERİSİNDE KARIŞTIRILMASI.	24
RESİM 3. MEDİCAGO SATİVA BİTKİ ÖZÜTÜNÜN ÜSTTE KALAN ALKOL+ÖZÜT KISMININ BALON JOJE İÇERİSİNDE TOPLANMASI.	25
RESİM 4. MEDİCAGO SATİVA TOZLARININ ALKOLİK ÖZÜTÜNÜN ROTARI EVAPORATÖR İLE AYRIŞTIRILMASI.	25



KISALTMALAR

DMBA: 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen

MS: Medicago Sativa

WA: Wistar Albino

TAS: Total anti-oksidan

TOS: Total oksidan

OSI: Oksidatif Stres İndeksi

MDA: Malondialdehit

BRCA-1: Meme Kanseri Duyarlılık Geni-1

BRCA-2: Meme Kanseri Duyarlılık Geni-2

GH: Büyüme Hormonu

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

TGF- α : Transforme Edici Büyüme Faktörü- α

IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

FSH: Folikül Stimulan Hormon

LH: Luteinizan Hormon

CAT: Katalaz

SOD: Süperoksit Dismutaz

SOR: Süperoksit Radikali

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz

GSH-R: Glutasyon redüktaz

GST: Glutasyon-s-transferaz

NMU: N-nitrozo-N-metilüre

TBA: Tiyobarbitürik Asit

BCL-2: B Hücreli Lenfoma Geni-2

BAX: Bcl İlişkili X Proteini

PBS: Tamponlanmış Fosfat Salin

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Baran Demir

Danışmanı: Doç. Dr. Mehmet Tolga Kafadar

Anabilim Dalı: Genel Cerrahi

ÖZET

DMBA(7,12-Dimetilbenz[a]antrasen) ile Meme Kanseri Oluşturulan Ratlarda Medicago Sativa Özütünün Kanserli Meme Dokusu Üzerinde Koruyucu Etkinliğinin İncelenmesi

Amaç: Türkiye’de ve dünya genelinde kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseridir. Bu nedenle meme kanseri toplumda önemli bir sağlık problemidir. Bu çalışmada DMBA ile indüklenen meme kanseri modelinde Medicago sativa (Yonca) özütünün kanserli doku üzerine koruyucu etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda ortalama ağırlıkları 200-250 gram (g) arasındaki 28 adet Wistar Albino cinside dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar random olarak 4 gruba ayrıldı. İlk grup kontrol grubu, ikinci grup sadece Medicago sativa özütü verilen, üçüncü gruba sadece DMBA verilen ve dördüncü grup DMBA+Medicago sativa özütü verilen grup olarak belirlendi. 10 hafta süren çalışma sonrasında sıçanlar sakrifiye edilerek doku ve plazma numuneleri temin edilerek çalışıldı. Plazma numunelerinden Malondialdehit, total oksidan ve anti-oksidan düzeyleri çalışıldı. Doku numunelerinden bcl-2, bax proteinleri ve immunohistokimyasal incelemeler yapıldı.

Bulgular: Çalışmamızdaki veriler DMBA ve DMBA+MS grupları arasında MDA, TOS ve TAS düzeyleri açısından anlamlı farklar olduğunu göstermiştir. Serum MDA düzeylerinde en yüksek ortalamanın DMBA grubunda olduğu, DMBA grubunda serum TOS düzeyleri en yüksek düzeyde görülürken, DMBA+MS grubunda DMBA grubuna kıyasla anlamlı derecede daha düşüktü. En yüksek TAS ortalaması

MS grubunda meydana gelirken, en düşük ortalamanın DMBA grubunda olduğu görüldü. Histolojik inceleme ve immunhistokimyasal boyamada DMBA grubunda hücresel düzeyde orta şiddette fibrozis izlenmiş olup, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, meme hücrelerinde dejeneratif değişiklikler ve olağan duktal hiperplazi geliştiği görüldü. DMBA+MS grubuna ait spesmenlerde ise sadece zayıf orta şiddette fibrozis ve vaskülarizasyon artışının geliştiği görüldü. DMBA sonrası uygulanan MS meme hücrelerini histopatolojik açıdan olumlu yönde etkilediği izlendi. Bax ekspresyonu DMBA grubunda hafif pozitif-negatif izlenirken; DMBA+MS grubunda Medicago sativa'nın anti-apoptotik etkinliği nedeniyle yoğun pozitif ekspresyon izlendi. Bcl-2 ekspresyonu DMBA grubunda orta yaygınlıkta pozitif izlenirken; DMBA+MS grubunun meme dokularında genel olarak hafif düzeyde pozitif ekspresyonlar verdiği görüldü.

Sonuç: Bu araştırmadan elde edilen bulgular, Medicago sativa'nın ratlarda DMBA ile uyarılan meme tümörü oluşumuna karşı antikanser potansiyelini ortaya çıkardı. Medicago sativa, memede tümöral hücrelerin viabilitesini etkili bir şekilde azalttı ve ayrıca bu hücrelerde ROS'u ve apoptotik hücre ölümünü arttırdı. Genel olarak bu sonuçlar, WA sıçanlarında DMBA ile oluşturulan meme kanserine karşı Medicago sativa'nın antioksidan ve antikanser rolünün olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Medicago sativa, 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen, Meme kanseri

Student's Surname and Name: Baran Demir

Adviser of Thesis: Assoc. Prof. Mehmet Tolga Kafadar

Department: General Surgery

ABSTRACT

Investigation of the Protective Effect of Medicago Sativa Extract on Cancerous Breast Tissue in Rats with Breast Cancer Induced by DMBA (7,12-Dimethylbenz[a]anthracene)

Aim: Breast cancer is the most common type of cancer among women both in Turkey and worldwide, making it a significant public health issue. This study aims to investigate the protective effect of Medicago sativa (Alfalfa) extract on cancerous tissue in a breast cancer model induced by DMBA.

Materials and Methods: In our study, 28 female Wistar Albino rats, weighing between 200-250 grams, were used. The rats were randomly divided into four groups. The first group was the control group, the second group received only Medicago sativa extract, the third group was given only DMBA, and the fourth group received both DMBA and Medicago sativa extract. After a 10-week study period, the rats were sacrificed, and tissue and plasma samples were collected for analysis. Plasma samples were analyzed for Malondialdehyde, total oxidant, and antioxidant levels. Tissue samples were examined for bcl-2, bax proteins, and immunohistochemical analysis.

Results: The data from our study showed significant differences in MDA, TOS, and TAS levels between the DMBA and DMBA+MS groups. The highest mean serum MDA levels were observed in the DMBA group, with the highest serum TOS levels also seen in this group, while the DMBA+MS group had significantly lower levels compared to the DMBA group. The highest TAS mean was observed in the MS group, with the lowest mean in the DMBA group. Histological examination and

immunohistochemical staining showed moderate fibrosis at the cellular level in the DMBA group, along with inflammatory cell infiltration, degenerative changes in breast cells, and typical ductal hyperplasia. In the specimens from the DMBA+MS group, only mild to moderate fibrosis and increased vascularization were observed. MS applied after DMBA positively affected breast cells histopathologically. Bax expression was slightly positive-negative in the DMBA group, while intense positive expression was observed in the DMBA+MS group due to the anti-apoptotic effect of *Medicago sativa*. Bcl-2 expression was moderately positive in the DMBA group, while mild positive expressions were generally observed in the breast tissues of the DMBA+MS group.

Conclusion: The findings from this study revealed the anticancer potential of *Medicago sativa* against DMBA-induced breast tumor formation in rats. *Medicago sativa* effectively reduced the viability of tumoral cells in the breast and also increased ROS and apoptotic cell death in these cells. Overall, these results demonstrate the antioxidant and anticancer role of *Medicago sativa* against DMBA-induced breast cancer in Wistar rats.

Keywords: *Medicago sativa*, 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene, Breast cancer

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri (MK) son yıllarda akciğer kanserini geride bırakarak tüm dünyada en sık görülen kanser türü haline gelmiştir (1). Yüksek morbidite ve mortaliteye sahip olmasından dolayı kadınlar ve ülkelerdeki sağlık sistemleri için önemli bir sağlık problemidir (2). Dünya sağlık örgütünün verilerine göre MK'nin 2020 insidansı 2,26 milyon olarak hesaplanmış ve 2020 yılında 685 bin ölüm ile kadın cinsiyette en sık mortalite nedeni olmuştur (3). Kanser nedeni ölümler arasında MK 5. Sırada yer almaktadır. Sağlık tahminlerine göre MK insidansının 2040 yılında 3,19 milyona; MK'ne bağlı mortalitenin de 1.04 milyona çıkacağı öngörülmektedir. MK insidansı artmasına rağmen 1990'lı yıllardan sonra MK'ne bağlı ölümlerde azalma olduğu görülmektedir (4). Bu durumun erken tanı ve tedavi modalitelerinin geliştirilmesi, kanser tarama programlarının daha da yaygınlaşması ve toplumda meme kanseri bilincinin artmasına bağlı olduğu düşünülebilir.

Kanser türlerinin tedavisi ile ilgili son yıllarda cerrahi ve onkolojik prensipler açısından ciddi gelişmeler görülmektedir. Bu tedavilerin yanında tıbbi bitkilerin kanser tedavisi ile ilgili etkileri de son yıllarda ilgi çekici bir konu olmuştur. Bu kapsamda yonca bitkisi (*Medicago Sativa*) (MS) çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmış ve farmakolojik etkileri yakın zamanda gözlenmiştir (5). Son yıllarda MS bitkisinin anti-oksidan ve anti-neoplastik etkileri olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (6,7).

Bu çalışmada, daha önce farklı dokularda anti-tümöral ve anti-oksidatif etkisi gösterilmiş yonca yapraklarından elde edilen MS ekstraktının ratlarda DMBA(7,12-Dimethylbenz(a)anthracene) ile oluşturulan meme kanseri modeli üzerine koruyucu etkisini araştırmayı planladık. Çalışmada oksidatif stres ve doku hasarını, TOS (Total oksidan seviye) ve MDA (Malondialdehid) düzeyi ile anti-oksidatif etkiyi TAS (Total anti-oksidan seviye) ile belirledik. Meme dokusunda hücresel değişikliklerin belirlenmesi için immunohistokimyasal ve patolojik boyamalar kullanıldı. Ayrıca apoptotik ve anti-apoptotik aktivitenin gösterilmesi için bax ve bcl-2 proteinleri kullanıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Meme tarih öncesi dönemlerde dahi doğurganlık ve bereket sembolü olarak görülmüş ve meme ile ilgili hastalıkları yakından incelenmiştir. Meme kanserini basitçe memede lobülleri ve duktusları kaplayan hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve çoğalması, vücudun diğer bölgelerine bu hücrelerin göç edip çoğalmaya devam etmesi şeklinde tanımlayabiliriz (8). İlk olarak Edwin Smith cerrahi papirüslerinde (MÖ 3000-2500) gösterilen meme kanseri o dönemin imkanları doğrultusunda tedavisi olmayacak derecede kötü bir hastalık olarak tanımlanmıştır (9). M.Ö. 1500’lü yıllarda yazıldığı düşünülen Mısır papirüslerinde de koterizasyon ile tedavi edilmiş 8 meme kanseri olgusu tanımlanmıştır (10).

Tibbin ve sağlığın tanrısı olarak bilinen Yunan hekim Hipokrates (M.Ö. 460-375) da iyi huylu ve habis tümörlerin ayrımını ilk kez yapmış ve ‘Carcinos ve carcinoma’ ifadelerini tanımlamıştır. Ayrıca kendi zamanında meme hastalıklarından bahsetmiş ve Corpus Hipocraticum isimli kitabında menopoza sonrası dönemde olan bir meme kanseri hastasının tedavisini ve evrelemesini yazmıştır. Hastalığın iki taraflı büyüdüğü gözlemlendikten sonra şeklinden dolayı ‘Crab’ kelimesi kullanılmıştır. Sonrasında Romalı hekim Celcus tarafından Latince’de yengeç anlamına gelen ‘Cancer’ kelimesinin temelleri atılmıştır (11).

M.S. 1. yy. da İskenderiyeli hekim Leonides memedeki tümörlerin cerrahi yapılarak çıkarılması ve koter yaklaşımlarını detaylı şekilde yazılarında anlatarak günümüzde uygulanan onkolojik cerrahi prensiplerinin temellerini atmıştır (12). M.S. 200’de diğer bir Yunanlı hekim Galen ise meme tümörlerinin kanda siyah safra birikmesine bağlı sistemik bir hastalık olduğunu belirtmiş ve tümörleri ‘Oncos’ kelimesi ile ele almıştır. Bu da onkoloji kelimesinin temellerinin bu zamanlara dayandığını bizlere göstermektedir (13).

Cerrahi uygulamalarda ilkel yaklaşımlardan uzaklaşıp modern cerrahiye geçişin temelleri 16. yy. da Belçikalı Andreas Vesalius’un insan vücudunun detaylı anatomik tanımlaması ile atılmıştır. 18. yy. da İskoç hekim John Hunter MK’nin sebebinin siyah

safrâ şeklinde tariflenen lenfatik bir sıvı olduğunu ilk kez tanımlamıştır. Aynı zamanlarda memede uygulanan bazı cerrahi uygulamalar tıbbi kayıtlarda bulunmuştur. Sonrasında mikroskobun 19. yy. da bulunması ile Almanya’da Rudolf Virchow ilk kez normal ve kanserli hücreleri mikroskop altında inceleyerek tanımlamıştır. Diğeri bir Alman bilim adamı Müller ile meme kanserinin yaşayan hücrelerden kaynaklandığını ve lenfatikler aracılığıyla aksillaya yayıldığını savunmuş ve günümüz karsinogenez mekanizmasının verilerinin temelini oluşturmuştur (14).

Cerrahi için diğeri önemli bir adım da 19. yy. da Moore tarafından atılmış olup, Moore tümörlü dokunun tamamen çıkarılması ve koltuk altındaki lenf nodlarının temizlenmesi gerektiğini savunmuştur (15). 19. yy. ın sonlarına doğru Halsted radikal mastektomiye tanımlamış ve tüm dünyada kabul görerek uygulanmaya başlanmıştır. Sonrasında X ışınlarının bulunması modifiye radikal mastektomi için zemin hazırlamıştır (16).

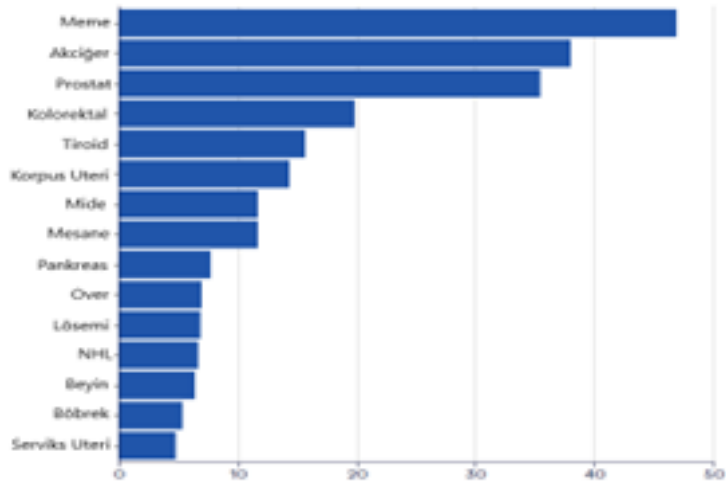
Tıp alanındaki gelişmelerle beraber meme cerrahisinde de büyük ilerlemeler kaydedildi ve onkoplastik cerrahi ve yeni onkolojik tedaviler ortaya çıkmıştır.

2.2. Meme Kanseri

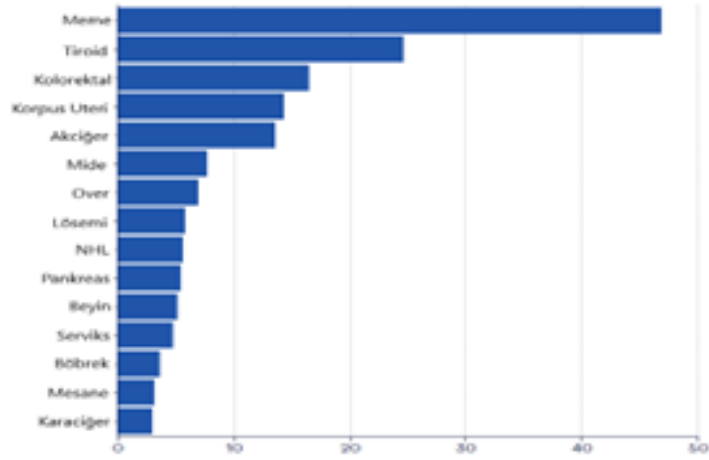
2.2.1. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi

Meme kanseri dünyada en sık görülen kanser türüdür. Tanı ve tarama yöntemlerinin gelişmesi, nüfusun artması ve yaşlı nüfustaki artışla beraber insidansı gün geçtikçe artmaktadır. Sağlık tahminlerine göre MK insidansının 2040 yılında 3,19 milyona; MK’ne bağlı mortalitenin de 1.04 milyona çıkacağı öngörülmektedir.

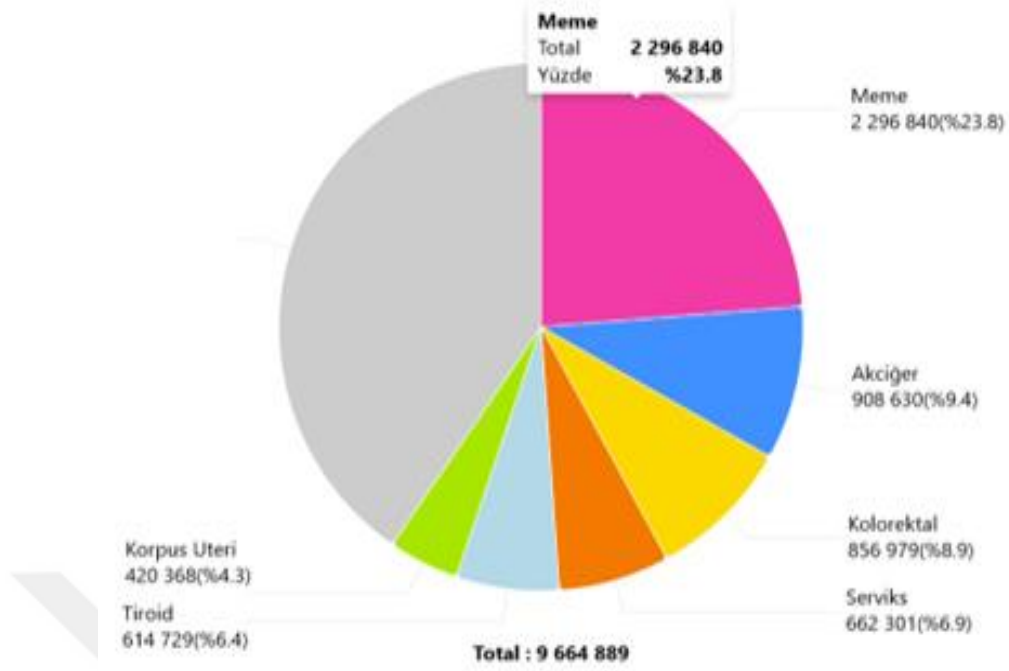
Dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanseri insidansı yüz binde 40 olup her yıl yaklaşık 15 bin kadın MK tanısı almaktadır. Ülkemizde kadınlarda mortaliteye en sık neden olan kanser meme kanseridir. Türkiye Kanser İstatistikleri verilerine göre her yıl görülen MK olgularının yaklaşık %5’i ölüm ile sonlanmaktadır (17).



Şekil 1. Türkiye’de Her İki Cinsiyette Kanser İnsidansı (4)

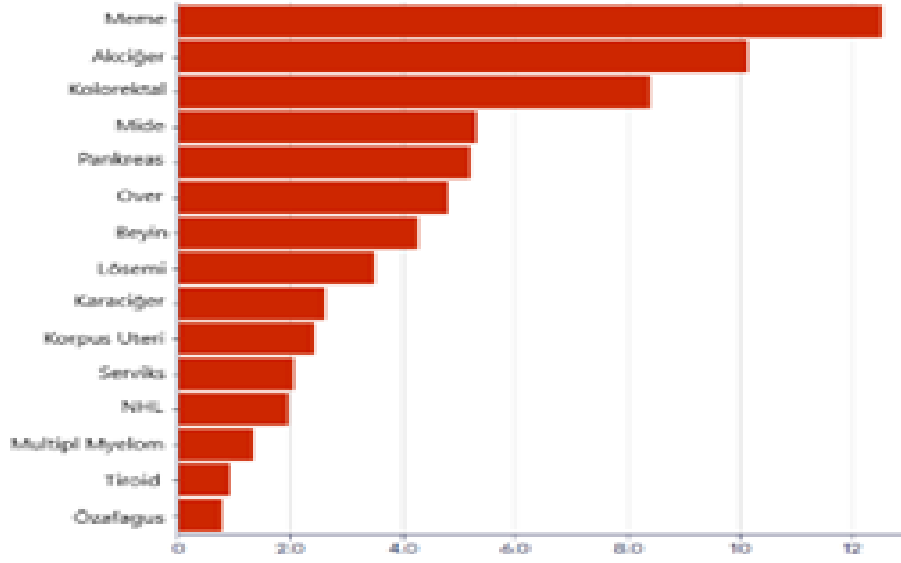


Şekil 2. Türkiye’de Kadın Cinsiyette Kanser İnsidansı (4)



Şekil 3. Dünyada Kadın Cinsiyette Kanser İnsidansı (4)

Gelişmiş ülkelerde tarama programları ile erken tanı alan ve tedavi edilen MK'li hastalarda 5 yıllık survey %90-95'lerdedir (18). Tarama yöntemleri ile hastaların yaklaşık %60-65'ine erken dönemde meme kanseri tanısı konabilmektedir. Bu da meme kanserinin sık görülen kanser tipleri arasında en iyi prognoza sahip olmasını sağlamaktadır (19). Fakat bu durum kanserle yaşam ömrünün uzun olmasına neden olmaktadır. Bu noktada taramayla erken tanı alıp tedavi edilen hastaların hastalık lokalize dönemdeyken tespit edilip tedavi ile kontrol altına alınarak ilerleyen süreçte bireyin yaşam kalitesinin yükseltilmesi amaçlanmalıdır (20).



Şekil 4. Türkiye’de Kadınlarda Mortalite İnsidansı (4)

2.2.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri için birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Kadın cinsiyet en önemli risk faktörüdür. Bunun dışında artmış östrojen maruziyeti ve bu artmış maruziyetin nedenleri arasında olan erken menarş, ilk gebeliğin geç yaşta olması, doğum yapmamış ve emzirmemiş olmak ile geç menapoz gibi faktörler de MK riskini arttırmaktadır (21). Kontrasepsiyon ya da hormon replasman tedavisi amacıyla 10 yıldan uzun süre östrojen kullanımının da riski arttırdığı bilinmektedir (22). Meme kanserinin gelişmesinde hormonlar çok önemli bir faktör olarak öne çıkmaktadırlar. Özellikle östrojenin en önemli risk faktörü olduğu bilinmektedir (23). Östrojenin en çok salgılandığı yer overlerin granüloza hücreleri olup daha az olarak adrenal bez ve plasentadan da salgılanmaktadır. Doğal östrojenler β -östradiol (E2), östron (E1) ve östriol (E3) olup en çok salgılanan β -östradiol (E2), en az salgılanan ise östrondur. Östriol ise östradiol ve östronun karaciğerdeki oksidasyonu ile meydana gelen bir üründür. Fakat gebelik döneminde plasentadan bol miktarda salgılanır. β -östradiolün, östronun 12, östriolün ise 80 katı bir etkiye sahiptir. Meme dokusu üzerinde en aktif

olan ise β -östradioldür. Hormonlar dokular üzerindeki etkilerini hücresel düzeyde reseptör-hormon bileşkesi kurarak göstermektedir. Meme ve uterus östrojen reseptörlerine sahip olmalarından dolayı östrojenin etkilerine açık durumdadır (24-26).

Kadın cinsiyetle beraber yaş da önemli risk faktörleri arasındadır. Yapılan bir çalışmada 0-49 yaş arasında %2 olan MK riski 70 yaşından sonra %6,7 olarak bildirilmiştir (27). Bunların yanında sigara, alkol, östrojen maruziyetini arttırması nedeniyle obezite ve yağlı beslenme de risk faktörleri arasındadır. Obez kişilerde her birim vücut kitle indeksi artışı kanser riskini %2 oranında arttırmaktadır. Çevresel faktörlerden radyasyon maruziyetinin MK riskini arttırdığı bilinmektedir. Kesin olarak kanıtlanmamış olsa da deodorant kullanımının MK riskini arttırabileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur (28).

Ailede MK öyküsü olan kadınlarda riskin arttığı bilinmektedir. Birinci derece akrabasında MK hikayesi bulunanlarda risk %80 artmışken, 2 akrabasında MK hikayesi olması riski 3 kat, 3 veya daha fazla akrabada olması riski 4 kat arttırmaktadır (29). Genetik faktörlerden en önemlisi BRCA-1 ve BRCA-2 mutasyonları olup bu mutasyonların varlığında hayat boyu MK riski %80-85 olup bu kadınlar çok yüksek risk altındadır (30).

2.2.3. Memenin Embriyolojisi

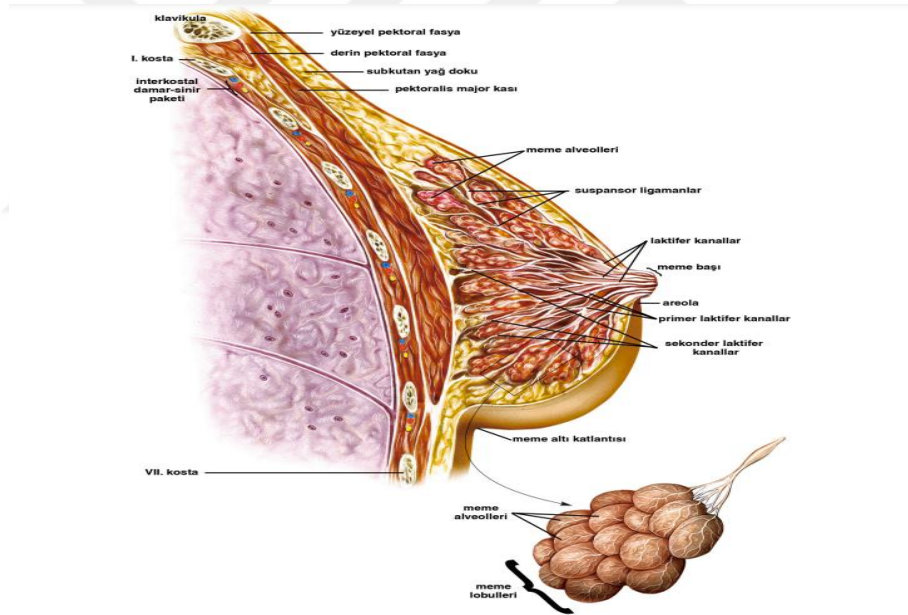
Meme dokusunun gelişiminde ilk olarak fetal hayatın 5-6. Haftasında ektoderm kökenli bir kabartı şeklinde aksilladan inguinal bölgeye kadar bir süt çizgisi şeklinde belirginleşmeye başlar. 9. Haftada süt çizgisi atrofiye uğrar ve geriye sadece pektoral bölgede meme kabartısı kalır. Bu kabartı bazal hücre kaynaklı meme başı tomurcuğunun oluşumu ile sonuçlanır (31).

İlk trimesterde yassı epitel hücreler meme başı tomurcuğuna göç edip duktusları ve lobüler tomurcukların oluşumu için farklılaşır. Mezenkimal hücreler ise meme başı ve areolanın düz kas hücrelerini oluşturacak şekilde farklılaşır. Gebeliğin son trimesterinde epitelyal tomurcuk büyüyerek son haftalarda maternal ve plasental hormonlara karşı duyarlılık kazanarak sekretuar aktivite kazanırlar.

Doğumdan sonraki 1. aya kadar kız ve erkekte meme dokusunda büyüme izlenirken sonrasında anne ve plasenta kaynaklı hormonlar ve prolaktin etkisinin azalmasına bağlı sekretuar aktivite sonlanmakta ve büyüme gerilemektedir. Puberteye kadar alveolar diferansiyasyon gözlenmez ve laktiferöz duktusların oluşumu izlenir (32).

2.2.4. Memenin Anatomisi ve Histolojisi

Meme dokusu anatomik olarak 2. kosta ile 6. kosta arasında lateral tarafta ön-orta aksiller çizgi ile medialde sternum arasında yer alan yüksek derecede özelleşmiş bezlerdir (33). Erişkin bir kadında meme ağırlığı ortalama 150-200 gr olup laktasyonda bu ağırlık 4 katına çıkabilmektedir.



Şekil 5. Memenin Anatomisi ve Lobüler Yapısı (33)

Memede süt salgılayan yapılar asinüsler olup tek katlı, küboidal epitelle döşelidirler. Asinüsler bir kanala sahiptirler ve kanallar birleşerek lobüllerin, onlarda lobların duktuslarını oluşturmaktadır. Yaklaşık 20-40 lobül birleşerel lobu oluşturur. Her lob meme başına laktifer duktus ile ayrı ayrı açılmaktadır. Memenin patolojik

lezyonları en sık terminal lobüler ünitlerden kaynaklanmaktadır ve bu yapılar lobüllerde bulunmaktadır (33).

Memenin santralinde meme başı ve areola kompleksi yer almakta olup meme başından geçen çizgilerle meme üst dış, üst iç, alt dış ve alt iç olmak üzere 4 kadrana ayrılmıştır. Üst dış kadrana daha fazla meme dokusu içermesinden dolayı benign ve malign lezyonların en fazla görüldüğü kadrandır (34,35).

Meme dokusu zengin bir sinir ve damar ağına sahiptir. Memenin interkostal, vertebral venler ve azigos sistemi ile olan ilişkisinden dolayı meme kanserinde kemik sinir sistemi ve akciğer metastazları sık görülmektedir (36). Memenin lenfatik drenajının büyük bir bölümü aksiller lenf nodlarına olurken az bir kısmı internal mamarian ve interkostal lenf nodlarına boşalmaktadır. Meme kanserinde metastazların büyük kısmının lenfatik yolla olduğu bildirilmiştir (35).

2.2.5. Memenin Fizyolojisi

Meme gelişiminde, süt salgısında, emzirmede ve meme hastalıklarında birçok hormon ve büyüme faktörünün etkisi vardır. Bunların başlıcaları; östrojen, progesteron, prolaktin, oksitosin, hüman plasental laktojen(hPL), androjenler, growth hormon (GH), epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü- α (TGF- α), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF)'dür. Bu hormonlar ve büyüme faktörleri etkilerini hipotalamus, hipofiz, plasenta ve overlerin nörohumoral kontrolünde gerçekleştirmektedir.

Östrojenin meme epiteli üzerine proliferatif etkisi vardır. Duktal epitelizasyonun gelişiminde görev alırken aynı zamanda yağ depolama ve meme stromasının gelişiminden de sorumlu olduğu bilinmektedir (37).

Progesteronun meme dokusuna direk bir etkisi yokken indirekt olarak östrojen reseptör sentezini uyardığı bilinmektedir. Progesteron daha çok lobül ve asinusların gelişiminden sorumludur. Ayrıca laktasyonu inhibe etmektedir. Memede progesteron reseptörleri östrojenin kontrolü altındadır.

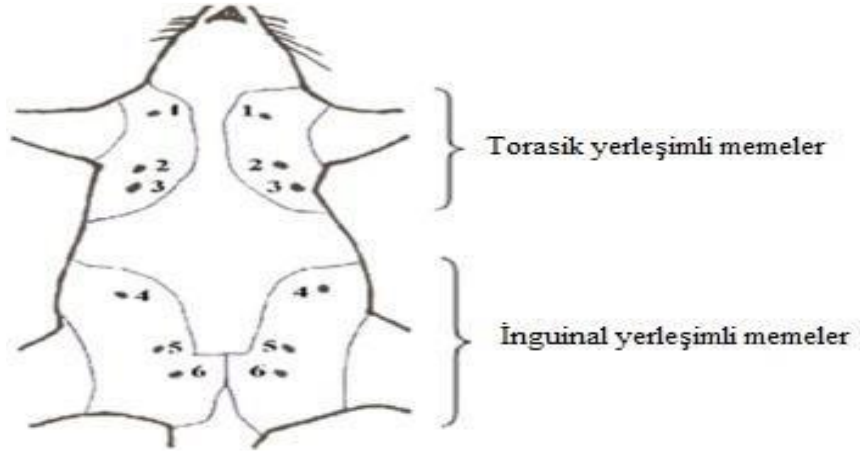
Prolaktin ön hipofizden salgılanan bir hormon olup memede kendi reseptörlerine bağlanarak etki gösterir. Özellikle laktasyon döneminde meme dokusunun büyümesinde ve gelişmesinde etki gösterir. Progesteron ile beraber lobül ve asinusların gelişiminde görev alır ve memede süt sentezi ve sekresyonunu sağlar (38).

Oksitosin hipotalamustan sentezlenir ve doğum esnasında uterusun kasılmasında etkilidir. Ayrıca memede alveolleri çevreleyen mioepitelyal hücrelerde kasılmayı sağlayarak sütün ejeksiyonunu sağlar. Yenidoğanın meme başını emmesi ile oksitosin salınımı uyarılır (39).

Menstrüel siklus dönemindeki hormonal değişiklikler memenin yapısını etkilemektedir. Folikül Stimulan Hormon (FSH) düzeyindeki artış östrojen düzeyinde de artışa neden olup, bu artış FSH üzerinde negatif geri bildirim oluştururken Luteinizan Hormon (LH)'a uyarıcı etki yaratarak pik seviyelere ulaşmasını ve luteal fazın oluşmasını sağlar (40).

2.2.6. Sıçanlarda Meme Anatomisi ve Histolojisi

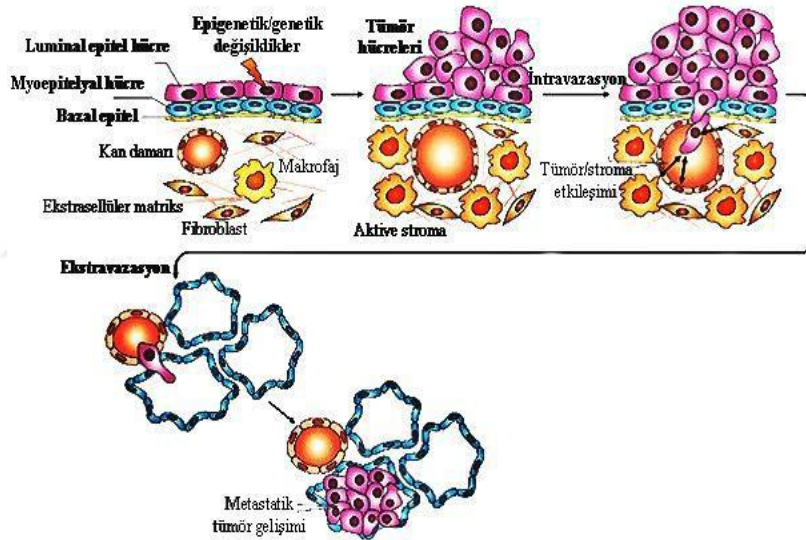
Sıçanlar ve insan meme anatomisi farklılıklar içerir. Dişi sıçanlarda vücudun her iki yanında simetrik şekilde duran 6 çift toplamda 12 meme bulunmaktadır. Bezlerin yarısı torasik yarısı inguinal yerleşimlidir (41). Anatomik farklılıklara rağmen histolojik olarak insan ve sıçan memesi benzerlik göstermektedir. Sıçanlarda da loblarda yerleşmiş sekretuar aktivite gösteren alveol yapıları ve duktuslar mevcuttur.



Şekil 6. Dişi Sıçanlarda Meme Bezlerinin Anatomik Yerleşimi (26)

3. KANSER VE KARSİNOGENEZ SÜRECİ

Kanser, hücrede DNA hasarı sonrası hücrede kontrolsüz büyüme ve çoğalması sonucunda oluşan bir süreçtir. DNA organizmanın hücresel düzeyde yaşamsal fonksiyonlarının düzenlenebilmesi için temel yapı taşıdır. DNA hasarlanması ile sonucu hücre gelişen hasarı tamir edebilir veya apoptozise gider (42). Kanser hücreleri ise bu iki yolu tercih etmeyip büyüme sinyallerine ihtiyaç duymadan otonomi kazanırlar. Ayrıca hiperplaziye engel olan sinyallere duyarsızlaşır ve sınırsız çoğalabilme yeteneği kazanırlar. Bütün bunların yanında anjiogenez, çevre dokulara invazyon ve hematojen yolla veya lenfatikler aracılığıyla metastaz yapma yeteneği kazanırlar (43-46).



Şekil 7. Karsinogenez Basamakları (45)

3.1. Karsinogenez Sürecine Etki Eden Faktörler

3.1.1. Serbest Radikaller ve Etkileyen Faktörler

Serbest radikaller yapılarındaki elektronları çift halinde bağlanmamış diğer moleküllerle elektron alışverişi yapan ve oksidasyona neden olabilecek reaktif moleküllerdir (47). Oksijen de bağ yapmamış çift elektron içerir ancak yörüngeleri

benzer yönde olduğu için toksisiteye sahip olmayan bir maddedir. Okside etme potansiyeli bu nedenle çok düşüktür ancak yok sayılamaz. Bunun nedeni ise oksijenin yüksek yoğunlukta olduğu yerlerde reaktif oksijen moleküllerine dönüşebilmesidir. Bu moleküller süperoksit radikali (O_2^-), hidroksil iyonu ($\cdot OH$), hidrojen peroksit (H_2O_2) molekülü, peroksil radikali ($ROO\cdot$), hipokloröz asit ($HOCl$) ve singlet oksijen (1O_2)dir. Bu moleküllerden singlet oksijen ve hidrojen peroksit eşleşmemiş elektron içermediğinden serbest radikal değildirler ancak reaktiviteleri oksijenden yüksektir (48).

Vücutta reaksiyonlarla oluşan ya da dışardan alınan bu radikaller (49) vücudun savunma mekanizmasında görev alsalar da oksidatif reaksiyonlarla protein, yağ, karbonhidrat ve DNA moleküllerinde hasara neden olabileceği için organizma için zararlı olabilmektedir. Bu sebeple vücutta oksidan ve anti-oksidan sistemler bir denge halinde ilerlemektedir. Dengenin oksidatif stres lehine bozulması protein ve lipid peroksidasyonu ve hücre membran hasarına neden olabilmektedir. Ayrıca DNA'daki hasar ve onkojen moleküllerin aktivasyonu hücre bölünmesi ve çoğalmasında hasara neden olarak kontrolsüz büyüme ve çoğalmaya neden olarak kanser oluşumunda önemli bir rol almaktadır (47).

Hücrelerde bahsettiğimiz hasarın meydana gelmesinde en etkili ROS'un hidroksil iyonu çalışmalarla gösterilmiştir (50,51). Ayrıca artan radikal düzeyinin karsinogenez sürecini belirgin düzeyde hızlandırdığı da çalışmalarda belirtilmiştir (52). Hücrede bu durumdan başlıca etkilenen mitokondri olup hem DNA hem de RNA transkripsiyonunda ve diğer tüm organel fonksiyonlarında hasara neden olabilmektedir (53,54).

3.2. Lipid Peroksidasyonu ile İlgili Parametre

3.2.1. Malondialdehit (MDA)

ROS'lar hücrenin membranına yerleşmiş kolesterol ve doymamış yağ asitleriyle çeşitli reaksiyonlara girerler. Bunun sonucunda peroksiteler, malondialdehit (MDA) gibi çeşitli peroksidasyon metabolitleri oluştururlar. Bu reaksiyonlar doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımıdır. Bu şekilde meydana gelen hücre zarındaki hasar

irreversibldır (55). Bu reaksiyonlarla oluşan moleküller lipid radikali özelliğindedir (56,57).

Bu reaksiyonun son ürünü olan MDA hücresel düzeyde lipid peroksidasyonunu göstermede sık kullanılan bir moleküldür. MDA molekülü hücre zarından difüzyonla rahatça geçebilmekte ve hücre zarında MDA artışı sonucunda toksik ve karsinojenik etkilere neden olabilmektedir (58,59).

Oksidatif hasarın bir sonucu olarak oluşan MDA'nın mutasyon yapma etkisi DNA'nın özellikle de nitrojen yapıdaki bazlarla reaksiyona girmesiyle gerçekleştirmektedir. DNA yakınındaki alanlarda üretilen hidroksil molekülünün DNA'daki bazı bazlarda oksidatif stres yaratarak harabiyete neden olabilmektedir. Ek olarak bazı gen mutasyonlarına sebep olup transkripsiyonel değişiklikler yaratarak hücrenin normal işleyişine zarar verebilmektedir. Tüm bunların dışında hidroksil molekülünün DNA ile girdiği reaksiyonlar sonucunda kimyasal karsinogenez meydana gelir ve çok basamaklı karsinogenez sürecinde ROS'un etkisini belirten bulgulara görülür (60,61).

MDA, ölçülebilen bir üründür. Oksidatif streste CAT ve SOD enzimlerinin yetersiz kaldığı durumlarda SOR'un etkilerini hücre membranında ve organel düzeyinde lipid peroksidasyonunu ile göstermektedir. MDA, oksidatif stresin spesifik bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (62). Meme kanseri tanısı almış kadınlarda plazmada MDA düzeylerinin yüksek olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur (63).

3.2.2. Antioksidanlar ve Etkileyen Faktörler

Hücre hasarının önlenmesinde vücudumuzdaki ROS düzeylerinin belirli değerlerde tutulması büyük önem taşımaktadır. Bu değerlerin metabolik dengenin bozulmasına neden olabilecek düzeyde artması ile anti-oksidan savunma sistemlerinin devreye girmesine neden olmaktadır. Bu moleküller devreye girdi zaman organizmada enzimatik veya enzimatik olmayan moleküllerin etkisiyle birçok şekilde ROS seviyesinde azalmayı sağlamaktadır (64,65).

Bu antioksidan sistemde enzimatik görev yapan moleküllerin en önemlileri katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-R), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-s-transferaz (GST) ve hidroperoksidazdır. Bunlar metabolizmadaki ROS'ların nötrlenmesinde öncelikli olarak sorumludur.

Enzim vasfında olmayan anti-oksidatif moleküller ise metabolik yolla (endojen olarak) ya da dışarıdan besinlerle alınabilenler olarak iki gruba ayrılmaktadır. Vücudumuzdaki anti-oksidan moleküller transferrin, bilirubin, melatonin, lipoik asit, glutatyon-L-arjinin, koenzim Q-10, metal bağlayıcı proteinler olarak örneklendirilebilir. Vücutta üretilmeyen ve dışarıdan aldıklarımız ise A, E ve C vitaminleri, çinko, selenyum ve mangan gibi elementler, omega 3-6 yağ asitleri, flavonoidler ve bazı fenolik moleküllerdir.

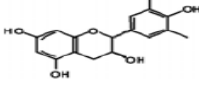
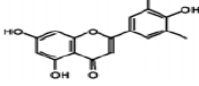
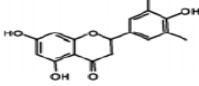
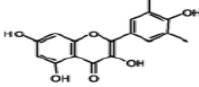
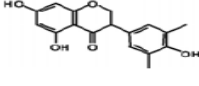
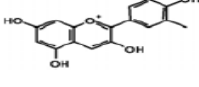
Hem endojen hem de eksojen yolla alınan bu anti-oksidan moleküller vücutta oksidan maddelerin arattığı oksidatif stresi önleyerek kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığın engellenmesinde etkili olabilmektedir (66).

3.3. Meme Kanserini Önlemede Fitoterapinin Yeri ve Polifenol Bileşikler

Nutra-sötik terimi ilk olarak Stephen DeFelice tarafından 1989 yılında beslenme ve ilaç kelimelerinin bir araya gelmesiyle kullanılmıştır. Literatüre girmesinden sonra meme kanserinin önlenmesinde ve koruyucu etkinliği kapsamında birçok bitkisel gıda ürünü çalışmalarda kullanılmış ve sonuç olarak da hem kanseri önlemede hem de kür sonrasında nükslerin önlenmesinde etkili oldukları gösterilmiştir (67,68).

Lignanlar, kumarinler, askorbik asit, flavonoidler, fitoöstrojen ve steroller fitoterapötik olarak kullanılabilen önemli ajanlardır. Gerek diyetle aldığımız gerekse diyetle almadığımız bu moleküller bulunan biyoaktif fitokimyasal maddelerin oksidatif stresi önleyerek, inflamasyonu baskılayarak, apoptozis ve neovaskülarizasyon ile hücrede önemli sinyal yollarının modüle ederek meme karsinogenezinde tümöral hücreleri in-vitro olarak ortadan kaldırdığı ve kanser gelişimini önlediği, ayrıca da in-vivo çalışmalarda tümör büyümesini engellediği çalışmalarda gösterilmiştir (69).

Yaygın olarak bulunan flavonoidlerin temel kimyasal yapısı ve başlıca besin

Flavonoid Alt Grubu	Flavonoid Örnekleri	Besin Kaynağı
Flavanoller 	EGCG, Epigallocatekin, Katekin, Epikatekin	Çikolata, fasulye, çay, kırmızı şarap, elma, kiraz, kayısı
Flavonlar 	Luteolin, Apigenin, Krisin	Kapya biber, kekik, kereviz, maydanoz
Flavanonlar 	Naringenin, Hesperidin, Eriodiktol	Portakal, greyfurt
Flavonoller 	Kuersetin, Mirisetin, Kaempferol, Rutin	Soğan, elma, kiraz, brokoli, domates, meyveler, çay, kırmızı şarap, pırasa
İzoflavonoidler 	Genistein, Daidzein	Soya fasulyesi, baklagiller
Antosiyanidinler 	Pelargonidin, Siyanidin, Malvidin	Ravent, kiraz, çilek, kırmızı şarap

Şekil 8. Flavonoid Grubu Üyeleri (69)

3.4. DMBA (7,12 dimetilbenz[a]antrasen)

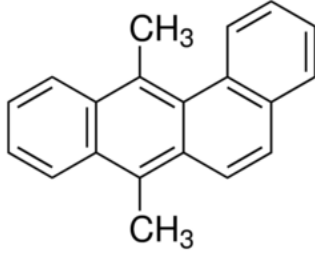
Polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) maligniteye neden olabilecek moleküller olduğu ilk olarak 1921 yılında gösterilmiştir. Sonrasında da özellikle bu moleküllerin karsinogenezin başlangıcında etkisi olduğu gösterilmiştir (70).

PAH'lar birçok doku ve hayvan türünde maligniteye neden olabilmektedir. Bunu immun sistem hasarı yaratarak immun baskılanma ve immunotoksik etki yaparak ve serbest radikaller oluşturarak yaparlar (71).

7,12-Dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) (Şekil 3) bu gruptaki önemli bir kanserojen moleküldür. Birçok deneysel meme ve cilt kanseri modelinde kanser yaratmak

amacıyla kullanılmıştır. Etkisi indirekt olmakta ve bu etki sitokrom p450 enzimiyle metabolize edilerek diol epoksit ve hücre hasarına neden olan reaktif oksijen radikallerine dönüşümeyle meydana gelmektedir (73).

Bu maddeler etkilerini çeşitli oksijen radikalleri yoluyla DNA'nın yapısı bozmak ve lipid peroksidasyonuna neden olarak gösterirler (74).



Şekil 9. DMBA (7,12 dimetilbenz[a]antrasen) (72)

4. MATERİYAL ve METOD

4.1. Etik Kurul Onamı ve Proje Desteğinin Alınması

Çalışmamızdaki hayvan deneyleri için Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'nın (DÜHADEK) 25/05/2023 tarihli toplantısında kararlaştırılan 2023/13 protokol numarası ile izin alınmıştır. Çalışmanın finans desteği Dicle Üniversitesi Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nce (DÜBAP), TIP.24.007 proje numarası ile sağlanmıştır. Çalışmanın deneysel bölümü Dicle Üniversitesi Sabahattin Payzın Araştırma Merkezi'nden (DÜSAM) temin edilen sıçanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın histolojik olarak doku takip ve analizleri Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Araştırma Laboratuvarında; biyokimyasal analizleri Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

4.2. Meme Kanserinin Oluşturulması ve Kimyasalının Temini

Laboratuvar ortamında kanser oluşturmak için genellikle iki kimyasal kullanılır. Bunlardan biri 7,12-dimetilbenza-antrasen (DMBA) iken, diğeri N-nitrozo-N-metilüre (NMU)'dur. DMBA sentetik bir polisiklik aromatik hidrokarbon olup, meme bezinin destekleyici stroması gibi yağ açısından zengin dokularda birikir (75). DMBA'nın hem karsinogenik hem de immünsüpresor (bağışıklık baskılayıcı) özellikleri olup, yapılan çalışmalarda meme kanserini başarılı şekilde indüklediği gösterilmiştir (76,77). Çalışmamız bizde bu kimyasallardan DMBA'yı kullanmayı tercih ettik.

DMBA genellikle ya tek doz ya da tekrarlanan dozlarda intravenöz (i.v.), intraperitoneal (i.p.) ve gavaj yardımıyla oral yollarla verilebilir. Yapılan çalışmalarda DMBA uygulamasından yaklaşık 50-140 gün sonra tümörün geliştiği gözlenmiştir (78,79).

Çalışmamızda meme kanseri oluşturmak için Sigma-Aldrich (Germany) firmasından temin edilen DMBA kullanıldı. Gülbahçe Mutlu ve ark. çalışmalarında kullandığı model baz alınarak 80 mg/kg dozunda tek doz olarak i.p. uygulandı (80).



Resim 1. DMBA'nın İntraperitoneal Uygulanması

4.3. Medicago Sativa Özütünün Hazırlanması ve Uygulanması

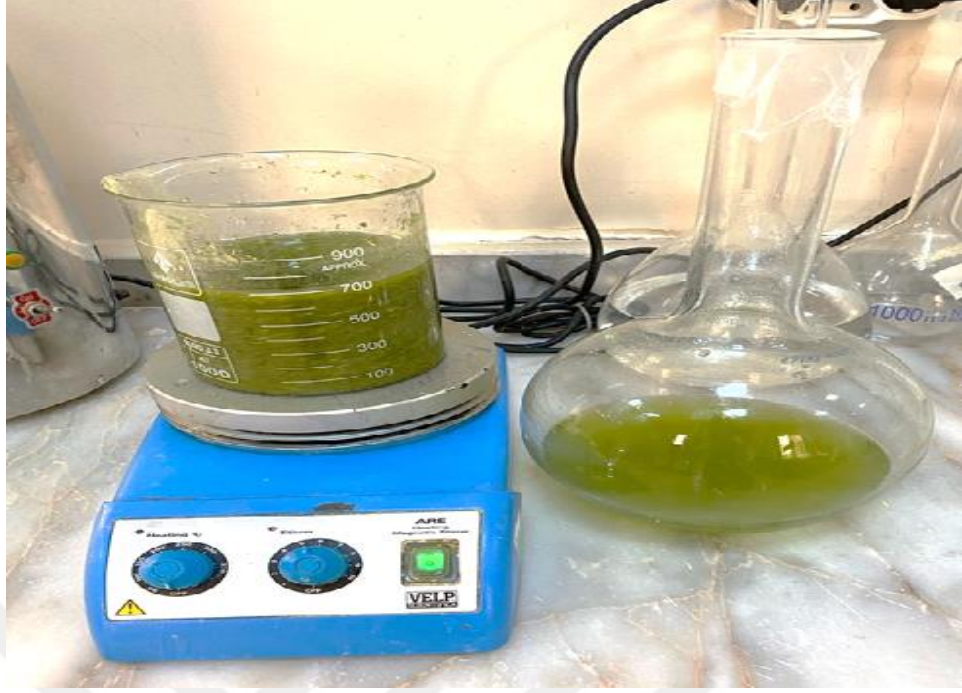
Çalışmaya başlamadan önce doğadan toplanan Medicago sativa bitkisi Diyarbakır Tarım Meslek Yüksekokulu, Organik Tarım Bölümü hocası Prof. Dr. Özlem TONÇER'e teyit ettirilerek doğruluğu onaylandı. Medicago sativa bitkisi özütlerinin hazırlanması için İrtem Kartal ve ark. kullanmış oldukları yöntem kullanıldı (81).

Yaklaşık 2 kg ağırlığında Medicago sativa bitkisi yaprakları direk olarak gün ışığında tutulmadan kurutularak toz formuna getirildi. Sonrasında hassas terazi yardımıyla tartılarak her 5 gr. Medicago sativa bitkisi tozu için 100 cc absolut alkol (%100 Ethanol, Merck, Germany) eklendi. Manyetik karıştırıcı üzerinde karışım 12 saat karıştırıldıktan sonra 12 saat dinlendirildi (Resim 1). Mevcut işlem aynı şekilde 3 kez tekrarlanarak üst kısımdaki sıvı balon joje içerisinde biriktirildi (81,82) (Resim 2). Son olarak toplanan Medicago sativa özütü+Ethanol karışımı Dicle Üniversitesi

Eczacılık Fakóltesi Farmakognazi Araştırma laboratuvarında rotari evaporatör cihazı (katalog no: HEID_31011, Heidolph, Schwabach, Germany) ile Ethanol uzaklaştırılarak sadece Medicago sativa özütü elde edildi (Resim 3). Elde edilen Medicago sativa özütü günlük 250 mg/kg/doz ile 10 hafta boyunca gavaj yardımıyla oral olarak uygulandı (83,84).



Resim 2. Medicago sativa bitki tozunun manyetik karıştırıcı içerisinde karıştırılması.



Resim 3. Medicago sativa bitki özütünün üstte kalan alkol+özüt kısmının balon joje içerisinde toplanması.



Resim 4. Medicago sativa tozlarının alkolik özütünün rotari evaporatör ile ayrıştırılması.

4.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda ortalama ağırlıkları 200-250 gram (g) arasındaki 28 adet Wistar Albino cinsinde dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar çalışma süresince rahatça hareket edebilecekleri kafeslerde barındırılıp, yem ve su kısıtlaması yapılmaksızın ad libitum olarak beslendi. Sıçanların oda sıcaklıkları (22 ± 3 °C) olarak, 12 saat aydınlık/karanlık periyodunda barındırılacak şekilde belirlendi. Sıçanların günlük fiziki görüntüleri ve davranışsal farklılıkları her gün gözlemlendi ve kayıt altına alındı. Sıçanlar tek tek tartılarak ağırlıklarına uygun olarak ilaç doz hesaplamaları yapıldı ve hesaplanan dozlar uygulandı.

Hazırlanan *Medicago sativa* özütleri günlük 250 mg/kg doz ile gavaj yardımıyla oral olarak verilirken (82,83), DMBA ise 80 mg/kg dozunda tek doz olarak i.p. uygulandı (80). 10 haftanın sonunda makroskopik olarak tümörün gelişmediği tespit edildi. DMBA alan grupların meme dokuları rastgele alınarak mikroskopik olarak incelendi.

Deneysel aşamada hayvanlar etik değerlere bağlı kalıp gerekli protokollere uyularak çalışmaya başlamadan önce bütün sıçanlara 90 mg/kg Ketamin hidroklorür (Ketalar; Prizer, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg Xylazine (Rompun; Bayer, İstanbul, Türkiye) i.p. uygulanarak genel anestezi sağlandı. Sedasyon kontrolü cilt veya parmak kıstırma hareketine bakılarak düzenli aralıklarla yapıldı.

Grup 1 (n=7): Kontrol/Sham grubu, bu gruptaki ratlara serum fizyolojik 1 cc gavaj yardımıyla oral verildi. 10. haftanın sonunda kalpten ekzanguinasyon ile kan alınıp hayvanlar sakrifiye edildi. Kanlar santrifüj edilip, serum kısmına ayrıldıktan sonra -80 °C’ de saklandı. Uygun kit temini yapıldıktan sonra, değerlendirilmesi için biyokimya laboratuvarına gönderildi. Random alınan meme dokuları ise %10’luk formaldehit solüsyonuna alındıktan sonra, histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için Histoloji/Embriyoloji laboratuvarına gönderildi.

Grup 2 (n=7): DMBA ile meme kanseri oluşturulan gruptaki sıçanlara, 80 mg/kg dozunda DMBA tek doz olarak i.p. verildi ve 10 hafta sonra hayvanlar ekzanguinasyon ile sakrifiye edildi. Kanlar santrifüj edilip, serum kısmına ayrıldıktan sonra -80 °C’de

saklandı. Uygun kit temini yapıldıktan sonra, değerlendirilmesi için biyokimya laboratuvarına gönderildi. Random alınan meme dokuları ise %10'luk formaldehit solüsyonuna alınarak, histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için Histoloji/Embriyoloji laboratuvarına gönderildi.

Grup 3 (n=7): MS grubu, Medicago sativa özütleri günlük 250 mg/kg doz ile gavaj yardımıyla oral olarak uygulandı. 10. haftanın sonunda kalpten ekzanguinasyon ile kan alınıp hayvanlar sakrifiye edildi. Kanlar santrifüj edilip, serum kısmına ayrıldıktan sonra – 80°C'de saklandı. Uygun kit temini yapıldıktan sonra, değerlendirilmesi için biyokimya laboratuvarına gönderildi. Random alınan meme dokuları ise %10'luk formaldehit solüsyonuna alındıktan sonra, histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için Histoloji/Embriyoloji laboratuvarına gönderildi.

Grup 4 (n=7): DMBA+ MS grubunda ise, DMBA 80 mg/kg dozunda tek doz olarak i.p. uygulandıktan 24 saat sonra Medicago sativa 250 mg/kg doz ile oral yolla vermeye başlandı. 10. haftanın sonunda kalpten ekzanguinasyon ile kan alınıp hayvanlar sakrifiye edildi. Kanlar santrifüj edilip, serum kısmına ayrıldıktan sonra – 80 °C'de saklandı. Uygun kit temini yapıldıktan sonra, değerlendirilmesi için biyokimya laboratuvarına gönderildi. Random alınan meme dokuları ise %10'luk formaldehit solüsyonuna alındıktan sonra, histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için Histoloji/Embriyoloji laboratuvarına gönderildi.

4.5. Biyokimyasal Analizler

Sıçanlardan elde edilen kanlar EDTA'lı tüplere aktararak 3000 rpm hızda 10 dakika (dk) santrifüj edildi. Elde edilen serum kısımları iki ependorf tüpüne alındı. Tüplerden birinden Toplam Antioksidan Statüsü (TAS) ve Toplam Oksidan Statüsü (TOS) düzeylerine bakılırken, ikinci ependorf tüpünden ise Malondialdehit (MDA) düzeylerine bakıldı. Biyokimyasal incelemelerin tamamı Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Biyokimya Laboratuvarında yapıldı.

4.6. Malondialdehit (MDA) Analizi

Hücre membranındaki lipidlerin peroksidasyonunun son ürünü olan MDA seviyesini belirlemek için kullanılan bu yöntemde MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile girdiği reaksiyon baz alınmaktadır. Bu yöntemde temel mekanizma, pH'sı 3,4 olan oksijenize bir alanda numunenin tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95 °C'de inkübasyonu sonucunda meydana gelen ürün renginin 532 nm'de ölçülmesidir. Oluşan renkli kompleks, lipid peroksidin sekonder ürünü olan malondialdehite (MDA) aittir. Serum örneklerinden Malondialdehit (MDA) analizi için Bioassay Technology Laboratory (Shanghai, Çin) firmasından temin edilen rat uyumlu ELISA kitler (Cat.No: E0156Ra) kullanılarak ölçüm yapılmış ve sonuçlar nmol/ml olarak verilmiştir (85,86).

4.7. Total Antioksidan Statüsü (TAS) Analizi

Bu yöntemde temel olarak serbest radikaller karşısında canlı hücrenin meydana getirdiği anti-oksidan marj ölçülür. Çalışmamızda bütün gruplarda yer alan ratlardan elde edilen venöz kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınarak, 3000/dak devirde 10 dakika boyunca +4°C'de santrifüjlendi. Ayırıştırılan plazma numuneleri daha sonra çalışılmak üzere -80°C'de bekletildi. Çalışma öncesinde hem kitlerin hem de serum numunelerinin oda sıcaklığına gelmesi beklenerek çalışmaya hazır hale getirildi. Serum örnekleri ve kitler de çalışma öncesi oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi. Alınan numunelerin TAS miktarları Rell Assay Diagnostics (Gaziantep, Türkiye) kitiyle, µmol Trolox Equivalent/L (µmol/L ölçü birimi kullanılarak ve okuma cihazı olarakta biyokimyasal oto-analizör (AU5800; Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, ABD) spektrofotometrik olarak kaydedildi. Ölçümler Erel yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (87).

4.8. Total Oksidan Kapasitesi (TOS)

Çalışmamızda bütün gruplarda yer alan ratlardan elde edilen kan örnekleri EDTA'lı tüplere konularak, 3000/dak devirde +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Ayırıştırılan plazma numuneleri daha sonra çalışılmak üzere -80°C'de bekletildi. Çalışma öncesinde hem kitlerin hem de serum numunelerinin oda sıcaklığına gelmesi beklenerek çalışmaya hazır hale getirildi. Elde edilen serum numunelerinde TOS

ölçümü Rel Assay Diagnostic (Gaziantep, Türkiye) kitiyle yapıldı. TOS'un ölçü birimi $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent /L olarak belirlendi ve okuma cihazı olarak biyokimyasal oto-analizör (AU5800; Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, ABD) cihaz kullanıldı. Ölçümler Erel tarafından geliştirilen yöntem ile gerçekleştirildi (88).

4.9. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

Oksidatif Stres İndeksi (OSI) ise TOS sonuçlarının TAS sonuçlarına bölünmesiyle hesaplandı ve birimsiz şekilde kayıt altına alındı (15).

4.10. Rutin Histolojik Takip

Rastgele seçilerek alınan meme dokuları rutin histolojik takibe alındı. %10 formaldehit'te 24 saat tespitten sonra 1 gece akar su altında bekletildi. Doku takibinin detaylı açıklaması Tablo-1 de verilmiştir. Parafin bloklara gömüldükten sonra mikrotom (katalog no: Leica RM2265, Wetzlar, Germany) yardımıyla pozitif şarjlı lam üzerine alınan meme dokularından 5 μm kalınlığında kesitler alındı. Histokimyasal ve immunohistokimyasal boyamalarla incelendi.

Tablo 1. Histolojik doku takibinin aşamaları.

İşlem sırası	Uygulanan işlem	Uygulanan süre
1	%70 'lik Alkol	120 dk
2	%80 'lik Alkol	90 dk
3	%96 'lık Alkol I	30 dk
4	%96 'lık Alkol II	30 dk
5	%100 'lük Alkol I	30 dk

6	%100 'lük Alkol II	30 dk
7	Xylene I	25 dk
8	Xylene II	25 dk
9	Yumuşak parafin + Xylene	45 dk
10	Yumuşak parafin	60 dk
11	Yumuşak parafin + Sert parafin	90 dk
12	Sert Parafin	180 dk
13	Bloklara Gömme	-

4.11. Histokimyasal incelemeler

Deney sonunda rastgele olarak seçilen meme dokularında gelişen histopatolojik değişiklikleri belirlemek için Hematoksilen & Eozin (H&E) boyası ile boyandı. Hematoksilen & Eozin (H&E) boyama protokolü Tablo-2’de detaylı olarak sıralandı. Dokularda gelişen; vaskülarizasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, memede apoptotik-dejeneratif bulgular ve pleomorfizm skorlandı (90,91). Lezyonda meydana gelen şiddetin skorlaması aşağıdaki şekilde belirlendi:

0: Bulgu yok (%0)

1: Çok hafif (%1-15)

2: Hafif (%16-30)

3: Zayıf orta (%31-45)

4: Orta (%46-60)

5: Şiddetli (%61-75)

6: Çok şiddetli (%76-100).

Tablo 2. Hematoksilen & Eozin (H&E) boyama işleminin aşamaları

İşlem sırası	Uygulanan işlem	Uygulanan süre
1	Xylene I	30 dk
2	Xylene II	30 dk
3	%100'lük Alkol I	5 dk
4	%100'lük Alkol II	5 dk
5	%96'lık Alkol	5 dk
6	%90'lık Alkol	5 dk
7	%80'lik Alkol	5 dk
8	%70'lik Alkol	5 dk
9	Distile su	7 dk
10	Harris Hematoksilen Solüsyonu	6 dk
11	Çeşme suyu	5 dk
12	%1 alkolik Eozin	3 dk
13	% 70'lik Alkol	1 dk

14	%80'lık Alkol	1 dk
15	%90'lık Alkol	1 dk
16	%96'lık Alkol	1 dk
17	%100'lük Alkol I	1 dk
18	%100'lük Alkol II	1 dk
19	Xylene I	30 dk
20	Xylene II	30 dk
21	Entellan ile kapatma	-

4.12. İmmunohistokimyasal incelemeler

Apoptozis hücre proliferasyonu, fizyolojik ve patolojik koşullarda oldukça önemli rol oynayan bir durumdur. Organizmanın gelişmesinde ve homeostazinin sağlanmasında gerekli temel bir olaydır (92,93). Proapoptotik faktör olan Bax ile antiapoptotik faktör olan Bcl-2 gibi indüksiyonlar apoptozu dengeler (94,95). Kanserde apoptoz sisten proteazlar grubunda olan kaspazların aktivasyonu sonucunda oluşur (96,97). Kaspazlar hücrenin apoptoza gitmesini engelleyen ve apoptozisi inhibe eden molekülleri ortadan kaldırıp hücrenin apoptozis yoluna girmesini sağlarlar (98). Bcl-2 ailesi hücrel apoptoz mekanizmasında en etkili proteinlerdir. Bu grupta hem apoptotik hem de anti-apoptotik moleküller yer almaktadır (98,99). Hücrede apoptozun meydana gelip gelmeyeceği Bcl-2/Bax oranına bağlıdır (100).

Deney sonunda rastgele seçilerek alınan meme dokularından alınan 5 µm kesitler immunohistokimyasal değişiklikleri incelemek amacıyla proapoptotik ve antiapoptotik proteinler olan Bax ve Bcl-2 primer antikoları ile boyandı.

İmmunohistokimyasal boyama işleminin basamakları Tablo-3'te detaylı olarak açıklandı.

Tablo 3. İmmunohistokimyasal boyama işleminin aşamaları

İşlem Sırası	Uygulanan İşlem	Uygulanan Süre
1	Xylene I	30 dk
2	Xylene II	30 dk
3	%100'lük Alkol I	5 dk
4	%100'lük Alkol II	5 dk
5	%96'lık Alkol	5 dk
6	%90'lık Alkol	5 dk
7	%80'lik Alkol	5 dk
8	%70'lik Alkol	5 dk
9	Distile su	7 dk
10	Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonunda mikrodalga fırında ısıtma	3x6 dk
11	Tamponlanmış fosfat salin (PBS)	3x5 dk
12	%3' lük hidrojen peroksit	20 dk
13	PBS	3x5 dk
14	Ultra V Block	7 dk
15	Primer antikor +4 °C'de	18 saat

16	PBS	3x5 dk
17	Anti-rabbit sekonder antikor	30 dk
18	PBS	3x5 dk
19	Streptavidin peroksidaz	30 dk
20	PBS	3x5 dk
21	3,3'diaminobenzidin e kromojen	Reaksiyon gözlemi
22	PBS	3x5 dk
23	Gill Hematoksilen	40 sn
24	Çeşme suyu	5 dk
25	Artan alkol serileri	1 dk
26	Xylene I	30 dk
27	Xylene II	30 dk
28	Entellan ile kapatma	

4.13. İstatistiksel Analiz

G*Power (sürüm 3.1.9.4) testi yapılarak etki büyüklüğü hesaplandı. Bu çalışmada etki büyüklüğü 0.70 (Cohen kriterleri kullanılarak), alfa=0,05 ve güç 0,8 alınarak gerekli olan minimum örnek sayısı n=28 olarak belirlendi. Verilerin istatistiksel analizleri SPSS for Windows version 20 (USA) istatistik programında yapıldı. Verilerin normallik analizleri Shapiro Wilk testi ile yapıldı. Sonuca göre kriter olarak basıklık (kurtosis) ve çarpıklık (skewness) sonuçlarının -1,5 ve +1,5 arasında bulunması ve Q-Q grafiği kullanılarak normallik analizi yapıldı. Normal dağılım gösteren ölçümlere Tek Yönlü Varyans (ANOVA) Analizi uygulandı. Normal dağılım

göstermeyen değerlere ise non-parametrik testlerden Kruskal Wallis-H testi uygulandı. Kruskal Wallis-H testinin anlamlı olması durumunda ise gruplar arası karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi ile kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ değeri durumunda anlamlı olarak kabul edildi. Ortaya çıkan sonuçlar ise ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi.

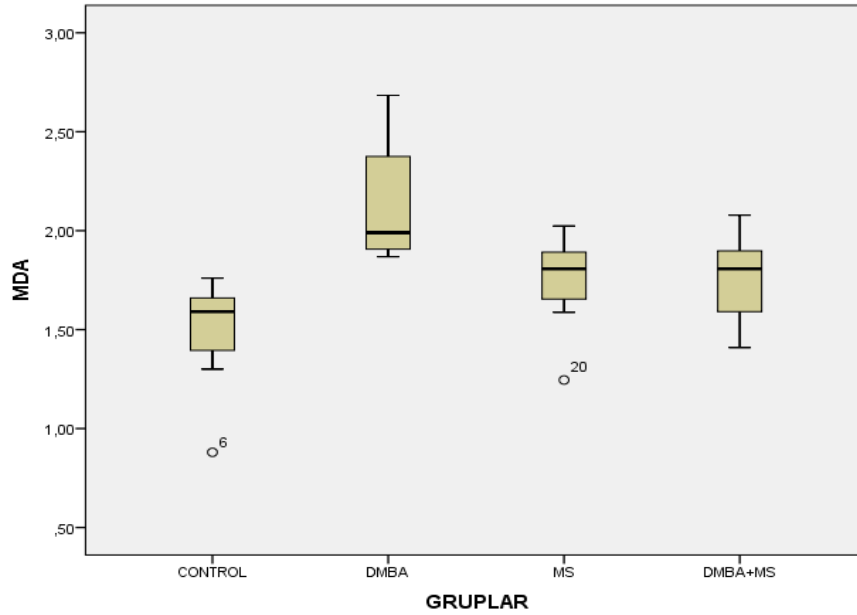


5. BULGULAR

5.1. Biyokimyasal Analizler

5.1.1. Kan Serum Malondialdehit (MDA) Değerlerinin Ölçülmesi

Serum MDA düzeyleri hesaplandığında en yüksek ortalamanın DMBA grubunda olduğu ve DMBA+MS grubunun ise anlamlı şekilde daha düşük olduğu izlendi ($p<0.05$). MS grubu ile DMBA+MS grubu kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmedi ($p>0.05$). DMBA ile birlikte MS uygulanması serum MDA düzeylerini olumlu yönde etkilemişti. Bütün grupların MDA ortalamalarının grafiği Şekil 1’de ve ortalamaları ise Tablo 1’de gösterildi.

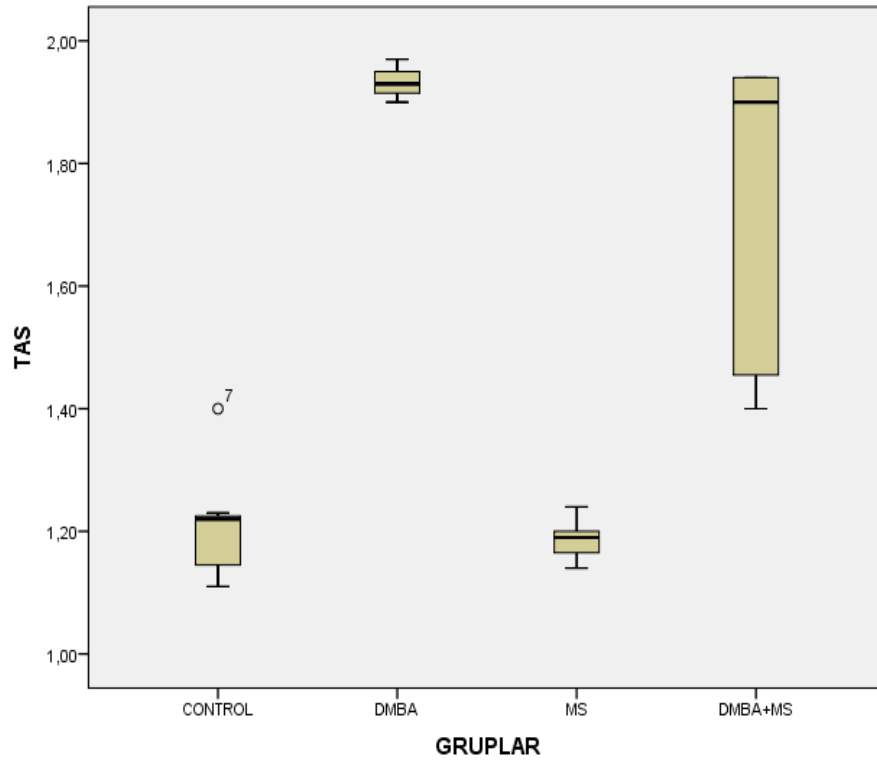


Şekil 10. Serum MDA değerlerinin istatistiksel analizi sonucu oluşan ortalamalarının grafiği

5.1.2. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS)

Bütün çalışma gruplarının istatistiksel analizinde TAS değerleri karşılaştırıldığında; DMBA grubu ile DMBA+MS grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı izlendi ($p>0.05$). Ancak DMBA+MS grubu ile hem kontrol hem de MS

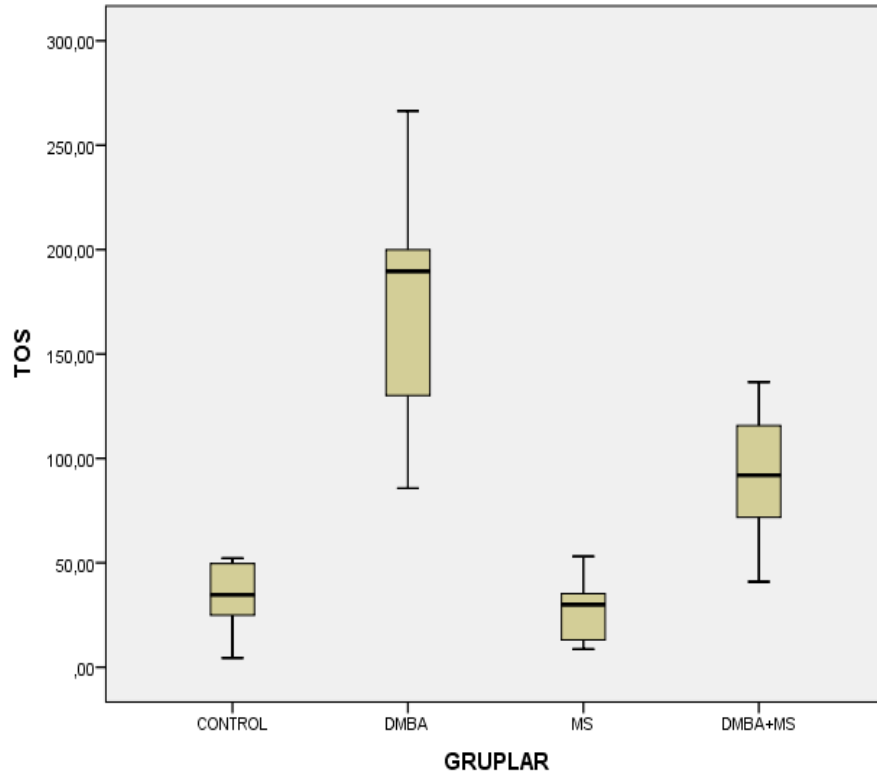
grubu arasında ise anlamlı fark olduğu izlendi ($p<0.05$). En yüksek TAS ortalaması DMBA grubunda izlenirken, en düşük ortalamanın MS grubunda olduğu görüldü. Çalışmamızın TAS analizlerinden istatistiksel olarak beklenen DMBA grubu ve DMBA+MS grubu arasında anlamlı veri elde edilemedi. Bütün grupların TAS ortalamalarının grafiği Şekil 2’de ve ortalamaları ise Tablo 1’de gösterildi.



Şekil 11. Serum TAS değerlerinin istatistiksel analizi sonucu oluşan ortalamalarının grafiği.

5.1.3. Total Oksidan Kapasitesi (TOS)

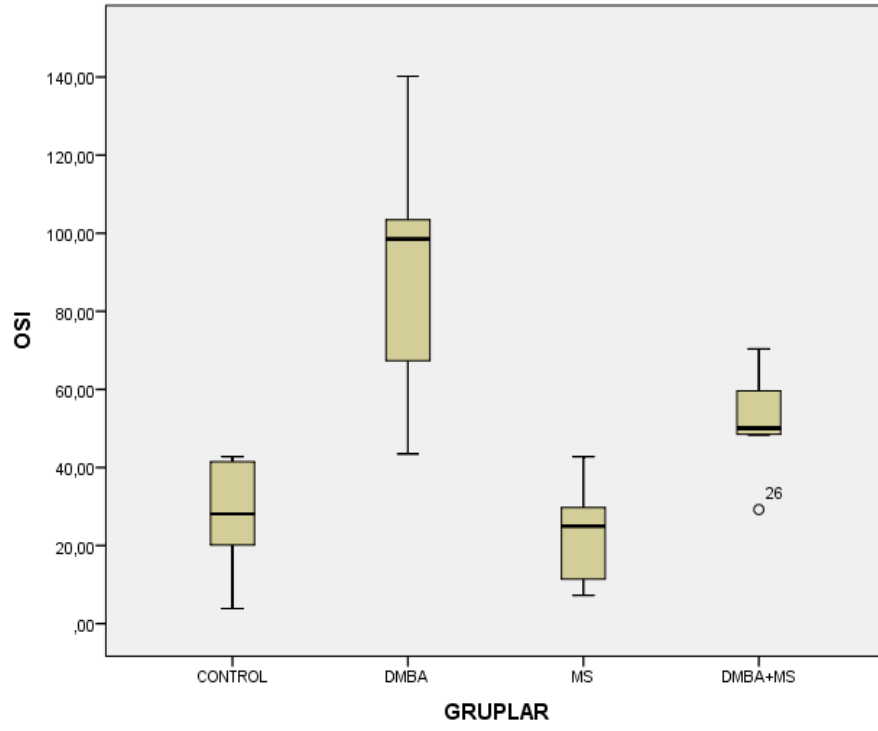
Bütün çalışma gruplarının istatistiksel analizinde TOS değerleri karşılaştırıldığında; DMBA grubu ile DMBA+MS grubu arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0.05$). DMBA grubunun serum TOS değerleri en yüksek düzeyde izlenirken, DMBA+MS grubunun ortalaması DMBA grubuna kıyasla anlamlı derecede daha düşük izlendi. Çalışmamızda beklenen TOS analizlerinin detaylı gruplar arası karşılaştırması Tablo 1’de ve ortalamalarının grafiği Şekil 3’te gösterildi.



Şekil 12. Serum TOS değerlerinin istatistiksel analizi sonucu oluşan ortalamalarının grafiği.

5.1.4. Serum OSI Analizleri

Serum OSI analizi yapılırken TOS değerleri TAS değerine bölünerek hesaplamalar yapıldı ve birimsiz olarak değerlendirildi. Bütün grupların OSI değerleri karşılaştırıldığında DMBA grubunun ortalaması en yüksek olarak kaydedilirken, DMBA+MS grubu anlamlı olarak daha düşük izlendi ($p<0.05$). Kontrol grubu ile MS grubunun OSI değerleri arasında ise anlamlı fark olmadığı görüldü ($p>0.05$). Bütün grupların OSI ortalamalarının grafiği Şekil 4'te ve ortalamaları ise Tablo 1'de gösterildi.



Şekil 13. Serum OSI değerlerinin istatistiksel analizi sonucu oluşan ortalamalarının grafiği.

Tablo 4. Gruplar arası ortalaması alınan serum MDA, TAS, TOS ve OSI değerlerinin Ortalama±Standart sapmaları.

Gruplar	MDA (nmol/l)	TAS (μ mol)	TOS (mmol)	OSI
Kontrol	1.47±0.30 ^b	1.21± 0.09 ^{b,d}	34.32±1 7.65 ^{b,d}	28.29±14.72 ^{b,d}
DMBA	2.15±0.32 ^{a,c,d}	1.93± 0.02 ^{a,c}	171.68±62.31 ^{a,c,d}	89.11±33.13 ^{a,c,d}
MS	1.73±0.26 ^b	1.18± 0.03 ^{b,d}	26.91±16.23 ^{b,d}	22.47±13.06 ^{b,d}
DMBA+MS	1.75±0.23 ^b	1.71± 0.26 ^{a,c}	92.05±33.32 ^{a,b,c}	52.27±13.12 ^{a,b,c}

TAS; Total antioxidant capacity (μ mol H₂O₂ equivalent/L), TOS; Total oxidant capacity (mmol Trolox equivalent/L); MDA, Malondialdehyde (μ mol/l). DMBA; 7,12-dimetilbenza-antrasen, MS; Medicago sativa özütü, a; kontrolden farklı, b; DMBA'dan farklı, c; MS'den farklı, d; DMBA+MS'den farklı.

6. TARTIŞMA

Tıbbi ve aromatik bitkiler binlerce yıldır hastalık ve yara tedavisinde kullanılmaktadır. Bu bitkilerin tıbbi uygulamalarda kullanımı ile ilgili bilimsel çalışmalar da gün geçtikçe artmaktadır. Ülkemiz geniş coğrafi ve çeşitli bitki örtüsü nedeniyle yaklaşık 500 çeşit tıbbi bitkiye ev sahipliği yapmaktadır (101). Aromatik bitkilerin özellikle yapraklarında ve çiçeklerinde mevcut olan fenolik bileşikler olarak adlandırılan flavonoidler, fenolik asitler ve fenolik terpenler anti-oksidan aktivite ile birçok hastalığın tedavisinde etkili olabilmektedir (102).

Medicago sativa Leguminosae ailesine ait bir yem bitkisi olup Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak yetişebilen bir otsu bitkidir (103). Hayvanlar için yem bitkisi olarak kullanılan *Medicago sativa*'nın yüksek protein içeriği nedeniyle insanlar tarafından da çeşitli şekillerde tüketilebilmektedir. İnsanlar bağışıklık sistemini kuvvetlendirmek için bitkilerdeki fitokimyasallardan yararlanmaktadırlar. Bu fitokimyasallar lignanlar, izoflavanlar, kümestanlar olarak tanımlanmışlardır. *Medicago* türlerinde de en fazla bulunan fitokimyasal izoflavon'dur. Javid ve ark. bu kimyasalın anti-mikrobiyal ve anti-fungal özellikleri olduğunu yaptıkları çalışmada belirtmiştir (104). Ayrıca yapılan diğer pek çok çalışmada *Medicago sativa*'nın anti-oksidan özelliğiyle anti-karsinojenik olduğu ve bunun yanında koroner arter hastalıkları, osteoporoz, diyabetes mellitus ve mide ülseri için de koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (105,106). Selvan ve ark.'nın yaptıkları çalışmada MS'nin anksiyolitik özelliği gösterilmiştir (107). Ek olarak başka bir çalışmada MS'nin kolesterol düzeyinin artışı önlemede etkili olduğu gösterilmiştir.

7,12-dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) ve N-nitrozo-N-metilüre (NMU), dişi sıçanlarda meme tümörü gelişiminin indüksiyonu için en sık kullanılan kimyasal kanserojenlerdir (108). Yapılan çalışmalarda DMBA ya da NMU'nun tek bir uygulamasının, dişi sıçanlarda, uygulamadan sonraki sekiz ila on hafta içinde tümör gelişimini indüklediği bildirilmiştir (109-113).

Her iki karsinojenik ajan da DNA alkilasyonu yoluyla meme tümörü gelişimini tetiklese de metabolizmaları açısından farklıdırlar. NMU, doğrudan etkili bir alkilleyici ajan olarak sınıflandırıldığından metabolik aktivasyon gerektirmez

(114,115). NMU'dan farklı olarak DMBA, karaciğer sitokrom P450 enzimleri tarafından önceden metabolik aktivasyon gerektiren dolaylı bir kanserojendir. Bu şekilde, DMBA'nın karsinojenik aktivitesi NMU ile karşılaştırıldığında daha yavaştır, bu da DMBA'nın neden olduğu meme tümörleri için daha uzun bir latent dönem ile sonuçlanır (116). Her iki karsinojen de miRNA-21, miRNA-34'a ve miRNA-155 gibi çeşitli mikro RNA'ların (miRNA'lar) ekspresyonunu kısa bir süre içinde değiştirerek kimyasal karsinogenezin başlangıç sürecindeki rollerini destekler. NMU'nun miRNA'lar üzerindeki etkisi, DMBA'nın aksine bu kanserojenin doğrudan etkili etkisi nedeniyle DMBA ile karşılaştırıldığında daha baskındır (117,118).

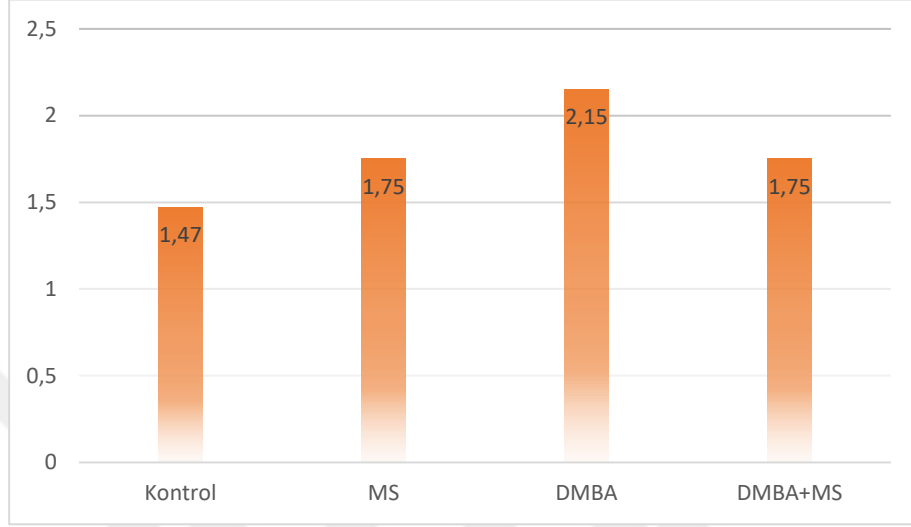
DMBA ve diğer benzeri polisiklik aromatik hidrokarbonlar canlı dokularda serbest radikal üretimini arttırarak oksidatif stres yaratırlar ve sonuç olarak da karsinogenezde önemli bir rol alırlar (119). Ortaya çıkan bu radikaller hücre ve hücre membranı için toksik vasıfta olup hücrede birçok farklı molekülle etkileşime girerek yapı ve fonksiyon bozukluğuna yol açarlar. Serbest radikallerin çoklu doymamış yağ asitleriyle girmesi sonrasında lipid peroksidasyonu meydana gelir. Peroksidasyonun son ürünü olan malon-di-aldehit (MDA) lipid, protein, nükleik asitler gibi hücresel elemanlar ile çapraz bağlanarak dokudaki zincir reaksiyonlarının hız belirleyicisi olur. Araştırmacılar; diğer tüm kanser türlerinde olduğu gibi meme kanseri gelişiminde de oksidatif stresin çok önemli rolü olduğunu belirlemiş ve lipid peroksidasyonu son ürünü olan MDA'yı kıymetli bir biyogösterge olarak kullanmışlardır (120-123).

Yapılan diğer çalışmalarda da memedeki kanserli dokuda ve serumda MDA düzeylerinin sağlıklı doku ve seruma göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu durumun kanser varlığında doku oksijenizasyonunun bozulmasına bağlı meydana gelen oksidatif hasara bağlı olduğu düşünülmektedir (121-122). Benzer bir meme kanseri çalışmasında MDA düzeyindeki artışlar ve diğer oksidatif moleküllerin DNA'da zincir kırıklarına neden olduğu ve bunun sonucunda karsinojenik ve genotoksik hasar meydana geldiği belirtilmiştir (123,124)

Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak serum MDA düzeylerinde en yüksek ortalamanın DMBA grubunda olduğu ve DMBA+MS grubunun ise anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü ($p<0.05$). MS grubu ile DMBA+MS grubu

karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı fark olmadığı izlendi ($p>0.05$). DMBA ile birlikte MS uygulanması serum MDA düzeylerini olumlu yönde etkilemişti.

Tablo 5. Gruplarda MDA Ortalama Değerleri



DMBA'nın vücuttaki metabolik aktivasyonundan sonra önemli bir karsinojenik madde meydana gelir. Bunun sonucu olarak da aşırı ROS üretimi ve dokudaki total oksidan/anti-oksidan dengesi bozulmuş olur (125). DMBA'nın, ROS oluşumunu artırarak karsinogenezi tetiklediği bilinmektedir. Artan ROS, çok sayıda biyomolekölün zarar görmesine ve kanser gelişimine neden olabilecek mutajenite gibi çeşitli moleküler ve hücresel etkiler sergilemesine katkıda bulunur. Aşırı ROS, lipid peroksidasyonunu ve MDA gelişimini artırarak hücrelerin yapısını ve fonksiyonlarını bozabilir (126).

DeneySEL kanser çalışmalarında diyet kökenli biyoaktif bileşiklerin ROS kaynaklı metabolik ve hücreSEL dengesizlikleri azaltma potansiyeli olduğu belirtilmiştir. Siklofosfamid ile in-vivo ve in-vitro olarak uyarılan oksidatif strese nar ekstraktının anti-oksidan etkisi incelenen çalışmada; ekstraktın hem karaciğer dokusunda MDA düzeyini düşürdüğü hem de radikal süpürücü etkiyle total oksidan düzeylerinde düşüş saptandığı belirtilmiştir (125).

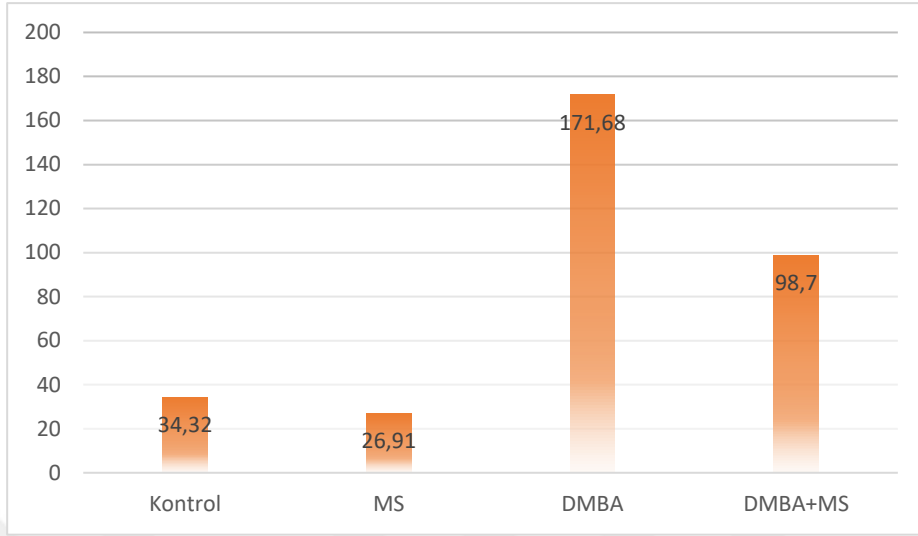
Birçok organizma, ROS'tan kaynaklanan oksidatif hasarı etkisiz hale getirmek için serbest radikal temizleme, çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar ve metal şelatlayıcı ajanlar dahil olmak üzere bir antioksidan savunma sistemi kullanır (127).

Özellikle, birçok tıbbi bitki ve gıda (sebzeler, meyveler ve tahıllar gibi) doğal antioksidanlar açısından zengindir (128). Dahası, fitoöstrojenik bileşikler ve çeşitli vitamin türleri, birçok bitkide bulunan iyi bilinen antioksidanlardır (129,130). Bu bağlamda, Medicago sativa (yonca), apigenin, luteolin, kumarestrol, kuersetin, medikarpin, daidzein ve genistein gibi fitoöstrojenik bileşikler ve özellikle C vitamini olmak üzere çeşitli vitaminler açısından zengin bitkilerden biridir (131). Yoncanın antioksidan rolünün yanı sıra, diyabet, talasemi, çeşitli kanserler, böbrek bozuklukları ve hiperkolesterolemi gibi bazı hastalıklar üzerindeki yararlı etkileri de tanımlanmıştır. Yukarıda belirtilen faydalı özellikleri göz önünde bulundurulduğunda, bu bitki dünya çapında çeşitli tıbbi formlarda işlenmekte ve değerlendirilmektedir (132).

Antioksidanlar hücreleri ve dokuları oksidatif stresten korur, hücresel ve biyokimyasal olayları sürdürür. Süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT), serbest radikallerin neden olduğu hasara karşı hücresel korumada kritik bir işlev görür (133,134). Birçok kanser türünde antioksidanların aktivitesinde azalma rapor edilmiştir (135).

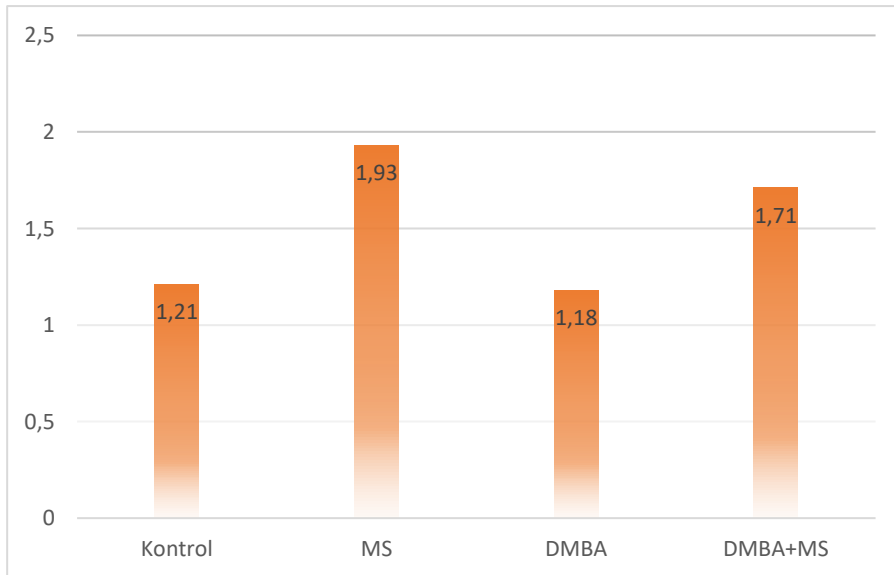
Çalışmamızda total oksidan seviyelerinde (TOS) gruplar karşılaştırıldığında DMBA ve DMBA+MS grubu arasında anlamlı fark olduğu izlendi ($p<0.05$). DMBA grubunda serum TOS düzeyleri en yüksek düzeyde görülürken, DMBA+MS grubunda DMBA grubuna kıyasla literatürle uyumlu olarak anlamlı derecede daha düşüktü.

Tablo 6. Gruplarda TOS Ortalama Değerleri



Çalışmamızda TAS düzeylerine bakıldığında DMBA ve DMBA+MS grubu arasında literatürle uyumlu olarak anlamlı fark olduğu izlendi ($p<0.05$). En yüksek TAS ortalaması MS grubunda meydana gelirken, en düşük ortalamanın DMBA grubunda olduğu görüldü. Grupların TAS ortalamaları aşağıdaki grafikte gösterilmiştir.

Tablo 7. Gruplarda TAS Ortalama Değerleri



Serum OSI analizi yapılırken TOS değerleri TAS değerine bölünerek hesaplamalar yapıldı ve birimsiz olarak değerlendirildi. Bütün grupların OSI değerleri

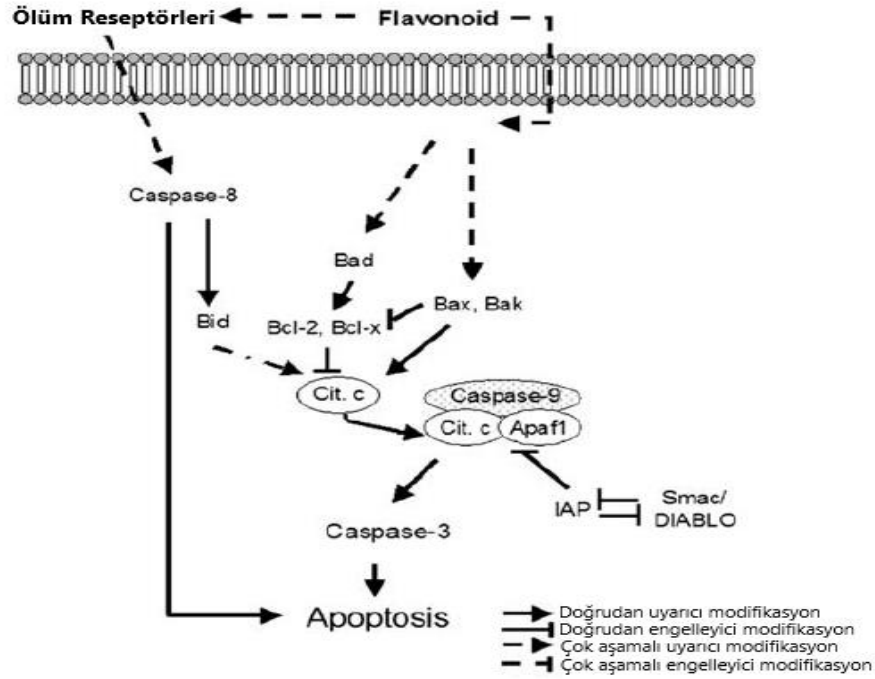
karşılaştırıldığında; MS grubunun ortalaması en yüksek olarak kaydedilirken, DMBA grubu anlamlı olarak daha düşük izlendi ($p<0.05$). Ayrıca DMBA grubunun OSI değerleri ile DMBA+MS grubunun OSI değerleri arasında anlamlı olarak daha düşük fark olduğu görüldü ($p<0.05$).

Hayvanlarda DMBA ile uyarılmış meme kanseri modelinde histolojik olarak kanser ile ilişkili inflamatuvar hücreler, hiperplazi ve neoplastik hücrelerin arttığı gösterilmiştir. Hücrelerde atipi, pleomorfizm, hiperplazi ve diğer morfolojik değişiklikleri izlenebilir. Hücresel morfolojinin bozulması ve onkojenlerin aktivasyonu ile meydana gelen kontrolsüz büyüme ve çoğalma sonucu kitlesel oluşum da izlenebilir (136,137). Seshadri ve ark. DMBA ile uyarılmış meme kanserinde zingiberenenin etkinliğini incelemiş ve DMBA ile uyarılan meme kanseri hayvanlarında inflamatuvar hücrelerin, neoplastik hücrelerin, epitelyal hiperplazinin ve toplam histolojik hasar skorlarının yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Zingiberene uygulanan hayvanlarda histolojik hasar skorlarının azaldığı görülmüştür ve zingiberenenin meme kanseri üzerine koruyucu etkisi olduğunu belirtmişlerdir (138).

Çalışmamızda alınan meme dokularına yapılan histolojik inceleme ve immunhistokimyasal boyamada DMBA grubunda hücresel düzeyde orta şiddette fibrozis izlenmiş olup, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, meme hücrelerinde dejeneratif değişiklikler ve olağan duktal hiperplazi geliştiği görüldü. DMBA+MS grubuna ait spesmenlerde ise sadece zayıf orta şiddette fibrozis ve vaskülarizasyon artışının geliştiği görüldü. DMBA sonrası uygulanan MS meme hücrelerini histopatolojik açıdan olumlu yönde etkilediği izlendi. DMBA uygulanınca gelişen histopatolojik değişikliklerin bazıları tamamen ortadan kalkmıştı. Bu sonuçlar, Medicago sativa'nın DMBA ile uyarılan meme karsinogenezine karşı koruyucu etkilerini kanıtladı.

Bcl-2 (B-cell lymphoma gene-2) protein ailesinde yer alan moleküller hücre apoptozisinin önemli düzenleyicisidirler. Bu grupta hem apoptoziste hem de anti-apoptoziste etkili olan proteinler mevcuttur. Bcl-2 ilk olarak B hücreli lenfomada gösterilmiş bir onkogendir. Hücrede fazla sentezlenmesi durumunda anti-apoptotik etkiyle kontrolsüz çoğalmaya neden olmakta ve karsinogenezisin öncüsü

olabilmektedir. Birçok malignitede bcl-2'nin over-ekspresyonu görülmektedir (139,140).



Şekil 14. Hücrede Apoptoz Mekanizması ve Aşamaları (139)

Bax; Bcl-2 associated protein olarak kullanılmakta olup apoptozisi indükleyen bir moleküldür. Hücrede ölüm sinyali aktive olduğunda Bax sentezi artar, Bcl-2 etkisi nötralize edilerek apoptozis gerçekleşmiş olur. Bax proteininin fonksiyon kaybında neoplastik aktivitenin arttığı gösteren çalışmalar mevcuttur (141).

Çalışmamızda meme dokuları ışık mikroskobu altında incelendiğinde Bax ekspresyonu DMBA grubunda hafif pozitif-negatif izlenirken; DMBA+MS grubunda Medicago sativa'nın anti-apoptotik etkinliği nedeniyle yoğun pozitif ekspresyon izlendi. Bcl-2 ekspresyonu DMBA grubunda orta yaygınlıkta pozitif izlenirken; DMBA+MS grubunun meme dokularında genel olarak hafif düzeyde pozitif ekspresyonlar verildiği görüldü.

7. SONUÇ

Bu araştırmadan elde edilen bulgular, Medicago sativa'nın ratlarda DMBA ile uyarılan meme tümörü oluşumuna karşı antikanser potansiyelini ortaya çıkardı. Medicago sativa'nın, Wistar Albino (WA) ratlarında DMBA ile uyarılan biyokimyasal değişikliklerde ve hücrelerdeki oksidatif stresin düzenlenmesinde etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca Medicago sativa tedavisi, inflamatuvar durumu ve hücrelerdeki histolojik hasarı büyük ölçüde baskıladı. İn vitro deneylerin bulguları da Medicago sativa'nın anti-kanser, anti-oksidan ve anti-inflamatuvar rolünü desteklemektedir. Medicago sativa, memede tümöral hücrelerin viabilitesini etkili bir şekilde azalttı ve ayrıca bu hücrelerde ROS'u ve apoptotik hücre ölümünü arttırdı. Genel olarak bu sonuçlar, WA sıçanlarında DMBA ile oluşturulan meme kanserine karşı Medicago sativa'nın antioksidan ve antikanser rolünün olduğunu göstermiştir. Ancak Medicago sativa'nın antikanser özelliğinin mekanizmalarını net bir şekilde anlamak için hala ek deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKÇA

1. WHO&International Agency for Reseach on Cancer. Cancer Today, GLOBOCAN 2020. [Internet] Eriřim Adresi: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars> Eriřim tarihi: 15/09/2023.
2. Kashyap D, Pal D, Sharma R, Garg VK, Goel N, Koundal D, et al. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. Biomed Res Int. 2022; 18; 2022: 9605439.
3. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. CA Cancer J Clin. 2021;71(1):7-33.
4. WHO&International Agency for Reseach on Cancer. Cancer Tomorrow, GLOBOCAN 2020. [Internet] Eriřim Adresi: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?cancers=20> Eriřim tarihi: 15/09/2023.
5. Bora KS, Sharma A. Phytochemical and pharmacological potential of Medicago sativa: a review. Pharm Biol. 2011; 49(2): 211-20.
6. Gatouillat G, Magid AA, Bertin E, Okiemy-Akeli MG, Morjani H, Lavaud C, et al. Cytotoxicity and apoptosis induced by alfalfa (Medicago sativa) leaf extracts in sensitive and multidrug-resistant tumor cells. Nutr Cancer. 2014; 66(3): 483-91.
7. Nigro ND, Bull AW, Klopfer BA, Pak MS, Campbell RL. Effect of dietary fiber on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. J Natl Cancer Inst. 1979 ;62(4): 1097-102.
8. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. CA Cancer J Clin. 2001; 51(1): 15-36.
9. Breasted JH. The Edwin Smith Surgical Papyrus. University of Chicago Press. 1930;405.
10. Sakorafas GH, Safioleas M. Breast cancer surgery: an historical narrative. Part I. From prehistoric times to Renaissance. Eur J Cancer Care (Engl). 2009; 18(6): 530-44.
11. Ekmektzoglou KA, Xanthos T, German V, Zografos GC. Breast cancer: from the earliest times through to the end of the 20th century. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2009; 145(1):3-8.

12. Beenken S. A history of breast cancer. *Lancet Oncology*. 2005; 6(7): 458.
13. Donegan WL. Introduction to history of breast cancer. In: Donegan WL and Spratt JS (ed). *Cancer of the breast* In: Sabiston DC (ed). *Textbook of Surgery* Philadelphia: Saunders 1995: 1-5.
14. Özdoğan M. 'Memenin ve meme kanserinin tarihi.' <https://www.drozdogan.com/memenin-ve-meme-kanserinin-tarihi/> 01.02.2018.
15. Moore C. On the influence of inadequate operations on the theory of cancer. *R Med Chir Soc*. 1867; 1: 244.
16. Sanders-Goebel P. Crisis and controversy: historical patterns in breast cancer surgery. *Can Bull Med Hist*. 1991; 8(1): 77-90.
17. Köksal NG, Doğu Karadeniz Sağlık Bilimleri Dergisi, East Black Sea Journal of Health Sciences. 2022; 1(2).
18. Fahad Ullah M. Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status. *Adv Exp Med Biol*. 2019; 1152: 51-64.
19. American Cancer Society, Cancer Facts and Figures, (2022) <https://www.cancer.org/research/cancer-factsstatistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2022.html>
20. World Health Organization (WHO). Breast Cancer. (2021). <https://www.who.int/newsroom/factsheets/detail/breast-cancer>.
21. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*. 2017; 13(11): 1387-97.
22. Bernstein L, Henderson BE, Hanisch R, Sullivan-Halley J, Ross RK. Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women. *J Natl Cancer Inst*. 1994; 86(18): 1403-08.
23. Martin AM, Weber BL. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000; 92: 1126-35.
24. Altunkaynak BZ, Ünal D, Aksak S, Ünal B. Östrojen hormonu ve menopoz. *Deneyisel ve Klinik Tıp Dergisi*. 2012; 29: 252-6.
25. Russo J, Lareef MH, Balogh G, Guo S, Russo IH. Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2003; 87: 1-25.

26. Ozan ST, Yaralıoğlu S, İleri T, Halifeoğlu İ. Akkaraman ve ivesi koyunlarında, gebelikte ve doğumdan sonra eritrosit, tükürük ve serum arginaz aktiviteleri ile serum üre ve östrojen düzeyleri. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. 1999; 23: 345-50.
27. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020; 70(1): 7-30.
28. Washbrook E. Risk factors and epidemiology of breast cancer. *Women's Health Medicine*. 2006; 3(1): 8–14.
29. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*. 2001; 358(9291): 1389-99.
30. Emery J, Lucassen A, Murphy M. Common hereditary cancers and implications for primary care. *Lancet*. 2001; 358(9275): 56-63.
31. Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonu (MHDF). Meme hastalıkları kitabı. İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri, 2012; ISBN: 978-975-277-402-5.
32. Collins LC, Schnitt SJ. Breast: Stacey EM (editor). *Histology for Pathologists*. 3th ed, Philadelphia: Saunders Lippincott Williams and Wilkins 2007, p: 57-68.
33. Onat D. Meme Anatomisi ve Fizyolojisi. Ankara: Türkiye Klinikleri Yayınevi 1996, s: 39-77.
34. Spratt JS, Tabin GR. Gross anatomy of the breast. In: Donegan WL, Spratt JS, eds. *Cancer of the breast*, 4th edition, Philadelphia: London 1995, p: 22-42.
35. Erhan Y, Canda T. Meme Hastalıkları Patolojisi ve Meme Kanseri. Mocan Kuzey G(editor). *Temel Patoloji*. 22. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi. 2007, s: 705-39.
36. Moore KL, Dalley AF. Clinically Oriented Anatomy. In: Thorax: Breast. Moore KL. 4th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 1999, p: 72–9.
37. Farra WB, Walker MJ, Minton LP. Physiology of the Breast Cancer of the Breast Ed. Williams 4. Baskı, W.B Saunders, USA 1995, p: 43-51.

38. Kirby Ė. Bland, copeland, Edward M. Breast. Principles of Surgery, Volume i Ed. Seymouri Schwartz 1995, p: 531-93.
39. Bussolati G, Cassoni P, Ghisolfi G, Negro F, Sapino A. Immunolocalization and gene expression of oxytocin receptors in carcinomas and non-neoplastic tissues of the breast. *Am J Pathol.* 1996; 148(6): 1895-903.
40. Dickson R, Russo J. Biochemical control of breast development. In Harris J, et al (eds): Diseases of the breast. Philedelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2000.
41. Alvarado A, Faustino-Rocha AI, Colaço B, Oliveira PA. Experimental mammary carcinogenesis-Rat models. *Life Sci.* 2017; 173: 116-34.
42. Saraçlıgil B. D Vitamininin MCF-7 Meme Kanseri Hücresi Metabolizması Üzerine Etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Konya: Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, 2015.
43. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000; 100: 57–70.
44. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 401-10.
45. Vargo-Gogola T, Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature Reviews Cancer.* 2007; 7: 659-72
46. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med.* 2008; 358(5): 502-11.
47. Çiftçi N. The Role of Oxidative Stress in Cancer: Could Antioxidants Fuel the Progression of Cancer? *Ahi Evran Tıp Dergisi.* 2017; 1: 8-13.
48. Mandal S, Yadav S, Nema RK. Antioxidants: A review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.* 2009; 1(1): 102-4.
49. Delibaş N, Özçankaya R. Serbest radikaller. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 1995; 2(3): 11-7.
50. Karaöz E, Özcan O, Irmak K, Sarsılmaz M. In vitro hidrojen peroksit uygulamasında kolon mukozasında görülen değişiklikler ve buna E vitamininin etkisi. *Gazi Tıp Dergisi.* 1992; 3: 177-83.
51. Pham-Huy L A, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci.* 2008; 4(2): 89-96.

52. Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MTD, Mazura M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 44-84.
53. Marnett LJ. Oxy radicals, lipidperoxidation and DNA damage. *Toxicology* 2002; 181 182: 219-22.
54. Gilbert DL. Fifty years of radical ideas. *Annals New York Academy of Sciences.* 2000; 899: 1 14.
55. Gutteridge J M C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chemistry.* 1995; 41: 1819-28.
56. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, significance. *Am J Clin Nutr.* 1993; 57: 715-25.
57. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri *JCEI.* 2015; 6(3): 331-6.
58. Özkan A, Fışkın K. Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi.* 2004; 14: 52-60.
59. Abuja P.M, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta.* 2001; 306: 1-17.
60. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews.* 2010; 4(8): 118–26.
61. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* 2010; 44 (5): 479-96.
62. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J.* 2016; 25;15(1): 71.
63. Kumaraguruparan R, Subapriya R, Viswanathan Nagini S. (2002) Tissue lipid peroxidation and antioxidant status in patients with adenocarcinoma of the breast. *Clin Chim Acta.* 325, 165-170.
64. Akkuş İ. Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri, 1.Baskı. Konya: Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım, 1995.

65. Auletta CS, Weiner ML, Richter WR. A dietary Toxicity/oncogenicity study of tributyl phosphate in the rat. *Toxicology*. 2000; 128: 125-34.
66. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*. 2008; 4(2): 89-96.
67. Bozovic-Spasojevic I, Azambuja E, McCaskill-Stevens W, Dinh P, Cardoso F. Chemoprevention for breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2012; 38(5):329-39.
68. Files JA, Stan DL, Allen SV, Pruthi S. Chemoprevention of breast cancer. *Women's Health* 2012; 8: 635–46.
69. Mandal A, Bishayee A. Mechanism of Breast Cancer Preventive Action of Pomegranate: Disruption of Estrogen Receptor and Wnt/ β -Catenin Signaling Pathways *Molecules*. 2015; 20(12): 22315-28.
70. Özben, T. Oxidative Stres and Apoptosis: Impact on Cancer Therapy. *J Pharm Sci*. 2006; 96(9), 2181-96.
71. Ertekin A, Türel İ, Oto G, Çelikezen FÇ, Yaşar S. Isırgan Otunun Dimetilbenzantrasen Uygulanan Tavşanlarda Lipit Peroksidasyonu, Antioksidan Maddeler ve Nitrit-Nitrat Düzeyleri Üzerine Etkisi. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2008; 2, 11-15 53.
72. Koçtürk, S. Oksitadif Stresin Sinyal İletim ve Apoptoz Mekanizmalarında Önemi [Poster]. XXI. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2009; İstanbul.
73. Lim V, Korourian S, Todorova VK, Kaufmann Y, Klimberg VS. Glutamine prevents DMBA-induced squamous cell cancer. *Oral Oncol*. 2009; 45(2): 148-55.
74. Özelçi KG. Reaktif Oksijen Metabolitlerine Fizyopatolojik Yaklaşım. *Ankara Tıp Mecmuası*. 1994; 47, 579-592.
75. Korsh J, Shen A, Aliano K, Davenport T. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Breast Cancer: A Review of the Literature. *Breast Care*. 2015; 10;316–8.
76. Khan D, Qindeel M, Ahmed N, Khan AU, Khan S, Rehman AU. Development of novel pH-sensitive nanoparticle-based transdermal patch for management of rheumatoid arthritis. *Nanomedicine (Lond)*. 2020; 15(6): 603-624.
77. Zeweil MM, Sadek KM, Taha NM, El-Sayed Y, Menshawy S. Graviola attenuates DMBA-induced breast cancer possibly through augmenting

- apoptosis and antioxidant pathway and downregulating estrogen receptors. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019; 26(15): 15209-17.
78. Russo J. Significance of Rat mammary tumors for human risk assessment. *Toxicol Pathol*. 2015; 43: 145–170.
79. Alvarado A, Lopes AC, Faustino-Rocha AI, Cabrita AMS, Ferreira R, Oliveira PA, et al. Prognostic factors in MNU and DMBA-induced mammary tumors in female rats. *Pathol Res Pract*. 2017; 213:441
80. Gülbahçe ME, Baltacı SB. DMBA ile meme kanseri oluşturulmuş sıçanlarda artan uterus doku hasarı çinko ve melatonin desteğiyle önlenir. *Genel Tıp Derg*. 2020; 30(3): 190-6
81. İrtem KD, Şayak O. Medicago sativa Bitkisinin Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi. *Journal of Natural & Applied Sciences of East*. 2020; 3(1): 9-18
82. Liu X, Sun Y, Bian J, et al. Phytochemical and chemotaxonomic study on Medicago sativa L. (leguminosae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 2018; 80; 55–58.
83. Al-Dosari MS. In vitro and in vivo antioxidant activity of alfalfa (Medicago sativa L.) on carbon tetrachloride intoxicated rats. *Chinese Medicine*. 2012; 40(4): 779–93.
84. Taysi S, Gumustekin K, Demircan B, et al. Hippo phaerhamnoides attenuates nicotine-induced oxidative stress in rat liver. *Pharmaceutical Biology*. 2010. 48(5): 488–93.
85. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta*. 1978; 90: 37–43.
86. Yagi K. Assay of blood plasma or serum for serum lipid perokside level and its clinical signifance. *Methods in Enzymology*. 1984; 105: 224–41.
87. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*. 2004; 37(2), 112-9.
88. Erel O. A new auto mated colorimetric method formeasuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005; 38: 1103–11.

89. Altaany Z, Alkaraki A, Abu-Siniyeh A, Al Momani W, Taani O. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress markers in thermal sulfurous springs residents. *Heliyon*. 2019 ;5(11): e02885.
90. Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R, et al. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol*. 2011; 48: 117-31.
91. Russo J, Russo IH. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2000; 5, 187-200.
92. Henson PM, Hume DA. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol*. 2006; 27: 244–50.
93. Hidalgo A, French Constant C. The control of cell number during central nervous system development in flies and mice. *Mech Dev*. 2003; 120: 1311–25.
94. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16: 395–419.
95. Gross A, McDonnell JM, and Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 1999; 13: 1899–911.
96. Gedikli S, Melatoninin Mcf-7 Hücre Kültüründeki Apoptoz Aktivasyonunun Ve Sitotoksitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pcr), Mtt Hücre Canlılık Testi Ve İmmünohistokimya Yöntemleriyle Araştırılması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2013.
97. Tomatır AG, Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri*. 2003; 23: 499-508.
98. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 2007; 35: 495-516.
99. Yerlikaya A, Dokudur H. Protein yıkımının önemi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2009; 35: 93-9.
100. Stajner, I., Season of breast cancer diagnosis and probability of death from breast cancer in the United States. *International journal of cancer Journal international ducancer* 2010, 126 (12), 3010-3013.
101. Aydın S. Anadolu Diyagonalı: Ekolojik Kesinti Tarihsel-Kültürel Bir Farklılığa İşaret Edebilir Mi. *Kebikeç İnsan Bilimleri İçin Kaynak Araştırmaları Dergisi*. 2004; 17: 117-37.

102. Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E, Vivanco JM. Antioxidant Activity And Total Phenolic Content Of Iranian Ocimum Accessions. Food Chemistry. 2003; 83(4): 547-50.
103. Farag MA, Huhman DV, Lei Z, Sumner LW. Metabolic Profiling And Systematic Identification Of Flavonoids And Isoflavonoids In Roots And Cell Suspension Cultures Of Medicago Truncatula Using HPLC–UV–ESI–MS And GC–MS. Phytochemistry. 2007; 68(3): 342-354.
104. Javid T, Adnan M, Tariq A, Akhtar B, Ullah R, El Salam NA. Antimicrobial activity of three medicinal plants (*Artemisia indica*, *Medicago falcate* and *Tecoma stans*). African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 2015; 12(3): 91-6.
105. Rana MG, Katbamna RV, Padhya AA, Dudhrejiya AD, Jivani NP, Sheth N R. In Vitro Antioxidant And Free Radical Scavenging Studies Of Alcoholic Extract of *Medicago Sativa* L. Romanian Journal Of Biology-Plant Biology. 2010; 55(1): 15-22
106. Krakowska A, Rafińska K, Walczak J, Buszewski B. Enzyme-Assisted Optimized Supercritical Fluid Extraction To Improve *Medicago Sativa* Polyphenolics Isolation. Industrial Crops And Products. 2018; 124: 931-40.
107. Selvan AT, Prithvi S, Suthakaran S, Ravali R, Kumar GM, Ravali R. Anxiolytic Effect Of Medicine Of *Medicago Sativa* Seeds Extract On Rodents. Indo Am. J. Pharm. Res. 2014; 4: 406-15.
108. Imaoka T, Nishimura M, Doi K, Tani S, Ishikawa K, Yamashita S, et al. Molecular characterization of cancer reveals interactions between ionizing radiation and chemicals on rat mammary carcinogenesis. Int J Cancer. 2014; 134(7): 1529-38.
109. Ariazi JL, Haag JD, Lindstrom MJ, Gould MN. Mammary glands of sexually immature rats are more susceptible than those of mature rats to the carcinogenic, lethal, and mutagenic effects of N-nitroso-N-methylurea. Mol Carcinog. 2005; 43(3): 155-64.
110. Sharma D, Smits BM, Eichelberg MR, Meilahn AL, Muelbl MJ, Haag JD, Gould MN. Quantification of epithelial cell differentiation in mammary

- glands and carcinomas from DMBA- and MNU-exposed rats. *PLoS One*. 2011; 6(10): e26145.
111. Alvarado A, Faustino-Rocha AI, Ferreira R, Mendes R, Duarte JA, Pires MJ, Colaço B, Oliveira PA. Prognostic Factors in an Exercised Model of Chemically-induced Mammary Cancer. *Anticancer Res*. 2016; 36(5): 2181-8.
 112. Faustino-Rocha AI, Gama A, Oliveira PA, Alvarado A, Neuparth MJ, Ferreira R, et al. Effects of lifelong exercise training on mammary tumorigenesis induced by MNU in female Sprague-Dawley rats. *Clin Exp Med*. 2017; 17(2):151-60.
 113. Lopes AC, Cova TF, Pais AA, Pereira JL, Colaço B, Cabrita AM. Improving discrimination in the grading of rat mammary tumors using two-dimensional mapping of histopathological observations. *Exp Toxicol Pathol*. 2014; 66(1): 73-80.
 114. Faustino-Rocha AI, Ferreira R, Oliveira PA, Gama A, Ginja M. N-Methyl-N-nitrosourea as a mammary carcinogenic agent. *Tumour Biol*. 2015 ; 36(12): 9095-117.
 115. Lu J, Jiang C, Mitrenga T, Cutter G, Thompson HJ. Pathogenic characterization of 1-methyl-1-nitrosourea-induced mammary carcinomas in the rat. *Carcinogenesis*. 1998; 19(1): 223-7.
 116. Budan F, Varjas T, Nowrasteh G, Varga Z, Boncz I, Cseh J, et al. Early modification of c-myc, Ha-ras and p53 expressions by N-methyl-N-nitrosourea, *In Vivo* 22. 2008; p. 793–7.
 117. Juhasz K, Gombos K, Szirmai M, Gocze K, Wolher V, Revesz P, et al. Very early effect of DMBA and MNU on microRNA expression, *In Vivo* 27. 2013; p. 113–7.
 118. O'Day E, Lal A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010; 12(2): 201.
 119. Periyasamy K, Baskaran K, Ilakkia A, Vanitha K, Selvaraj S, Sakthisekaran D. Antitumor efficacy of tangeretin by targeting the oxidative stress mediated on 7,12-dimethylbenz(a) anthracene-induced proliferative breast cancer in Sprague-Dawley rats. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015; 75(2): 263-72.

120. Gungor H, Ilhan N, Eroksuz H. The effectiveness of cyclooxygenase-2 inhibitors and evaluation of angiogenesis in the model of experimental colorectal cancer. *Biomedicine Pharmacotherapy*. 2018; 102: 221-9.
121. Khanzode SS, Muddeshwar MG, Khanzode SD, Dakhale GN. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different stages of breast cancer. *Free Radic Res*. 2004; 38: 81–5.
122. Portakal O, Ozkaya O, Erden Inal M, Bozan B, Koşan M, Sayek I. Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clin Biochem*. 2000;33(4): 279-84.
123. Gerber M, Astre C, Ségala C, Saintot M, Scali J, Simony-Lafontaine J, et al. Tumor progression and oxidant-antioxidant status. *Cancer Lett*. 1997; 114(1-2): 211-4.
124. Huang YL, Sheu JY, Lin TH. Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clin. Biochem*. 1999; 32: 131-6.
125. Lin Y, Yao Y, Liu S, Wang L, Moorthy B, Xiong D, et al. *Toxicol. Lett*. 2012; p. 212-97.
126. Amitay EL, Carr PR, Jansen L, Roth W, Alwers E, Herpel E, et al. *Br. J. Cancer*. 2020; 122(11): 1604.
127. Zafra-Rojas QY, González-Martínez BE, Cruz-Cansino NS et al. “Effect of ultrasound on in vitro bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant capacity of blackberry (*Rubus fruticosus*) residues cv. Tupy,” *Plant Foods for Human Nutrition*. 2020; 75(4): 608–13.
128. S. Li, H. Y. Tan, N. Wang et al., “The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, no. 11, pp. 26087–26124, 2015.
129. Rietjens IMCM, Lousse J, Beekmann K. The potential health effects of dietary phytoestrogens. *Br J Pharmacol*. 2017; 174(11): 1263-80.
130. Asensi-Fabado MA, Munné-Bosch S. Vitamins in plants: Occurrence, biosynthesis and antioxidant function. *Trends in Plant Science*. 2010; 15(10): 582–92.

131. Soto-Zarazúa MG, Bah M, Costa ASG et al. Nutraceutical potential of new alfalfa (*Medicago sativa*) ingredients for beverage preparations. *Journal of Medicinal Food*. 2017; 20(10): 1039–46.
132. Mirzaei A, Delaviz H, Mirzaei M, Tolooei M. The Effects of *Medicago Sativa* and *Allium Porrum* on Iron Overload in Rats. *Glob J Health Sci*. 2015; 23(7): 137-42.
133. Shukla S, Srivastava JK, Shankar E, Kanwal R, Nawab A, Sharma H, et al. Oxidative Stress and Antioxidant Status in High-Risk Prostate Cancer Subjects. *Diagnostics (Basel)*. 2020; 10(3): 126.
134. Kennedy L, Sandhu JK, Harper ME, Cuperlovic-Culf M. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules*. 2020; 10(10): 1429.
135. Griñan-Lison C, Blaya-Cánovas JL, López-Tejada A, Ávalos-Moreno M, Navarro-Ocón A, Cara FE, et al. Antioxidants for the Treatment of Breast Cancer: Are We There Yet? *Antioxidants (Basel)*. 2021; 10(2): 205.
136. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, et al. Breast Cancer Development and Progression: Risk Factors, Cancer Stem Cells, Signaling Pathways, Genomics, and Molecular Pathogenesis. *Genes Dis*. 2018; 5(2): 77.
137. Bonacho T, Rodrigues F, Liberal J. Immunohistochemistry for diagnosis and prognosis of breast cancer: a review. *Biotech Histochem*. 2020; 95(2): 71-91.
138. Seshadri VD, Oyouni AAA, Bawazir WM, Alsagaby SA, Alsharif KF, Albrakati A, et al. Zingiberene exerts chemopreventive activity against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced breast cancer in Sprague-Dawley rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2022; 36(10): e23146.
139. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Apoptozis düzenlenmesinde Bcl-2 ailesi proteinlerinin ve kaspazlarının rolü. *Mol Cell Biochem*. 2011; 351: 41–58.
140. Janumyan Y, Cui Q, Yan L, Sansam CG, Valentin M, Yang E. G0 function of BCL2 and BCL-xL requires BAX, BAK, and p27 phosphorylation by Mirk, revealing a novel role of BAX and BAK in quiescence regulation. *J Biol Chem*. 2008; 283(49): 34108-20.

141. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(1): 47-59.

