



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN NİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**MCF-7 VE MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre
Hatlarında Juglon ve Kurkumin Uygulamasının
FABP Proteinleri (Fatty Acid Binding Protein)
Üzerine Etkilerinin Moleküler Yöntemler ile
Belirlenmesi**

Dilek SÖYLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Ağustos-2020
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Dilek Söyler tarafından hazırlanan “MCF-7 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Juglon ve Kurkumin Uygulamasının FABP Proteinleri (Fatty Acid Binding Protein) Üzerine Etkilerinin Moleküler Yöntemler ile Belirlenmesi” adlı tez çalışması ~~22/07/2020~~ tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Doç. Dr. Abdullah SİVRİKAYA

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU

Üye

Doç. Dr. Gökhan KARS

İmza



Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. S. Savaş DURDURAN
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından 181315002 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Dilek SÖYLER

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MCF-7 VE MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Juglon ve Kurkumin Uygulamasının FABP Proteinleri (Fatty Acid Binding Protein) Üzerine Etkilerinin Moleküler Yöntemler ile Belirlenmesi

Dilek SÖYLER

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU

2020, 88 Sayfa

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU

Doç. Dr. Abdullah SİVRİKAYA

Doç. Dr. Gökhan KARS

Meme kanseri, dünya çapında kadınlarda en sık rastlanan malign kanser türlerinden biridir. Sürekli artmakta olan meme kanseri vakası nedeniyle, birincil ve ikincil korunmada etkili tedaviler geliştirmek hayati önem taşımaktadır. Kanser önleme yönteminin her iki türünü de birleştiren en iyi yöntemlerden biri, kimyasal müdahale gibi görünmektedir. Bu kimyasal müdahalelerde de karsinogenez sürecini engellemek, geciktirmek veya tersine çevirmek için doğal veya yapay bileşikler kullanılır. Doğal kökenli kemoprevansiyon maddeler arasında, geniş spektrumlu bir anti-kanser aktivitesi gösteren polifenol türevi olan kurkumin ve naftakinon yapılı olan juglona büyük önem verilmektedir.

Düşük moleküler ağırlıklı (14-15 kDa) bir protein grubu olan FABP'ler, lipid bağlayıcı protein süper ailesinin üyeleridir. FABP'ler çeşitli dokularda bulunur ve yağ asidi metabolizmasında önemli bir rol oynar ayrıca hücre büyümesinin ve çoğalmasının modülasyonundan sorumlu olabilirler. FABP'lerin kanser gelişiminde yer aldığı bildirilmektedir. Birçok kanser türünde artış veya azalış göstermektedir ve bu nedenle tümör markörü olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Yapılan çalışmada kurkumin ve juglonun meme kanseri hücre hatlarında antikanser ve sitotoksik etkileri sonucu hücre canlılığına etkisini ve FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonu ve protein düzeyindeki değişiklikleri araştırmak amaçlanmaktadır.

Çalışmamızda MCF-7 meme kanseri hücre hattına 0,1 – 40 μ M kurkumin ve 1 – 40 μ M juglon muamelesi yapılmış ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında 1 – 20 μ M kurkumin ve 1 – 15 μ M juglon muamelesi yapılmıştır. Bu farklı doz uygulamaları sonucu hücre canlılığına etkileri MTT analiz ile tespit edilmiştir. Hücrelere 24 saat boyunca IC_{50} değerlerine göre belirlenen farklı dozlarda kurkumin ve juglon muamelesi yapılmış ve Real-time PCR ve Western blot yöntemiyle FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonları ve protein düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır.

MCF-7 hücre hattında kurkumin uygulaması sonucunda, IC_{50} dozu 22,41 μ M olarak tespit edilmiş ve FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarının arttığı, juglon uygulaması sonucu IC_{50} dozu 16,27 μ M olarak tespit edilmiş ve FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonunun ilk dozda azaldığı yükselen dozlarda arttığı belirlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında, kurkumin uygulaması sonucunda IC_{50} dozu 10,43 μ M, juglon uygulaması sonucunda da IC_{50} dozu 3,38 μ M olarak tespit edilmiş ve FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir. Ekspresyon analizleri yapıldıktan sonra, FABP5 ve FABP9 proteinlerine ait özgün antikorlar kullanılarak Western blot analizi yapılmıştır. MCF-7 hücre hattında kurkumin uygulamasının FABP5 ve FABP9 protein düzeylerini kontrol grubuna göre azalttığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde MCF-7 hücre hattında juglon uygulamasının da FABP5 ve FABP9 protein düzeylerinin kontrol grubuna göre azalttığı tespit edilmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında ise kurkumin

uygulamasý sonucu FABP5 ve FABP9 protein düzeylerinde kontrol grubuna göre ilk dozlarda arttýýý görülürken sonraki dozlarda azaldýýý tespit edilmiřtir. Benzer řekilde MDA-MB-231 hücre hattýnda juglon uygulamasý sonucu FABP5 ve FABP9 protein düzeylerinde kontrol grubuna göre ilk dozlarda arttýýý görülürken sonraki dozlarda azaldýýý tespit edilmiřtir.

Çalıřma sonucunda hem MCF-7 hem MDA-MB-231 hücre hattýnda kurkumin ve juglon uygulamasýnýn hücre canlılıęını ve FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarını ve protein düzeylerini azalttýýý bulunmuřtur.

Anahtar Kelimeler: FABP5, FABP9, Juglon, Kurkumin, Meme Kanseri



ABSTRACT

MS THESIS

Determination of Juglone and Curcumin Treatment on FABPs Effects (Fatty Acid Binding Protein) in MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines

Dilek SÖYLER

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS**

Advisor: Asst. Prof. Dr. Emine Nedime KORUCU

2020, 88 Pages

Jury

Asst. Prof. Dr. Emine Nedime KORUCU

Assoc. Prof. Dr. Abdullah SİVRİKAYA

Assoc. Prof. Dr. Gökhan KARS

Breast cancer is one of the most common types of malignant cancer in women worldwide. Due to the ever-increasing case of breast cancer, it is vital to develop effective treatments for primary and secondary prevention. One of the best methods that combine both types of cancer prevention method seems to be chemical intervention. In these chemical interventions, it uses natural or artificial compounds to prevent, delay or reverse the carcinogenesis process. Among the chemoprevention substances of natural origin, great importance is given to curcumin, which is a polyphenol derivative with a broad spectrum anti-cancer activity, and a juglone with naphthaquinone.

FABPs, a low molecular weight (14-15 kDa) protein group, are members of the lipid-binding protein superfamily. FABPs are found in a variety of tissues and play an important role in fatty acid metabolism and may be responsible for modulation of cell growth and proliferation. FABPs are reported to be involved in cancer development. It increases or decreases in many types of cancer and therefore it has been stated that it can be used as a tumor marker.

The aim of this study is to investigate the effects of curcumin and juglone on cell viability as a result of anticancer and cytotoxic effects in breast cancer cell lines, and the changes in FABP5 and FABP9 gene expression and protein level.

In our study, MCF-7 breast cancer cell line was treated with 0.1 - 40 μ M curcumin and 1 - 40 μ M juglone, and the MDA-MB-231 breast cancer cell line was treated with 1 - 20 μ M curcumin and 1 - 15 μ M juglone. The effects of these different doses on cell viability were determined by MTT analysis. Cells were treated with different doses of curcumin and juglone determined according to IC₅₀ values for 24 hours, and FABP5 and FABP9 gene expressions and protein levels were calculated by comparing with the control group by Real-time PCR and Western blot method.

As a result of curcumin application in the MCF-7 cell line, IC₅₀ dose was determined as 22.41 μ M and FABP5 and FABP9 gene expressions increased, as a result of juglone application IC₅₀ dose was determined as 16.27 μ M and FABP5 and FABP9 gene expression decreased at the initial dose and increased in increasing doses. In the MDA-MB-231 cell line, the IC₅₀ dose was determined as 10.43 μ M after curcumin application and 3.38 μ M as a result of juglone application, and it was determined that FABP5 and FABP9 gene expression decreased. After the expression analysis, Western blot analysis was performed using specific antibodies of FABP5 and FABP9 proteins. It was determined that curcumin application in MCF-7 cell line decreased FABP5 and FABP9 protein levels compared to the control group. Likewise, it was found that juglone application in MCF-7 cell line decreased FABP5 and FABP9

protein levels compared to the control group. In the MDA-MB-231 cell line, it was observed that FABP5 and FABP9 protein levels increased in the initial doses compared to the control group as a result of curcumin administration, but decreased in the following doses. Similarly, as a result of the application of juglone in the MDA-MB-231 cell line, it was observed that FABP5 and FABP9 protein levels increased in the initial doses compared to the control group, but decreased in the following doses.

As a result of the study, it was found that curcumin and juglone application decreased cell viability and FABP5 and FABP9 gene expressions and protein levels in both MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines.

Keywords: Breast Cancer, Curcumin, FABP5, FABP9, Juglone



ÖNSÖZ

Bu çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU yönetiminde hazırlanmış olup, Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur.

Yüksek lisans eğitimim süresince akademik açıdan yetiştirmemi sağlayan, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her konuda destek olan ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım, değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU'ya sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamın yürütülmesi aşamasında katkılarından dolayı Selçuk Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Arş. Görv. Fatma GÖKTÜRK'e teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca bana fedakârlığı öğreten, beni bu günlere getiren, her daim beni destekleyen, sabır gösteren, maddi ve manevi anlamda yardımlarını esirgemeyen ve yanımda olan yol göstericilerim biricik annem ve babama, anne karnından itibaren yaşamımın her alanında her an yanımda olup, bana yoldaş olan, desteğini hep üzerimde gördüğüm, moral ve motivasyon kaynağım biricik ikizime ve dualarıyla her zaman bana destek veren tüm aileme ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Dilek SÖYLER
KONYA-2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
ÖNSÖZ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2.1. Kanser	2
2.2. Meme Kanseri	2
2.2.1. Meme Anatomisi.....	3
2.2.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	3
2.2.3. Meme kanseri risk faktörleri.....	4
2.2.4. Meme Kanserinde Belirti ve Bulgular	6
2.2.5. Meme Kanserinde Tanı ve Teşhis	6
2.2.6. Meme Kanserinde Tedavi.....	10
2.3. Kanser Hücrelerinde Lipit Metabolizması	14
2.3.1. Yağ Asidi Bağlayıcı Proteinler (Fatty Acid Binding Proteins (FABPs)) ..	15
2.4. Juglon	27
2.5. Kurkumin	29
2.6. MCF-7 Hücre Hattı ve Özellikleri	31
2.7. MDA-MB-231 Hücre Hattı ve Özellikleri	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	34
3.1. Kullanılan Cihazlar	34
3.2. Hücre Kültürü.....	34
3.2.1. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	35
3.2.2. Hücrelerin Çözdürülmesi.....	35
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması	35
3.3. Juglon Stok Solüsyonunun Hazırlanması.....	36
3.4. Kurkumin Stok Solüsyonunun Hazırlanması.....	36
3.5. MTT Analizi.....	36
3.5.1. Juglonun Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	37
3.5.2. Kurkuminin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	37
3.6. Gen Ekspresyon Analizleri	38
3.6.1. Total RNA İzolasyonu	38
3.6.2. cDNA Sentezi	39
3.6.3. Real-Time PCR.....	40
3.7. Western Blot İle Protein Kantitasyon Analizi.....	41

3.7.1.	Hücre Lizatların Hazırlanması.....	41
3.7.2.	Hücrelerin Protein Analizleri.....	42
3.7.3.	SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması ve Elektroforez.....	42
3.7.4.	Proteinlerin Membrana Transferi.....	43
3.7.5.	Bloklama.....	43
3.7.6.	Primer ve Sekonder Antikor İnkübasyonu.....	44
3.7.7.	ECL ile Görüntüleme.....	44
3.8.	İstatistiksel Analiz.....	44
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	45
4.1.	BULGULAR	45
4.1.1.	MCF-7 Hücre Hattı Üzerinde Kurkuminin Sitotoksik Etkileri	45
4.1.2.	MCF-7 Hücre Hattı Üzerinde Juglonun Sitotoksik Etkileri	46
4.1.3.	MDA-MB-23 Hücre Hattı Üzerinde Kurkuminin Sitotoksik Etkileri	47
4.1.4.	MDA-MB-23 Hücre Hattı Üzerinde Juglonun Sitotoksik Etkileri	48
4.1.5.	MCF-7 Hücre Hattında Kurkumin Uygulamasının FABP5 ve FABP9 Gen Ekspresyonlarına Etkileri.....	49
4.1.6.	MCF-7 Hücre Hattında Juglon Uygulamasının FABP5 ve FABP9 Gen Ekspresyonlarına Etkileri.....	50
4.1.7.	MDA-MB-231 Hücre Hattında Kurkumin Uygulamasının FABP5 ve FABP9 Gen Ekspresyonlarına Etkileri	51
4.1.8.	MDA-MB-231 Hücre Hattında Juglon Uygulamasının FABP5 ve FABP9 Gen Ekspresyonlarına Etkileri	52
4.1.9.	MCF-7 Hücre Hattında Kurkumin Uygulamasının FABP5 ve FABP9 Protein Düzeylerine Etkileri	53
4.1.10.	MCF-7 Hücre Hattında Juglon Uygulamasının FABP5 ve FABP9 Protein Düzeylerine Etkileri	54
4.1.11.	MDA-MB-231 Hücre Hattında Kurkumin Uygulamasının FABP5 ve FABP9 Protein Düzeylerine Etkileri	55
4.1.12.	MDA-MB-231 Hücre Hattında Juglon Uygulamasının FABP5 ve FABP9 Protein Düzeylerine Etkileri	56
4.2.	TARTIŞMA	57
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	62
5.1.	SONUÇLAR	62
5.2.	ÖNERİLER	63
6.	KAYNAKLAR	64
	EKLER	76
	ÖZGEÇMİŞ	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
δ	: Delta
μ	: Mikro
Δ	: İnkrement
κ	: Kappa

Kısaltmalar

ACS	: American Cancer Society
ATCC	: American Type Culture Collection
BRCA1	: Meme kanseri geni 1
BRCA2	: Meme kanseri geni 2
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER	: Östrojen reseptörü
FABP5	: Yağ asidi bağlayıcı protein 5
FABP9	: Yağ asidi bağlayıcı protein 9
FBS	: Fetal sıgır serumu
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü tip 2 reseptörü
MBI	: Moleküler meme görüntüleme
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NCI	: Ulusal Kanser Enstitüsü
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
PR	: Progesteron reseptörü
RNA	: Ribonükleik asit
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Meme kanseri, dünya çapında kadınlarda en sık rastlanan kanser türlerinde birinci sıradadır ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki kadınlarda yaşam boyu 8'de 1 risk ile en sık teşhis edilen kanserdir. Yaş, aile öyküsü ve hormonlara maruz kalma, meme kanseri gelişme riskini etkiler. Kemoprevensiyon, profilaktik cerrahi, davranışsal modifikasyon ve gelişmiş sürveyans gibi yüksek riskli hastalar için çoklu risk azaltma yaklaşımları geliştirilmiştir. Meme kanserinin hormon reseptörü pozitif tümörleri, HER2 pozitif tümörleri ve hormon reseptörleri ve HER2 ekspresyonu olmayan tümörler dahil olmak üzere birçok farklı hastalık içerdiği giderek daha fazla fark edilmektedir. Meme kanserinin tedavisi tıbbi, radyasyon ve cerrahi onkologlar, patologlar ve radyologları içeren multidisipliner bir çalışma gerektirmektedir. Tedavi yaklaşımları tanıdaki hastalığın derecesine, tümörün patolojik özelliklerine ve komorbiditeler ve hasta tercihleri gibi diğer faktörlere bağlıdır. Cerrahi rezeksiyon aksiller değerlendirme ile birlikte lumpektomi veya mastektomidir; gerçekleştirilen prosedür bireysel hasta ve tümör özelliklerine bağlıdır. Radyoterapi, lumpektomi uygulanan çoğu hasta için ve mastektomi geçiren yüksek riskli hastaların bir alt grubu için bir yardımcıdır. Birden fazla sistemik tedavi seçeneği mevcuttur ve seçimi hastaya ve hastalık özelliklerine bağlıdır. Tamoksifen ve aromataz inhibitörleri gibi anti-endokrin tedavileri kemopreventizasyon ve erken evre veya metastatik hormon reseptörü pozitif meme kanseri olan hastaların tedavisi için kullanılır. Sitotoksik kemoterapi, anti-HER2 tedavisi ve diğer hedefe yönelik tedaviler de tedavi seçeneklerine dahil edilir. Genel olarak, meme kanseri olan çoğu hasta seçkin hastalık sonuçlarına sahiptir, ancak metastatik hastalığın tedavisi için daha etkili tedaviler bulmak için sürekli araştırmalara ihtiyaç vardır (Henry ve ark 2020).

Çalışmamızda antikanser etkisi olan, kurkumin ve juglonun, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında, farklı konsantrasyonlarda FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonunda ve protein düzeylerindeki değişiklikleri, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve western blot analizleriyle ortaya koymayı amaçladık. Ayrıca kurkumin ve juglon uygulamasının, FABP5 ve FABP9 protein düzeylerine etkisi değerlendirilerek, elde edilen tüm verilerinin ışığında metabolik sinyal yollarında ne gibi etkileri olduğu aydınlatılarak kanser tedavisinde umut verici bir ajan olan bu maddelerin diğer çalışmalara katkı sağlaması hedeflenmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması ile karakterize bir grup hastalıktır. Eğer yayılma kontrol edilmezse, ölümle sonuçlanabilir. Kanserinin nedenleri tam olarak anlaşılmassa da, çevresel (örn. tütün kullanımı ve aşırı vücut ağırlığı) ve genetiksel (örn. kalıtsal genetik mutasyonlar) de dahil olmak üzere, hastalığın oluşumunu arttıran birçok faktör bilinmektedir. Bu risk faktörleri, kanser büyümesini başlatmak veya teşvik etmek için aynı anda veya sırayla hareket edebilmektedir (Cokkinides ve ark 2005).

2015 yılında yaklaşık 90,5 milyon insan kanser olmuştur. Yılda yaklaşık 14,1 milyon yeni vaka ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Ölümünün % 15,7'si ile yaklaşık 8,8 milyon ölüme neden olmuştur. Erkeklerde en sık görülen kanser türleri akciğer kanseri, prostat kanseri, kolorektal kanser ve mide kanseridir. Kadınlarda en sık görülen tipler meme kanseri, kolorektal kanser, akciğer kanseri ve serviks kanseridir. Çocuklarda, non-Hodgkin lenfomanın daha sık görüldüğü Afrika hariç, akut lenfoblastik lösemi ve beyin tümörleri en yaygın olanıdır. 2012'de 15 yaş altı yaklaşık 165.000 çocuğa kanser teşhisi konmuştur. Kanser riski yaşla birlikte önemli ölçüde artar ve birçok kanser gelişmiş ülkelerde daha sık görülür (Howlader ve ark 2017).

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar için önemli bir sağlık tehdididir. Hem yüksek çözüm kaynağı hem de düşük kaynak ortamında kadınlar arasında kanserin en yaygın nedenidir ve her iki cinsiyette de her yıl dünya çapında teşhis edilen tahmini 10 milyon tümörün bir milyondan fazlasından sorumludur. Ayrıca, küresel olarak kadınlar arasında kanser ölümünün birincil nedenidir ve 2000 yılında yaklaşık 375.000 ölümden sorumludur (Bray ve ark 2004). Erken teşhis ve meme kanseri biyolojisinin moleküler temellerinin anlaşılmasındaki ilerlemelere rağmen, erken evre meme kanseri olan hastaların yaklaşık %30'unda tekrarlayan hastalık vardır. Meme kanserinin sistemik tedavisi, daha etkili ve daha az toksik tedavi sunmak için sitotoksik, hormonal ve immünoterapötik ajanları içeren tedavilerin seçilmesi hastanın ve tümörün klinik ve moleküler özelliklerinin dikkate alınmasını gerektirir (Gonzalez-Angulo ve ark 2007).

2.2.1. Meme Anatomisi

Meme; göğüs bölgesinde, ön göğüs duvarında çift halde bulunan yapıdır. Hem erkeklerde hem de kadınlarda bulunurlar, ancak ergenliği takiben kadınlarda daha belirgindir. Kadınlarda göğüsler, kadın üreme sisteminin yardımcı bezi olan meme bezlerini içerir. Meme bezleri emzirme ile ilgili anahtar yapılardır. Kadın memesi, süt kanalları ve yağ dokusu adı verilen 2 kısımdan oluşur.

Yağ Dokusu: Kadın memesi çoğunlukla yağ dokusu adı verilen yağ hücreleri koleksiyonundan oluşur. Bu doku köprücük kemiğinden koltuk altına ve göğüs kafesinin ortasına uzanır. Yağ dokusunun miktarı memenin boyutunu belirler.

Loblar, Lobüller ve Süt Kanalları: Sağlıklı bir kadın memesi, lob denilen 12-20 bölümden oluşur. Bu lobların her biri, emziren kadınlarda süt üreten bez olan birçok küçük lobülde oluşur. Hem loblar hem de lobüller, sütü meme ucuna taşımak için sap veya tüp görevi gören süt kanallarıyla bağlanır. Bu meme yapıları genellikle kanserin oluşmaya başladığı yerlerdir (NBC, 2020).

2.2.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Farklı ülkelerde meme kanseri insidans oranlarında dört ila beş kat varyasyon vardır. 2000 yılında yapılan bir çalışma ile toplanan veriler, coğrafi değişikliklerin dünya çapında meme kanseri insidansında farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. En yüksek insidans oranları, kuzey ve batı Avrupa, kuzey Amerika, Avustralya ve Yeni Zelanda ile Güney Amerika'nın güney ülkelerinde, özellikle Uruguay ve Arjantin'de görülmektedir. En düşük meme kanseri insidans oranları 100.000'de yaklaşık 10 ile Quidong sicili de dahil olmak üzere çeşitli Çin popülasyonlarında görülür. Ayrıca Zimbabve ve Uganda'daki Doğu Afrika popülasyonlarında, Kuzey Afrika'daki Cezayir'de, Tayland ve Vietnam gibi birçok Kuzeydoğu Asya popülasyonlarında, Hindistan'daki birçok popülasyonda gözlemlenen oranlar da düşüktür (100.000'de 10-30) (Bray ve ark 2004).

Amerikan Kanser Derneği, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki insidans, mortalite, hayatta kalma ve tarama verileri de dahil olmak üzere kadın meme kanseri istatistikleri hakkındaki sonuçları açıklamıştır. 2012 ve 2016 yılları arasında meme kanseri insidans oranı, büyük ölçüde lokal evre ve hormon reseptörü pozitif hastalığının artış oranları nedeniyle yılda %0,3 oranında artmıştır. Buna karşılık, meme kanseri

ölüm oranı azalmaya devam ederek 1989'dan 2017'ye kadar %40 düşmüş ve 375.900 meme kanseri ölümü gerçekleşmiştir. Özellikle düşüş hızı, beyaz kadınlarda görülen eğilimin etkisiyle 1998'den 2011'e kadar yıllık %1,9 düşüşten, 2011'den 2017'e kadar %1,3'e yavaşlamıştır. Sonuç olarak, meme kanseri mortalitesindeki siyah-beyaz eşitsizliği, son otuz yılda arttıktan sonra 2011'den beri sabit kalmıştır. Bununla birlikte, daha düşük insidans oranına (126.7 vs 130.8) rağmen ölüm oranı siyahlarda % 40 daha yüksektir (100.000'de 28.4'e karşı 20.3 ölüm); bu eşitsizlik, ölüm oranı beyazların iki katı olan 50 yaş altı siyah kadınlar arasında artmaktadır. 2013 ve 2017'yi içeren 5 yıllık dönemde, ölüm oranı Hispanik'te (yılda % 2.1), siyahlarda (% 1.5), beyazlarda (% 1.0) ve Asyalılar / Pasifik Adalarında (% 0.8) düşmüştür fakat Amerikan yerlileri / Alaska yerlileri istikrarlı devam etmiştir. Meme kanseri mortalitesindeki düşüşler, tüm kadınların yüksek kalitede korunma, erken teşhis ve tedavi hizmetlerine erişimin genişletilmesi ile hızlandırılabilirdiği düşünülmektedir (DeSantis ve ark 2019).

İrksal ve etnik azınlıklar Amerika'daki çeşitli çevre kirliliklerine yüksek seviyede maruz kalmaktadır. Meme kanseri için artan risk ile ilişkili olan farklı çevresel kimyasalların vücut yükünde etnik farklılıklar vardır. Siyahlar, birçok poliklorlu bifenil (PCB), cıva, poliamatik hidrokarbon (PAH) ve ftalat dahil olmak üzere birçok kimyasalın beyazlardan veya Meksikalı Amerikalılardan daha yüksek vücut yükü seviyelerine sahiptir. Meksikalı Amerikalılar pestisit diklorodifeniltrikloroetan (DDT)'in daha yüksek seviyelerine sahiptir (DeSantis ve ark 2016, Gray ve ark 2017). Bu tarz çevresel kimyasallarda o bölgelerde meme kanseri oranını yükseltmektedir.

2.2.3. Meme kanseri risk faktörleri

Yaşlılık ve kadın olmak meme kanseri için en güçlü risk faktörleridir. Artan riskle ilişkili potansiyel olarak değiştirilebilir faktörler arasında 18 yaşından sonra kilo alımı veya obez olma (menopoz sonrası meme kanseri için); menopozal hormon tedavisi (kombine östrojen ve progestin); alkol tüketimi; ve fiziksel hareketsizlik. Beyaz tenli kadınlar, esmer tenli kadınlara göre %20 daha fazla risk altındadır. En az bir yıl boyunca emzirme riski azaltır (Cokkinides ve ark 2005).

-Cinsiyet: Meme kanseri için kadın olmak en güçlü risklerden biridir. Günümüzde her 8 kadından 1'i hayatı boyunca meme kanseriyle karşı karşıya kalma riskiyle yaşamaktadır.

-Yaş: Meme kanseri riski yaşla birlikte artar; çoğu meme kanseri 50 yaşından sonra teşhis edilir.

-Ailede meme veya yumurtalık kanseri öyküsü: Meme kanseri kadınların yüzde 15'inde ailede pozitif bir meme kanseri öyküsü olduğu gözlemlenmiştir (Colditz ve ark 2012).

-BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki ve diğer meme kanseri yatkınlık genlerindeki mutasyonlar: Meme kanseri olan tüm kadınların % 5 ila % 10'unda BRCA1 ve BRCA2 genlerinin germline mutasyonu vardır (Blackwood ve Weber 1998).

-Alkol alımı: Ulusal Kanser Enstitüsü'ne (NCI) göre, çalışmalar sürekli olarak alkol tüketen kadınların tüketmeyenlere göre daha yüksek meme kanseri riskine sahip olduğunu bulmuştur (MNT, 2020).

-Meme doku yoğunluğu (bir mamogramda ölçülen yağlı dokuya göre glandüler doku miktarı): Yoğun göğüsler yağ dokusundan daha fazla bağ dokusuna sahiptir, bu da bazen bir mamogramda tümörleri görmeyi zorlaştırabilir. Yoğun göğüsleri olan kadınların meme kanseri olma olasılığı daha yüksektir.

-Östrojen (endojen): Östrojene uzun süre maruz kalmanın meme kanseri riskini artırdığı görülmektedir. Bu nedenle hamilelik ve emzirme döneminde östrojen maruziyetindeki düşüşten dolayı, özellikle 1 yıldan fazla bir süre boyunca emzirme, meme kanseri gelişme şansını azalttığı görülmektedir (MNT, 2020).

-Menstrüel öykü (erken regl, geç menopoza): Kadınlarda 12 yaşından önceki erken regl dönemleri ve 55 yaşından sonra menopoza başlama, kadınları daha uzun süre hormonlara maruz kaldığı için meme kanseri olma riskini artırır (Oncology 2012).

-Nulliparite: Hiç doğum yapmamış olmak veya ilk doğumun geç yaşta olması meme kanseri riskini artırmaktadır. Bu riski azaltan şey ise hamilelik ve emzirme döneminde östrojen düşüşünden kaynaklanmaktadır.

-Hormon tedavisi öyküsü: National Cancer Institute (NCI)'ın yaptığı çalışmalara göre, oral kontraseptiflerin meme kanseri riskini biraz artırabileceği gösterilmiştir. American Cancer Society (ACS)'de ise hormon replasman tedavisinin (HRT), özellikle östrojen-progesteron tedavisinin (EPT) meme kanseri riskindeki artışla ilişkili olduğu bulunmuştur.

-Obezite (menopoz sonrası): Aşırı kilolu veya obez olan yaşlı kadınların meme kanseri olma riski normal kilodaki kadınlardan daha yüksektir.

-Kişisel meme kanseri öyküsü, atipik hiperplazi gibi bazı iyi huylu meme hastalıkları: Daha önce meme kanseri hikayesi olan ve tedavi alan kadınların, diğer

memelerinde kanser olasılığının meme kanseri olmamış olanlara göre 3-4 kat daha fazladır (Campbell 2002).

-Göğüste radyasyon maruziyeti: Farklı bir kanser için radyasyon tedavisi görmek, yaşamın ilerleyen dönemlerinde meme kanseri gelişme riskini artırabilir (MNT, 2020).

2.2.4. Meme Kanserinde Belirti ve Bulgular

Erken meme kanseri genellikle hiçbir belirti göstermez ve çoğunlukla mamografi taraması ile teşhis edilir. Semptomlar ortaya çıktığında, en yaygın olanı memedeki ağrısız bir yumru veya kitledir. Diğer semptomlar arasında kalınlaşma, şişme veya kızarıklık gibi memede kalıcı değişiklikler ve spontan akıntı (özellikle kanlıysa), ölçeklilik veya retraksiyon gibi meme anormallikleri yer alabilir (MNT, 2020).

2.2.5. Meme Kanserinde Tanı ve Teşhis

1-Mamografi, meme kanserini erken bir aşamada tespit etmek için kullanılan düşük dozda bir x-ışını prosedürüdür. Bir mamografi sonucunda, göğüs kanseri küçükken ve hatta bir yumru hissedilmeden önce sıklıkla bulunabilir veya tespit edilebilir. Erken tanı meme kanserinden ölme riskini azaltır ve tedavi seçeneklerini artırır. Kontrollü çalışmalar sonucu mamografinin, meme kanseri ölümünü % 30 azalttığı tespit edilmiştir (Tabár ve ark 2011). Bununla birlikte, herhangi bir tarama aracı gibi, mamografi de mükemmel değildir. Kanser kaçırabilir (yanlış negatif) veya kanser yokluğunda anormal görünebilir (yanlış pozitif); taranan kadınların yaklaşık %12'sinde anormal mamogram vardır, ancak anormal mamogramı olan kadınlarında %5'inde kanser vardır. Ortalama meme kanseri riski taşıyan kadınlar için, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 40 ila 44 yaşlarında yıllık mamografiye başlamalarını önerir (Cokkinides ve ark 2005).

2-Meme ultrasonu, memenin içinin bilgisayarda resmini yapmak için ses dalgalarını kullanır. Mamogramlarda tanımlanması daha zor olan sıvı dolu kistlerin, katı kütleli tümörlerle ayrımının yapılmasını sağlar. Ultrason yaygın olarak kullanılır, kolaydır ve bir kişiyi radyasyona maruz bırakmaz. Ayrıca diğer birçok seçenekten daha ucuzdur (Cokkinides ve ark 2005).

3-Meme MRI (manyetik rezonans görüntüleme), memenin fotoğraflarını çekmek için mıknatıslar ve radyo dalgaları kullanır. MRI, meme kanseri olma riski

yüksek olan kadınları taramak için mamogramlarla birlikte kullanılır. Meme MRI'leri kanser olmasa bile anormal görünebileceğinden, ortalama risk altındaki kadınlar için kullanılmazlar (Cokkinides ve ark 2005).

4-Klinik meme muayenesi, bir doktor veya hemşire tarafından, topaklar veya diğer değişiklikleri hissetmek için ellerin kullanıldığı bir muayenedir (Cokkinides ve ark 2005).

5-Moleküler meme görüntüleme (MBI), Sintiammografi veya göğse özgü gama görüntüleme (BSGI) olarak da bilinen meme için bir nükleer tıp görüntüleme testidir. Kana radyoaktif bir kimyasal enjekte edilir ve göğsü görmek için özel bir kamera kullanılır. Bu test esas olarak meme problemlerini (bir yumru veya anormal mamogram gibi) takip etmenin veya teşhis konmuş meme kanserinin derecesini belirlemenin bir yolu olarak incelenmektedir. Potansiyel bir dezavantaj, tüm vücudu radyasyona maruz bırakmasıdır, bu nedenle bu testin her yıl tarama için kullanılması muhtemel değildir (Cokkinides ve ark 2005).

6-Pozitron emisyon mamografisi (PEM), PET taramasına çok benzeyen memenin daha yeni bir görüntüleme testidir. Radyoaktif bir partiküle bağlı bir şeker formu, kanser hücrelerini tespit etmek için kana enjekte edilir. Bir PEM taraması, memedeki küçük kanser hücresi kümelerini daha iyi tespit edebilir. MBI'da olduğu gibi, tüm vücudu radyasyona maruz bırakır, bu nedenle meme kanseri taraması için her yıl kullanılabilecek bir test olması pek olası değildir (Cokkinides ve ark 2005).

7-Kontrastlı spektral mamografi (CESM) olarak da bilinen kontrastlı mamografi (CEM), iyot içeren bir kontrast boyanın, iki grup mamogram (farklı enerji seviyeleri kullanarak) alınmadan önce, damara enjekte edildiği daha yeni bir testtir. Kontrast, x-ışınlarını göğüslerdeki anormal alanları göstermesine yardımcı olabilir. CEM, mamografiye kıyasla gelişmiş bir duyarlılığa sahiptir ve özgüllüğü artırır (Gilbert ve Pinker-Domenig 2019). Bu test, standart bir mamogramda anormal görünen alanlara daha iyi bakmak veya meme kanseri teşhisi konmuş kadınlarda bir tümörün boyutunun değerlendirilmesine yardımcı olmak için kullanılabilir. Jochelson ve diğ. MRI ek tümör odaklarının saptanmasında daha az duyarlı olmasına rağmen, indeks kanserinin saptanmasında MRI ve CEM arasında eşit duyarlılık saptamıştır (Jochelson ve ark 2013). CEM daha yaygın olarak kullanılabilir, çünkü yapılması daha hızlıdır ve MRI'dan daha ucuzdur (Cokkinides ve ark 2005).

8-Optik görüntüleme testleri ışığı göğse geçirir ve daha sonra dokuya dönen veya dokudan geçen ışığı ölçer. Teknik radyasyon kullanmaz ve meme kompresyonu gerektirmez (Cokkinides ve ark 2005).

9-Elektriksel empedans görüntüleme (EIT) memeyi elektriksel iletkenlik açısından tarar. Meme kanseri hücrelerinin elektriği normal hücrelerden farklı ilettiği fikrine dayanır. Test memeden çok küçük bir elektrik akımı geçirir ve ardından memenin derisinde tespit eder. Bu, cilde bantlanmış küçük elektrotlar kullanılarak yapılır. EIT'de radyasyon kullanılmaz veya göğüsleri sıkıştırmaz (Cokkinides ve ark 2005).

10-Elastografi, ultrason muayenesinin bir parçası olarak yapılabilecek bir testtir. Meme kanserlerinin çevredeki meme dokusundan daha sıkı ve sert olma eğiliminde olduğu fikrine dayanır. Bu test için meme hafifçe sıkıştırılır ve ultrason şüpheli bir alanın ne kadar sağlam olduğunu gösterebilir. Bu test, bölgenin kanser veya iyi huylu (kanserli olmayan) bir tümör olma olasılığının daha yüksek olduğunu söylemekte yararlı olabilir (Cokkinides ve ark 2005).

11-Biyopsi, mikroskop altında bakılması ve daha fazla test yapılması için memeden doku veya sıvının alındığı bir testtir. Bu, hücrelerin kanserli olup olmadığını gösterir. Bu nedenle, biyopsi, kanserin hormona duyarlı olup olmadığı da dahil olmak üzere hangi kanser türünün geliştiğini gösterir. Teşhis aynı zamanda kanseri oluşturmak için evrelemeyi içerir: bir tümörün büyüklüğünü, ne kadar yayıldığını, invaziv veya noninvaziv olup olmadığını gösterir ve bir kişinin iyileşme şansının ve ideal tedavi sürecinin bir resmini sunar (Cokkinides ve ark 2005).

12-Östrojen ve progesteron reseptör testi: Kanser dokusunda östrojen ve progesteron (hormon) reseptörlerinin miktarını ölçmek için bir testtir. Normalden daha fazla östrojen ve progesteron reseptörü varsa, kansere östrojen veya progesteron reseptörü pozitif(+) denir. Bu tip meme kanseri daha hızlı büyüyebilir. Test sonuçları östrojen ve progesteronu bloke ederek tedavinin kanserin büyümesini engelleyip engelleyemeyeceğini göstermektedir (Cokkinides ve ark 2005).

13-İnsan epidermal büyüme faktörü tip 2 reseptörü (HER2 / neu) testi: Bir doku örneğinde HER2 / neu geni ve HER2 / neu protein miktarını ölçen bir laboratuvar testidir. Normalden daha fazla HER2 / neu geni veya daha yüksek HER2 / neu proteini varsa, kansere HER2 / neu (+) pozitif denir. Bu tip meme kanseri daha hızlı büyüyebilir ve vücudun diğer bölgelerine yayılma olasılığı daha yüksektir. Kanser, trastuzumab ve

pertuzumab gibi HER2 / neu proteinini hedefleyen ilaçlarla tedavi edilebilir (Cokkinides ve ark 2005).

14-Multigene testleri: Aynı anda birçok genin aktivitesine bakmak için doku örneklerinin çalışıldığı testlerdir. Bu testler, kanserin vücudun diğer bölgelerine yayılıp yayılmayacağını veya tekrarlayacağını tahmin etmeye yardımcı olabilir. Birçok çeşit multigene testi vardır (Cokkinides ve ark 2005).

-Onkotip DX: Bu test, östrojen reseptörü pozitif ve lenf nod negatif olan erken evre meme kanserinin vücudun diğer bölgelerine yayılıp yayılmayacağını tahmin etmeye yardımcı olur. Kanserın yayılma riski yüksekse, riski azaltmak için kemoterapi verilebilir (Cokkinides ve ark 2005).

-MammaPrint: Lenf nodlarına yayılmamış veya 3 veya daha az lenf noduna yayılmış erken evre invaziv meme kanseri olan kadınların meme kanseri dokusunda 70 farklı gen aktivitesine bakılan bir laboratuvar testidir. Bu genlerin aktivite seviyesi, meme kanserinin vücudun diğer bölgelerine yayılıp yayılmayacağını veya geri gelip gelmeyeceğini tahmin etmeye yardımcı olur. Test, kanserin yayılma veya geri dönme riskinin yüksek olduğunu gösteriyorsa, riski azaltmak için kemoterapi verilebilir (Cokkinides ve ark 2005).

Bu testlere dayanarak, meme kanseri aşağıdaki tiplerden biri olarak tanımlanır:

-Hormon reseptörü pozitif veya negatif (ER +/-, PR +/-): Hormon reseptörü pozitif (+) veya hormon pozitif meme kanseri hücrelerinde östrojen (ER) veya progesteron (PR) reseptörleri veya her ikisi de bulunur. Hormon reseptörü negatif (-) meme kanserlerinde ise ne östrojen ne de progesteron reseptörü yoktur. Hormon pozitif meme kanserleri, östrojen seviyelerini düşüren veya östrojen reseptörlerini bloke eden hormon tedavisi ilaçlarıyla tedavi edilebilir ancak hormon negatif meme kanserlerinde bu tedavi yararlı değildir. Hormon reseptörü pozitif kanserler, hormon reseptörü negatif olanlardan daha yavaş büyüme eğilimindedir. Hormon reseptörü-negatif kanserleri henüz menopoza geçirmemiş kadınlarda daha yaygındır (Cokkinides ve ark 2005).

-HER2 / neu pozitif veya HER2 / neu negatif: Normal HER2 protein seviyelerinden daha yüksek olan meme kanseri hücrelerine HER2 pozitif (+) denir. Bu kanserler diğer meme kanserlerinden daha hızlı büyüme ve yayılma eğilimindedir, ancak HER2 proteinini hedefleyen ilaçlarla tedaviye yanıt verme olasılığı çok daha yüksektir (Cokkinides ve ark 2005).

-Üçlü negatif veya üçlü pozitif (östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve HER2 / neu negatif veya pozitif): Üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin östrojen

veya progesteron reseptörleri yoktur ve ayrıca HER2 adı verilen proteinden çok fazla üretmezler. Bu kanserler, 40 yaşından küçük, Afrikalı-Amerikalı olan veya BRCA 1 geninde mutasyonu olan kadınlarda daha yaygındır (Li ve ark 2017). Üçlü negatif meme kanserleri, diğer meme kanseri türlerinin çoğundan daha hızlı büyür ve yayılır. Kanser hücrelerinde hormon reseptörleri bulunmadığından, hormon tedavisi bu kanserlerin tedavisinde yararlı değildir. Ve çok fazla HER2'ye sahip olmadıkları için, HER2'yi hedefleyen ilaçlar da yardımcı olmaz. Kemoterapi faydalı olabilir. Üçlü pozitif kanserler ER-pozitif, PR-pozitif ve HER2-pozitifdir. Bu kanserler, HER2'yi hedefleyen ilaçların yanı sıra hormon ilaçlarıyla da tedavi edilebilir (Henry ve ark 2020).

TNM sistemi, primer tümörün büyüklüğünü ve kanserin yakındaki lenf düğümlerine veya vücudun diğer bölgelerine yayılmasını tanımlamak için kullanılır. Meme kanseri için TNM sistemi tümörü şu şekilde tanımlar (Cokkinides ve ark 2005):

- Tümör (T): Tümörün büyüklüğü ve yeri.
- Lenf Düğümü (N): Kanser yayıldığı lenf düğümlerinin büyüklüğü ve yeri.
- Metastaz (M): Kanser vücudun diğer bölgelerine yayılması

2.2.6. Meme Kanserinde Tedavi

Meme kanserinde tedavi şekilleri; cerrahi, radyasyon tedavisi, kemoterapi, hormon tedavisi, hedeflendirilmiş terapi ve immünoterapi olarak alt başlıklara ayrılır.

A-Cerrahi

Cerrahi tedavi, genellikle tümör özelliklerine (ör: boyut ve yayılma boyutu) ve hasta tercihine bağlı olarak değişiklik gösteren, doktorların kanser dokusunu kesip çıkardığı bir ameliyattır. Cerrahi tedaviyi içeren 2 tane ameliyat türü vardır. Lumpektomi, tümörün ve çevresinde az miktarda sağlıklı dokunun çıkarılması işlemidir. Lumpektomi, kanserin yayılmasını önlemeye yardımcı olabilir. Tümör küçükse ve çevresindeki dokudan ayrılması kolaysa bu bir seçenek olabilir. Mastektomi, basit bir mastektomi, lobüller, kanallar, yağ dokusu, meme başı, areola ve bazı cildin çıkarılmasını içerir. Bazı tiplerde, cerrah göğüs duvarındaki lenf düğümlerini ve kasları da çıkarabilir. Rekonstrüksiyon, mastektomiden sonra bir cerrah memeyi daha doğal görünmesi için yeniden yapılandırabilir. Vücudun başka bir kısmından meme implantı veya dokusu kullanabilirler (Cokkinides ve ark 2005).

Bir veya daha fazla koltuk altı lenf nodu genellikle tümörün memenin ötesine yayılıp yayılmadığını belirlemek için ameliyat sırasında değerlendirilir. Meme koruyucu

cerrahi geçiren hastaların çoğunda radyasyon önerilir. Erken evre meme kanseri (cilde, göğüs duvarına veya uzak organlara yayılmamış) olan kadınlar için, çalışmalar uzun süreli sağ kalımda meme koruyucu cerrahinin artı radyasyon tedavisinin sonuçlarının mastektomiye eşdeğer olduğunu göstermektedir. Mastektomi uygulanan hastaların çoğunda radyasyona ihtiyaç duyulmasa da, bazen tümör büyük olduğunda veya lenf düğümleri söz konusu olduğunda önerilir. Meme rekonstrüksiyonunu seçen mastektomi geçiren kadınların, meme şeklini düzeltmek için kullanılan doku veya implant tipi de dahil olmak üzere çeşitli seçenekleri vardır. Rekonstrüksiyon mastektomi sırasında (hemen rekonstrüksiyon) veya daha sonra ikinci bir prosedür olarak (gecikmiş rekonstrüksiyon) yapılabilir, ancak genellikle birden fazla ameliyat gerektirir. Kanser evresine, alt tipine ve bazen diğer test sonuçlarına (örneğin, Oncotype DX) bağlı olarak, tedavi ayrıca kemoterapi (ameliyattan önce veya sonra), hormon (anti-östrojen) tedavisi, hedeflenmiş tedavi veya daha yakın zamanda immünoterapi (örneğin kontrol noktası inhibitörleri) içerebilir (Cokkinides ve ark 2005).

B-Radyasyon Tedavisi

Radyasyon tedavisi, kanser hücrelerini öldürmek veya büyümelerini önlemek için yüksek enerjili x-ışınları veya diğer radyasyon türlerini kullanan bir kanser tedavisidir. İki çeşit radyasyon terapisi vardır. Dış radyasyon tedavisi, kansere doğru radyasyon göndermek için vücudun dışında bir makine kullanır. Dahili radyasyon terapisi, doğrudan kanserin içine veya yakınına yerleştirilen iğneler, tohumlar, teller veya kateterlerle kapatılmış radyoaktif bir madde kullanır.

Radyasyon tedavisinin verilmesi, tedavi edilen kanserin tipine ve evresine bağlıdır. Dış radyasyon tedavisi meme kanserini tedavi etmek için kullanılır. Stronsiyum-89 (radyonüklid) ile iç radyasyon tedavisi, kemiklere yayılan meme kanserinin neden olduğu kemik ağrısını hafifletmek için kullanılır. Stronsiyum-89 bir damara enjekte edilir ve kemiklerin yüzeyine gider. Radyasyon salınır ve kemiklerdeki kanser hücrelerini öldürür (Cokkinides ve ark 2005).

C-Kemoterapi

Kemoterapi, hücreleri öldürerek veya bölünmelerini durdurarak kanser hücrelerinin büyümesini durdurmak için ilaçlar kullanan bir kanser tedavisidir. Kemoterapi ağızdan alındığında veya bir damar veya kas içine enjekte edildiğinde, ilaçlar kan dolaşımına girer ve vücuttaki kanser hücrelerine ulaşabilir (sistemik kemoterapi). Kemoterapi doğrudan beyin omurilik sıvısına, bir organa veya karın gibi bir vücut boşluğuna yerleştirildiğinde, ilaçlar esas olarak bu bölgelerdeki kanser

hücrelerini etkiler (bölgesel kemoterapi). Kemoterapinin nasıl verildiği, tedavi edilen kanserin tipine ve evresine bağlıdır. Meme kanserinin tedavisinde sistemik kemoterapi kullanılır (Cokkinides ve ark 2005).

D-Hormon tedavisi

Hormon tedavisi, hormonları ortadan kaldıran veya eylemlerini engelleyen ve kanser hücrelerinin büyümesini durduran bir kanser tedavisidir. Hormonlar, vücuttaki bezler tarafından yapılan ve kan dolaşımında dolaşan maddelerdir. Bazı hormonlar bazı kanserlerin büyümesine neden olabilir. Testler, kanser hücrelerinin hormonların bağlanabileceği yerlere sahip olduğunu gösteriyorsa (reseptörler), hormon üretimini azaltmak veya çalışmalarını engellemek için ilaçlar, cerrahi veya radyasyon tedavisi kullanılır. Bazı meme kanserlerini büyüten östrojen hormonu esas olarak yumurtalıklar tarafından yapılır. Yumurtalıkların östrojen üretmesini durdurmak için yapılan tedaviye yumurtalık ablasyonu denir. Hormon reseptörü pozitif meme kanseri olan kadınlarda, en az 5 yıllık adjuvan hormon tedavisi kanserin tekrarlama (geri gelme) riskini azaltır.

-Tamoksifen ile hormon tedavisi genellikle ameliyatla çıkarılabilen erken lokalize meme kanseri olan hastalara ve metastatik meme kanseri (vücudun diğer bölgelerine yayılmış kanser) olanlara verilir. Tamoksifen veya östrojenlerle hormon tedavisi vücudun her tarafındaki hücreler üzerinde etkili olabilir ve endometriyal kanser gelişme şansını artırabilir. Tamoksifen alan kadınlar, herhangi bir kanser belirtisi aramak için her yıl pelvik muayeneye tabi tutulmalıdır.

-Hormon reseptörü pozitif meme kanseri teşhisi konmuş bazı premenopozal kadınlara luteinize edici bir hormon salgılatıcı hormon (LHRH) agonisti ile hormon tedavisi verilir. LHRH agonistleri vücudun östrojen ve progesteronunu azaltır.

-Hormon reseptörü pozitif meme kanseri olan bazı postmenopozal kadınlara aromataz inhibitörü ile hormon tedavisi uygulanır. Aromataz inhibitörleri, aromataz adı verilen bir enzimi androjenin östrojene dönüştürmesini engelleyerek vücudun östrojenini azaltır. Anastrozol, letrozol ve eksemestan, aromataz inhibitörleri türüdür (Cokkinides ve ark 2005).

Diğer hormon tedavisi türleri arasında megestrol asetat veya fulvestrant gibi anti-östrojen tedavisi yer alır.

E-Hedeflendirilmiş Terapi

HER2 yolunu hedefleyen antikor tedavisi 1990'lardan beri kullanılmaktadır ve HER2-pozitif metastatik meme kanseri tedavisinde devrim yaratmıştır. Birkaç HER2

hedefli ajan (örn., Trastuzumab, pertuzumab, ado-trastuzumab emtansin, lapatinib) bu hastalığın tedavisi için onaylanmıştır (Cokkinides ve ark 2005).

1-Monoklonal antikör tedavisi

-Trastuzumab: Meme kanseri olan hastaların yaklaşık % 20 ila % 25'inde HER2 / neu'yu aşırı eksprese eden tümörler vardır. Trastuzumab, HER2 / neu reseptörüne bağlanan bir monoklonal antikördür (Pegram ve ark 1998). Daha önce tümörleri HER2 / neu eksprese eden sitotoksik kemoterapi ile tedavi edilen hastalarda, trastuzumabın tek bir ajan olarak uygulanması % 21'lik bir yanıt oranı ile sonuçlanmıştır.

-Pertuzumab: Pertuzumab, HER2 hücre dışı alanında trastuzumabdan farklı bir epitopa bağlanan bir monoklonal antikördür. Pertuzumabın HER2'ye bağlanması, diğer ligandla aktive edilmiş HER reseptörleri, özellikle HER3 ile dimerizasyonu önler.

-Ado-trastuzumab emtansin: Ado-trastuzumab emtansin (T-DM1), trastuzumabın HER2 hedefli antitümör özelliklerini mikrotübül engelleyici ajan DM1'in sitotoksik aktivitesi ile birleştiren bir antikör-ilaç konjugatıdır. T-DM1, HER2'yi aşırı eksprese eden hücrelere spesifik hücre içi ilaç iletimine izin verir, bu da terapötik indeksi potansiyel olarak iyileştirir ve normal dokunun maruz kalmasını en aza indirir (Cokkinides ve ark 2005).

2-Tirosin kinaz inhibitörü tedavisi

-Lapatinib, HER2 / neu ve epidermal büyüme faktörü reseptörünün oral yoldan verilen bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Lapatinib artı kapesitabin, trastuzumab tedavisinden sonra ilerleyen HER2-pozitif metastatik meme kanseri olan hastalarda aktivite göstermiştir (Cokkinides ve ark 2005).

3-Germline BRCA Mutasyonu

-Olaparib ve talazoparib PARP inhibitörleri olarak bilinen ilaçlardır. PARP proteinleri normalde hücrelerin içindeki hasarlı DNA'nın onarımına yardımcı olur. BRCA genleri (BRCA1 ve BRCA2) ayrıca DNA'nın onarılmasına yardımcı olur (biraz farklı bir şekilde), ancak bu genlerden birinde mutasyonlar bunun olmasını engelleyebilir. PARP inhibitörleri, PARP proteinlerini bloke ederek çalışır. Mutasyona uğramış bir BRCA genine sahip tümör hücreleri zaten hasarlı DNA'yı onarmakta zorlandığından, PARP proteinlerini bloke etmek genellikle bu hücrelerin ölümüne yol açar (Cokkinides ve ark 2005).

F-İmmünoterapi

İmmünoterapi, bir kişinin kendi bağışıklık sistemini kanser hücrelerini daha etkili bir şekilde tanıması ve yok etmesini uyarmak için ilaçların kullanılmasıdır.

İmmün sisteminin önemli bir görevi, bağışıklık sistemi hücrelerinin vücuttaki normal hücrelere saldırmasını önlemektir. Bu nedenle, bir immün yanıt başlatmak için bağışıklık hücrelerinde açılması veya kapatılması gereken proteinler olan “kontrol noktaları” kullanır. Meme kanseri hücreleri bazen immün sistem tarafından saldırıya uğramamak için bu kontrol noktalarını kullanır. İmmünoterapi ilaçları bu kontrol noktalarını hedefleyen ilaçlar, meme kanseri hücrelerine karşı immün yanıtını geri kazanmaya yardımcı olur. İmmünoterapi, bazı meme kanseri tiplerini tedavi etmek için kullanılabilir.

-Atezolizumab, bazı tümör hücrelerinde ve bağışıklık hücrelerinde bulunan bir protein olan PD-L1'i hedefler. Bu proteini bloke etmek, meme kanseri hücrelerine karşı bağışıklık tepkisini artırmaya yardımcı olabilir. Bu, bazı tümörleri küçültebilir veya büyümelerini yavaşlatabilir. Atezolizumab, tümör PD-L1 proteini yaptığında gelişmiş üçlü negatif meme kanseri için Abraxane (albümine bağlı paklitaksel) ile birlikte kullanılabilir. Bazı insanlarda ilk tedavinin bir parçası olarak kullanılabilir. Atezolizumab, 2 haftada bir intravenöz (IV) infüzyon olarak verilir (Cokkinides ve ark 2005).

2.3. Kanser Hücrelerinde Lipit Metabolizması

Kanser hücreleri, proliferasyon ve sağkalım için anormal taleplerini karşılamak üzere metabolik yollarını yeniden programlarlar. Kanser hücrelerinin hızlandırılmış proliferasyon hızlarını desteklemek için daha yüksek bir metabolizma hızına ihtiyaç duydukları uzun zamandır bilinmektedir. En bilinen metabolik değişiklik, 1920'lerde Otto Warburg tarafından ilk kez açıklanan “Warburg etkisi” olarak adlandırılan bir olgudur. Kanser hücrelerinin normal hücrelere kıyasla normoksik durumda bile glikoliz için daha fazla glikoz aldığını ve kullandığını bildirilmiştir. Son zamanlarda, aerobik glikolizin, kanser hücrelerine sadece enerji sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda karbonhidratlar, proteinler, lipitler ve nükleik asitler gibi makromolekül sentezine yapı taşları sağlamak için temel hücresel metabolizma olduğu ileri sürülmüştür. Son zamanlarda, lipit metabolizmasındaki değişikliklerin kanser gelişimi ve metastazı üzerinde önemli rol oynadığı ortaya çıkmıştır. Bu değişiklik malign hücrelerin diğer bir ortak özelliği olarak da kabul görmektedir (Currie ve ark 2013).

Glikoz metabolizması gibi, kanser hücrelerindeki lipit metabolizması da yaygın onkogenik sinyal yolları tarafından düzenlenir ve tümörlerin başlaması ve ilerlemesi

için önemli olduğuna inanılmaktadır. Bazı lipojenik enzimler, yağ asitlerini ve bunların türevlerini sentezlemek için glikoz ve glutamin metabolizmasından üretilen azaltılmış nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve asetil-CoA'yı kullanır. Bu nedenle, kanser hücrelerinde artan lipogenez sadece lipit metabolize edici enzimlerin artışından kaynaklanmakla kalmaz, aynı zamanda diğer yaygın metabolik yollara ve bunlarla ilişkili hücre sinyal yollarına da doğrudan bağlıdır (Zhang ve Du 2012).

De novo yağ asidi sentezini yapabilen tek memeli enzimi olan yağ asidi sentaz (FAS), çoğu insan karsinomunda yüksek oranda eksprese edilir. FAS, meme ve prostat kanserinde kötü prognoz ile ilişkilidir. Bu nedenle, kanserde FAS ve yağ asidi metabolizması, kanserin potansiyel tanı ve tedavisinde odak noktası olmuştur (Zhang ve Du 2012).

Hem lipid biyosentetik hem de mobilize edici aktivitelerin kanser hücrelerinde neden upregüle olduğu hala belirsizdir. Bu yolların düzenlenmesi ile ilgili daha fazla araştırma, antikanser ajanların gelişimi için yeni terapötik fırsatlar sunacaktır. Aynı zamanda, tümöre bağlı lipit metabolizması özellikleri insan kanserlerinin tanı ve prognozunda kullanılabilir (Zhang ve Du 2012).

2.3.1. Yağ Asidi Bağlayıcı Proteinler (Fatty Acid Binding Proteins (FABPs))

Düşük moleküler ağırlıklı (14-15 kDa) bir protein grubu olan FABP'ler, lipit bağlayıcı protein süper ailesinin üyeleridir. FABP'ler çeşitli dokularda bulunur ve yağ asidi metabolizmasında önemli bir rol oynar (Hashimoto ve ark. 2004). Lipit şaperonları olan FABPler doymuş ve doymamış uzun zincirli yağ asitlerine ve eikosanoidler, endokannabinoidler ve monoasilgliseroller gibi diğer hidrofobik ligandlara bağlanır (Makowski ve Hotamisligil 2005). Bu korunmuş sitoplazmik proteinler, mitokondri, peroksizom, endoplazmik retikulum ve çekirdek gibi farklı hücre organellerine yağ asidi taşınmasında aracılık eder. Hücrelerdeki yağ asidi hareketi, hücresel fonksiyonların birçok yönünü etkileyen karmaşık ve dinamik bir işlemdir (Furuhashi ve Hotamisligil 2008).

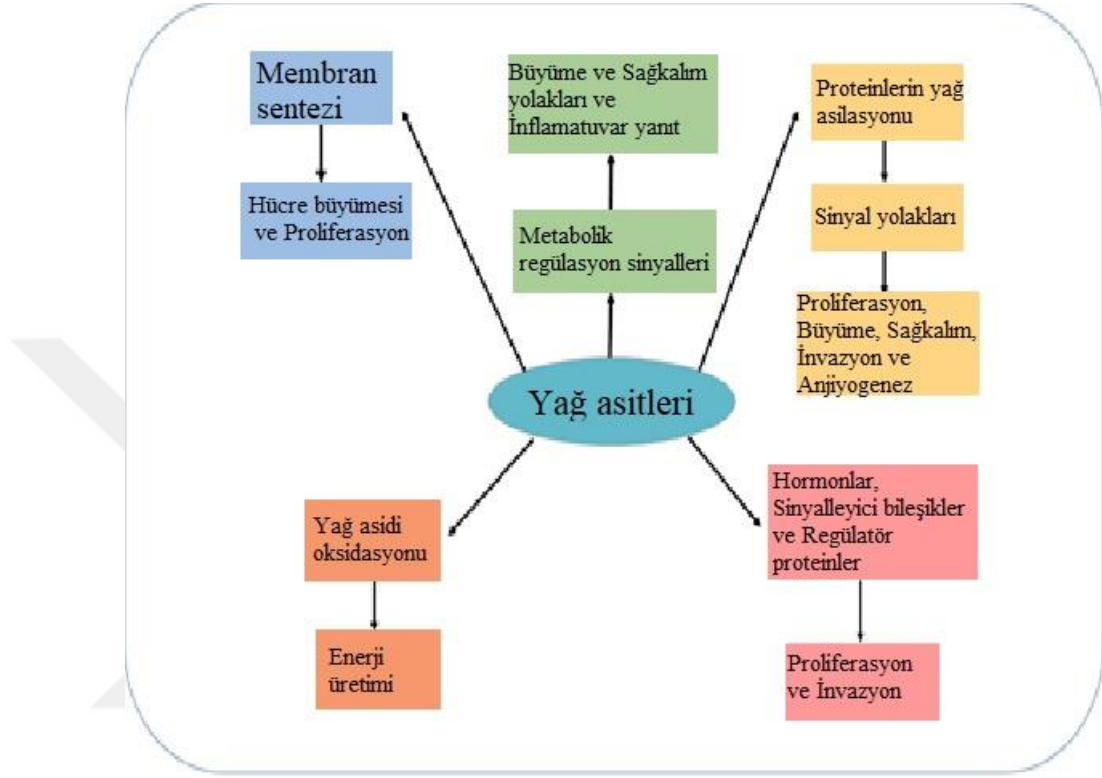
FABP'lerin genel gen yapısı, üç intron ile ayrılmış dört eksondan oluşmuş ve yüksek oranda korunmuş bir yapıya sahiptir. Eksonların ve intronların pozisyonu, tüm FABP'ler için benzerdir, ancak intron uzunluğu izoformlar arasında değişkenlik göstermektedir. Genellikle, eksonların uzunlukları nispeten kısadır, ekson 1 ile 23-24 amino asit, ekson 2 ile 57-58 amino asit, ekson 3 ile 34-36 amino asit ve ekson 4 ile 16-

17 amino asit kodlanmaktadır. İnsan FABP3, FABP8 ve FABP2'deki intron 1 uzunluğu, sırasıyla 3.4, 2.3 ve 1.2 kilobaz (kb) uzunluğuna sahip olmasıyla, önemli ölçüde farklılık göstermektedir (Smathers ve Petersen 2011). (FABP ailesi üyelerinin kromozomal haritalaması hem farklı yerlerde hem de aynı kromozom bölgesinde olduğunu göstermiştir. FABP1, 2, 3, 6 ve 7'nin tümü insandaki ayrı kromozomlarda bulunurken, FABP4, 5, 8 ve 9'un tümü kromozom 8q21'de lokalize halde bulunur. Bu genleri içeren kromozom içinde daha ayrıntılı bir analiz, 300.000 baz çifti (bp) bölgesi içinde kümelenildiğini ortaya çıkarmıştır. Aynı bölgede, FABP8'e homolog olan ekstra bir gen tanımlanmıştır. Bu homolog gen, insan FABP ailesinin onuncu üyesi FABP12 olarak adlandırılmıştır. Protein kodlayan FABP'lere ek olarak, FABP3 ve FABP5 için psödogenler tanımlanmıştır ve insanlarda fonksiyonel proteinleri kodlamamaktadır (Smathers ve Petersen 2011).

Gene	Common name	Aliases for proteins	Previous symbols	Localisation	Chromosomal location	OMIM ID/ HGNC ID	Number of amino acids
FABP1	Liver FABP	L-FABP, hepatic FABP, Z protein, heme-binding protein		Liver, intestine, pancreas, kidney, lung, stomach	2p11	134650/3555	127
FABP2	Intestinal FABP	I-FABP, gut FABP (gFABP)		Intestine, liver	4q28–q31	134640/3556	132
FABP3	Heart FABP	H-FABP, O-FABP, mammary-derived growth inhibitor (MDGI)	FABP11	Cardiac and skeletal muscle, brain, kidney, lung, stomach, testis, adrenal gland, mammary gland, placenta, ovary, brown adipose tissue	1p33–p31	134650/3557	133
FABP4	Adipocyte FABP	A-FABP, aP2		Adipocytes, macrophages, dendritic cells, skeletal muscle fibres	8q21	600434/3559	132
FABP5	Epidermal FABP	E-FABP, keratinocyte-type FABP (KFABP), psoriasis-associated-FABP (PA-FABP)		Skin, tongue, adipocyte, macrophage, dendritic cells, mammary gland, brain, stomach, intestine, kidney, liver, lung, heart, skeletal muscle, testis, retina, lens, spleen, placenta	8q21.13	605168/3560	135
FABP6	Ileal FABP	II-FABP, ileal lipid-binding protein (ILLBP), intestinal bile acid-binding protein (I-BABP), gastrin		Ileum, ovary, adrenal gland, stomach	5q23–q35	600422/3561	128
FABP7	Brain FABP	B-FABP, brain lipid-binding protein (BLBP), MRG		Brain, central nervous system (CNS), glial cell, retina, mammary gland	6q22–q23	602965/3562	132
FABP8	Myelin FABP	M-FABP, peripheral myelin protein 2 (PMP2)		Peripheral nervous system, Schwann cells	8q21.3–q22.1	170715/9117	132
FABP9	Testis FABP	T-FABP, testis lipid-binding protein (TLBP), PERF, PERF15		Testis, salivary gland, mammary gland	8q21.13	—/3563	132
FABP12	—	—		Retinoblastoma cell, ^a retina (ganglion and inner nuclear layer cells), ^a testicular germ cells, ^b cerebral cortex, ^b kidney, ^b epididymis ^b	8q21.13	—/34524	140

Şekil 2.1. İnsan Geni Nomenklatür Komitesi (HGNC) ve İnsanlarda Çevrimiçi Mendelyal Kalıtım (OMIM) veritabanlarında listendiği şekliyle insan FABP genleri (^a: insandaki ekspresyonu, ^b: kemirgenlerdeki ekspresyonu) (Smathers ve Petersen 2011)

FABP'ler ayrıca hücre büyümesinin ve çoğalmasının modülasyonundan sorumlu olabilirler. FABP'lerin kanser gelişiminde yer aldığı bildirilmektedir. Prostat, mesane ve böbrek hücreli karsinom gibi kanser hücrelerinde artış gösterdiği bulunmuştur (Kawaguchi ve ark 2016) ve bazı durumlarda tümör markörü olarak kullanılabilirler.



Şekil 2.2. Organizmadaki yağ asidinin çeşitli fonksiyonları (Amiri ve ark 2018)

1-FABP1

Karaciğer yağ asidi bağlayıcı protein (L-FABP) veya FABP1, hepatositlerin ve dış mitokondriyal zarın sitoplazmasında ve ayrıca enterositlerde bol miktarda ekspresyonu bulunan çözünür bir proteindir (Santos ve Schulze 2012). Ayrıca, FABP1 böbreğin tübüler hücreleri ve akciğerin alveoler epiteli gibi birçok dokuda bulunur (Chmurzyńska 2006, Furuhashi ve Hotamisligil 2008). FABP ailesinin diğer üyelerinin aksine, FABP1 iki uzun zincirli yağ asidi molekülüne (LCFA) bağlanır (Kawaguchi ve ark 2016). Birincil ve ikincil yağ asidi bağlama bölgelerinin birbirine bağımlı olduğu görülmektedir, çünkü her iki alifatik zincir, ligandlar, enzimler veya membran sistemleri ile uygun hidrofobik etkileşimler oluşturur (De Santis ve ark 2004). Bir arabulucu olarak, FABP1 hipolipidemik ilaçlar, lipitler ve yağ asitleri gibi ligandlarını çekirdek

gibi farklı hücresel bölgelere sunar ve yağ asidi depolaması, bozunması ve embriyonik gelişiminde anahtar rol oynar (Hashimoto ve ark 2004, Tölle ve ark 2011). L-FABP ekspresyonunun downregülasyonu hepatoselüler karsinomun (HCC) neredeyse %10'unda tümör ilerlemesi sırasında fenotipik değişikliklere neden olur. Ayrıca, küçük HCC'lerde L-FABP ekspresyonunun downregülasyonu, zayıf farklılaşma ve yüksek β -katenin ve glutamin sentetaz ekspresyonu (GS) ile anlamlı şekilde ilişkilidir (Inoue ve ark 2014). L-FABP'nin kolorektal kanser gelişiminde, adenom aşamasında downregüle olan farklı bir marker olarak rol oynadığı gösterilmiş olmasına rağmen, L-FABP çeşitli kanserlerde aşırı eksprese edilir. HCC dokularında yüksek L-FABP ekspresyonu, pozitif olarak VEGF-A ile korelasyon gösterir. L-FABP'nin tümör oluşumundaki rolüne membran raftları üzerinde VEGFR2 aracılık eder. VEGFR2 aktivasyonu aracılığıyla Akt / mTOR / P70S6K / 4E-BP1 ve Src / FAK / cdc42 yollarının aktivasyonu, hem anjiyogenez hem de migrasyon aktivitesi için gerekli bir molekül olan VEGF-A'yı upregüle eder (Dong ve ark 2007).

2-FABP2

İnce bağırsak epitelindeki bağırsak yağ asidi bağlayıcı protein (I-FABP), yüksek seviyelerde (sitozolik proteinlerin % 2'sine kadar) ifade edilen sitozolik bir proteindir (Darimont ve ark 2000). I-FABP esas olarak villus uçlarında ifade edilirken, L-FABP kriptlerde daha derinlere yerleşmiştir (Storch ve Thumser 2000). I-FABP, yağ asitlerini, muhtemelen çarpışma mekanizmasıyla L-FABP'den daha verimli bir şekilde membranlara tranfer eder (Storch ve ark 1996). Hem I-FABP hem de L-FABP, nispeten yüksek afiniteye sahip uzun zincirli yağ asitlerine bağlanır ve bağırsak epitelinde sitozolik hareketleri ve metabolizmalarında rol oynayabilir (Hsu ve Storch 1996). Peptit tirozin tirozin [Nöropeptid Y (NPY) ve pankreas polipeptidi (PP) içeren 36-amino asit düzenleyici peptid ailesinin bir üyesi olan PYY], luminal serbest yağ asitlerinin varlığında, ince bağırsakların endokrin hücreleri tarafından salgılanan bir bağırsak hormonudur. Bu peptitlerin biyolojik etkisi, yağ asidi asimilasyonu ve metabolizmasını ve bağırsak hareketliliğinin ve gastrointestinal / pankreas salgılarının inhibe edilmesini içerir (Halldén ve Aponte 1997). Yüksek I-FABP yoğunluğu bağırsak malignitesine neden olabilir (Bingold ve ark 2015).

3-FABP3

Yağ asidi bağlayıcı protein 3 (FABP3), kalp tipi yağ asidi bağlayıcı protein veya H-FABP, MDGI veya O-FABP, 1p32 p33 kromozomu üzerinde bulunur (Furuhashi ve Hotamisligil 2008). FABP3, özellikle miyokard ve iskelet kaslarında ifade edilen

sitozolik bir proteindir (Wang ve ark 2014). Bu dokularda FABP3, yağ asidi taşınmasında, hücre büyümesinde, hücre sinyallemede ve gen transkripsiyonunda önemli bir rol oynar (Qian ve ark 1999). FABP3'ün yağ asidi ve asil-CoA taşınımındaki rolü enerji taleplerine verilen cevaplara bağlıdır. Bu, hücre proliferasyonunu inhibe eden ve hücre metabolizmayı yavaşlatan negatif bir büyüme sinyalini uyarır (Song ve ark 2012). FABP3'ün aşırı ekspresyonu, proliferasyonu inhibe eder, apoptozu uyarır ve olgun kardiyomiyositlerde kardiyak öncüllerinin farklılaşmasını indükler (Zhu ve ark 2011). Bu sarkoplazmik protein, apoptotik gen ekspresyonunun indüksiyonu yoluyla artmış bir miyokard hücre apoptosisi başlatarak embriyoda kalbin morfogenezini üzerinde etkili olabilir. Ayrıca, bu hücrelerde FABP3, ATP üretimi sırasında yağ asidini taşıyarak mitokondriyal enerji metabolizmasına katılır. Memeli hücrelerinde apoptozda mitokondrinin anahtar rolü ile ilgili olarak, FABP3'ün aşırı ekspresyonuna bağlı mitokondriyal fonksiyon bozukluğu miyokardiyal hücre apoptozisini teşvik edebilir. Daha sonra, embriyonik kalp gelişiminde gecikmeye yol açar. P19 hücrelerinde aşırı eksprese edilen FABP3'ün mitokondriyayı daha düşük hücre ATP üretmeye ve MMP'de etkileyici bir azalmaya yönlendirdiği bildirilmiştir. FABP3 aşırı ekspresyonu, ROS seviyesini önemli ölçüde artırır ve MMP'yi azaltır. Ayrıca FABP3, meme epitel hücrelerinin büyümesini inhibe eder ve embriyonik miyokard hücrelerinin apoptozunu teşvik eder (Song ve ark 2012). FABP3'ün kalp gelişiminde anahtar bir rol oynayabileceği varsayılmıştır ancak FABP3'ün insan mezenkimal kök hücrelerinde (MSC'ler) tam rolü açıklığa kavuşmamıştır. Hücre büyümesi ve anjiyogenezdeki iki faktör olan, hipoksi ile indüklenen faktör (HIF1A) ve VEGF, FABP3 ve FABP4'ün birlikte aşırı ekspresyonunu destekler (Cerrada ve ark 2013). Aynı alt familyadan olan FABP4 ve FABP3 protein yapısında oldukça homolog oldukları gösterilmiştir (Tamama ve ark 2011).

4-FABP4

Yağ asidi bağlayıcı protein 4 (FABP4), adiposit yağ asidi bağlayıcı protein (A-FABP) veya aP2, yağ asidi depolaması, işlemi ve çözünürleştirmeyi içerir (Hotamisligil ve ark 1996, Uehara ve ark 2014). A-FABP, insülin direnci, tip 2 diabetes mellitus ve kardiyovasküler hastalık ile ilgilidir. FABP4, makrofajlarda olduğu gibi olgun adipositlerde de eksprese edilir (Uehara ve ark 2014). FABP4'ün en yaygın fizyolojik ligandı esterleşmemiş yağ asitleridir. Bu protein, esterleşmemiş yağ asitlerini hücre zarından farklı hücre organellerine veya diğer proteinlere taşıyan periferik bir zar proteini olabilir. FABP4, fosforlanmış bir tirozin kalıntısı yoluyla sinyal iletimi ile ilgili

olabilir. Uzun zincirli yağ asitleri ve metabolitleri, sinyal yollarında birincil ve ikincil haberciler olarak hareket edebilir (De Santis ve ark 2004). FABP4 normal dokularda glikoz ve lipid metabolizması, sinyal iletimi, hücre çoğalması ve apoptotik süreçlerde ve prostat kanseri, meme kanseri ve mesane kanseri gibi bazı kanserlerde yer almıştır (Uehara ve ark 2014, Guaita-Esteruelas ve ark 2018). FABP4 ekspresyonunun seviyesi, insan prostat kanseri hücrelerinde normal hücrelere göre daha düşüktür. Ayrıca, FABP4'ün aşırı ekspresyonu, insan prostat kanseri hücrelerinde apoptozu indükler (Das ve ark 2001, De Santis ve ark 2004, Uehara ve ark 2014). FABP4 ekspresyon seviyesindeki azalma, tümör evresi ve histolojik mesane kanseri derecesi ile anlamlı olarak ilişkilidir (Boiteux ve ark 2009). Endojen FABP4, bir tümör baskılayıcı gibi gözükse de, eksojen FABP4 kanser hücresi gelişiminde rol oynamıştır. Dolaşımdaki FABP4'ün ortalama konsantrasyonu, insan serumunda FABP4'ün bol miktarda salgılanmasından dolayı obezite ile ilişkilidir (Hancke ve ark 2010, Uehara ve ark 2014). Bir epidemiyolojik çalışma, serumdaki FABP4 seviyesinin meme kanseri hastalarında sağlıklı gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca, tümör boyutu ve lenf nodu ilişkisi ile pozitif olarak bağlantılıdır. (Hancke ve ark 2010). Eksojen FABP4, serum kaynaklı prostat kanser hücresi invazyonunu artırır. Bu nedenle, FABP4 inhibitörünün önerilen bir tedavi stratejisi olarak kullanılması, kanser hücresi gelişimini azaltabilir. Yeni bir prognostik faktör olarak yüksek serum FABP4 seviyelerinin obezite, meme kanseri riski ve meme kanseri gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Uehara ve ark 2014). Olası bir tümör baskılayıcı olarak FABP4, muhtemelen TNF- α aracılı bir yoldan apoptozu indükleyerek kanser hücrelerinde hücre büyümesinin inhibisyonunda rol oynayabilir. Bu sonuçla birlikte prostat kanseri hücrelerinde, A-FABP'nin aşırı eksprese edilmesi, hücre proliferasyonunu inhibe edebilir ve apoptozu indükleyebilir (Das ve ark 2001).

FABP4, bir nükleer reseptör peroksizom proliferatör-aktif reseptör (PPAR γ) hedef geni olarak tanımlanmıştır. PPAR agonistleri, pTl'de FABP4 ekspresyonunu artırabilir. Bu nedenle mesane tümörleri gibi bazı kanserlerin tedavisi için çekici bir terapötik strateji olabilir. Sentetik PPAR γ agonistleri (rosiglitazon ve troglitazon) hem birincil insan monositlerinde hem de monositik hücre hattında FABP4 mRNA'sını artırabilir. FABP4, tedavi sırasında mesane kanserinin teşhisi, prognozu ve gözlemlenmesi için yeni bir moleküler belirteç olarak ve ayrıca potansiyel bir terapötik hedef olarak kullanılabilir (Boiteux ve ark 2009). FASN ve A-FABP, meme kanseri hücrelerinde ve invaziv duktal karsinomda (IDC) tümör boyutu ve lenf nodu metastazi

yanısıra invazyon ve metastaz ile ilişkili olabilir (Hancke ve ark 2010). FABP-4'ün en önemli fonksiyonlarından biri, katalitik aktivitesi için hormona duyarlı lipaz (HSL) ile etkileşimi ve enflamatuar tepkileri düzenleyen birkaç sinyal yolunun modülasyonudur (Lass ve ark 2011).

5-FABP5

Yağ asidi bağlayıcı protein 5 (FABP5), Epidermal FABP (E-FABP), deri yağ asidi bağlayıcı protein (C-FABP) veya sedef hastalığı ile ilişkili yağ asidi bağlayıcı protein olarak adlandırılır (Fang ve ark 2010). Ayrıca anormal keratinosit farklılaşması ile karakterize bir cilt hastalığı olan sedef hastalığında düzenleyici bir protein olarak da bilinir. FABP5, hücresel yağ asidi hareketini ve cilt hemostazı ve metabolizmasını modüle etmek için önemli bir molekül olarak tanımlanan sitozolik non-enzimatik bir proteindir (Kawaguchi ve ark 2016). FABP5, sitozolden nükleer PPAR β/δ 'ya hem doymuş hem de doymamış LCFA (Long-chain fatty acids) sunar. Doymuş LCFA (SLCFA) inhibe ederken, doymamış LCFA (ULCFA) FABP5 / PPAR β/δ yolunu aktive eder. SLCFA, gastrik kanserde PPAR β/δ aktivasyonunun inhibe edilmesi yoluyla FABP5 eksprese eden karsinoma hücrelerinin tümörjenite özelliklerini baskılar (Levi ve ark 2015). FABP5 kolorektal kanserde hastalık evresine bağlı bir şekilde artış gösterir. FABP5, kolorektal kanser hücrelerinde PPAR β/δ 'ye bağımlı sinyal yolu ile hücre büyümesini ve invazyonu önemli ölçüde artırır (Kawaguchi ve ark 2016). Meme kanseri fare modeline ilişkin gözlemler, FABP5 ekspresyonunun, ErbB2'nin amplifikasyonuna bağlı olarak meme tümörlerinde yüksek oranda arttığını göstermiştir. Bir tümör baskılayıcı olarak Kruppel benzeri faktör (KLF2), FABP5'in ekspresyonunu azaltır (Kawaguchi ve ark 2016). FABP5, cilt, mesane, pankreas, prostatik, mide, hepatoselüler karsinom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, baş ve boyun kanseri, melanom ve endometriyal kanser gibi birçok insan kanserinde yüksek oranda eksprese edilir (Levi ve ark 2015). FABP5, yağ asidi metabolitleri ile hücre sinyal yolu üzerindeki etkisi aracılığıyla hücre döngüsü düzenlemesi, proliferasyon, apoptoz ve mide kanserinin invazyonuna dahil olabilir. FABP5'in sessizleştirilmesi, G0/G1'de hücre döngüsü durması vasıtasıyla invazyon, proliferasyon ve hücre büyümesini azaltır ve gen ekspresyonundaki değişikliklerle mide kanseri hücrelerinin apoptozunu artırır (Zhao ve ark 2017). FABP5'in yüksek ekspresyonu daha büyük tümör boyutu ve daha yüksek metastazlı tümör seviyesi ile ilişkilidir. FABP5, ligandı doğrudan PPAR β/δ 'ya aktararak çekirdeğe taşır. Ayrıca, FABP5, PPAR β/δ 'nın hedef genlerinden biridir.

FABP5 ekspresyonunun artması, PPAR β/δ 'nin aktif olmasına aracılık eder (Schug ve ark 2008).

Hepatoselüler karsinoma (HCC)'da FABP5'in tümör oluşumu rolü, Epitel mezenkimal geçişi (EMT) indüksiyonuna aracılık eder. HCC dokularında FABP5'in aşırı ekspresyonu, tümör gelişimi, invazyon ve metastaz ile ilişkilidir. Yinelenme için bağımsız ve önemli bir faktör olan aşırı eksprese edilmiş FABP5'li hastalar, daha kötü ilerleme ve daha yüksek tekrarlama oranlarına sahiptir. Bu nedenle, FABP5, HCC tedavisi stratejisi için dikkate değer bir belirteç ve moleküler hedef olarak kullanılabilir (Jeong ve ark 2012). HCC'nin yanı sıra prostat kanseri hücreleri ve dokularında FABP5, ligandları nükleer PPAR β/δ 'ya iletip kanser hücresi çoğalmasını indükleyerek upregüle edilmiştir. FABP5'in downregülasyonu, prostat kanserinin gelişimini ve tümörjenitesini inhibe eder. FABP5'in aşırı ekspresyonu, ayrıca prostat kanseri hücrelerinde spesifik protein1 (SP1) ve c-Myc'nin upregülasyonu, DNMT3A veya DNMT3B downregülasyonunun bir sonucu olarak promotör bölgesinde CpG loci'nin malignite indüklü DNA hipometilasyonuna aracılık eder. Dolayısıyla, FABP5'i inhibe edebilen bileşen, belirli kanser türlerinin tedavisi için yeni bir strateji olarak kullanılabilir (Myers ve ark 2016).

FABP5, insan prostat karsinomlarında, metastazda yer aldığı düşünülen bir onkogen olarak upregüle edilir (Forootan ve ark 2010). FABP-5 ekspresyonunun baskılanması, VEGF ekspresyonunun azalmasıyla prostat kanserinin tümörjenliğini ve metastazını inhibe eder (Adamson ve ark 2003). Prostat kanserinin öngörülmesinde potansiyel bir belirteç olarak önerilebilir ve prostat kanserinin ilerlemesini inhibe etmek için bir hedef olarak kullanılabilir (Morgan ve ark 2008). PPAR γ ve ligandlarının, prostat kanseri gibi birçok kanserin tümörjenitesindeki rolüyle birlikte, FABP5, prostat kanseri hücresindeki FABP5-PPAR γ -VEGF sinyal iletim ekseninde anjiyogenezi artırır. Karsinomlarda yüksek PPAR γ ekspresyonu, VEGF ekspresyon seviyesinin artmasıyla anjiyogenezi teşvik eder. Androjen reseptör bağımlı yolak ile karşılaştırıldığında, FABP5-PPAR γ -VEGF sinyalleşme eksenini, kastrasyon dirençli prostat kanseri hücrelerinin gelişiminde önemli bir rol oynar (Forootan ve ark 2014). Farelerin tedavisinde kullanılan kimyasal bir inhibitör olan SBFI26, FABP5'e bağlanması ve yağ asidi alımının inhibisyonu ve daha sonra FABP5-PPAR γ sinyal yolunun engellenmesi yoluyla FABP5'in aktivitesini baskıladığı bildirilmiştir. Daha sonra bunun sonucu, PPAR γ aktivasyonunu ve kanseri destekleyen down-stream genleri engellemiştir (Al-Jameel ve ark 2017).

Malign prostat ve meme kanseri dokularında FABP5 mRNA ekspresyon düzeyi, benign hücrelere göre yaklaşık 5-17 kat daha yüksektir. Metastatik bir faktör olarak FABP5, FABP5 mRNA ve proteinleri aşırı eksprese eden hücrelerde metastazı indüklemektedir. Malign kanser hücrelerinde yüksek FABP5 ekspresyonu, VEGF ekspresyonunun upregülasyonu aracılığıyla anjiyogenezi artırabilir (Jing ve ark 2001).

FABP'ler prostat kanseri hücrelerinde, normal prostat hücrelerinden farklı ekspresyon örneklerine sahiptir. Prostat kanseri hücrelerinde, normal prostat hücreleri ile karşılaştırıldığında FABP1 ve FABP2 upregüle edilirken, FABP4 ve FABP5 downregüle edilir. Bu FABP'ler, prostat kanserlerinin proliferatörü ve apoptotik regülatörü olarak görev yapar (Das ve ark 2001).

Liraz Levi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, FABP5'in insan meme kanserlerinde yüksek oranda regüle edildiği ve meme tümör oluşumunda FABP5'in patofizyolojik önemine dair genetik kanıt sağladığı gösterilmiştir. FABP5'in ektopik ekspresyonunun, PPAR δ 'nin hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu artırma kabiliyetini büyüttüğü yer olan 3T3 fibroblastlarında onkojenik olduğu bulunmuştur. FABP5'in EGFR ile indüklenen meme tümör büyümesi için gerekli olup olmadığını belirlemek için, FABP5-null fareler, meme tümörleri kendiliğinden gelişen MMTV-ErbB2 / HER2 onko fareler ile karşılaştırılmıştır. FABP5 ablasyonu, EGFR downstream efektör sinyallerinin aktivasyonunu azalttığı, hücre proliferasyonunu sağlayan PPAR δ hedef genlerinin ekspresyonunu azalttığı ve meme tümör gelişimini baskıladığı belirtilmiştir. Bulgular FABP5'in meme tümör gelişimi için kritik olduğunu ve yeni antikanserojen ilaçlar olarak FABP5 inhibitörlerinin gelişiminin önemli olduğunu ortaya koymuştur (Levi ve ark 2013).

6-FABP6

Yağ asidi bağlayıcı protein 6 (FABP6), ileal safra asidi bağlayıcı protein (I-BABP), gastrotropin, Keratinosit-FABP (K-FABP) karaciğerde sentezlenir ve luminal lipidlerle miseller oluşturdıkları küçük bağırsaklar içinden safra asidi ile salgılanır (Hendrick ve ark 2016). FABP6'nın geni, ileal lipit bağlayıcı protein için eksprese edilir. FABP4 gibi, FABP6 adipositlerde ve makrofajlarda eksprese edilir. FABP6 ile karşılaştırıldığında, FABP4 yağ hücrelerinde çok daha fazla miktarda bulunur, ancak makrofajlarda eşdeğer FABP4 ve FABP6 seviyeleri bulunur. Hem FABP4 hem de FABP6, çarpışma etkileşimi ile zarlara yağ asidini transfer eder.

FABP6, diyetel yağların verimli sindirimi ve emiliminde önemli bir rol oynar. FABP6, ileal epitel hücrelerinde safra asitlerinin hücre içi taşıyıcısı olarak, kolesterolün

katalizlenmesine ve metabolize edilmesine yardımcı olur. FABP6, ileal enterositlerin kuyruk sınırında bulunan safra asidi taşıyıcısı ile de ilişkilendirilebilir (Horváth ve ark 2014). Safra asitlerinin deneysel modellerde kolon kanserojenliğini ve kanser gelişimini indüklediği bildirilmiştir. (Galloway ve ark 1986). Safra asitleri kolon epitel hücrelerinde iltihaplanmaya neden olur ve dolaylı olarak genetik modülasyona yol açan oksidatif DNA hasarına neden olur (Fang ve ark 2007). Safra asitlerinin kolorektal kanserin karsinojenliğinde ve FABP6'nın ileal epitelde safra asidinin hücre içi taşıyıcı rolü nedeniyle, FABP6 kolorektal kanserde kritik bir rol oynayabilir (Kanda ve ark 1998). Safra asitleri, FABP6'nın ekspresyonunu spesifik olarak düzenler. FABP6, kolorektal kanser tümörlerinin gelişimi sırasında kana salınabilir. Bu nedenle FABP6, erken dönem kolorektal kanserin prognozu ve tanısı veya antikanser tedavisinin değerlendirilmesi için bir moleküler belirteç olarak kullanılabilir. Şaşırtıcı bir şekilde, daha yüksek FABP6 ekspresyon seviyelerine sahip tümörler, düşük ekspresyona sahip tümörlerden daha küçük boyuttadır. FABP6 mRNA'sının ekspresyonu, lenf düğümlerinden türetilen metastatik hücrelerde büyük ölçüde azalmıştır (Ohmachi ve ark 2006).

7-FABP7

Yağ asidi bağlayıcı protein 7 (FABP7), Beyin FABP (B-FABP), meme kaynaklı büyüme inhibitörü ile ilişkili gen (MRG) (Alshareeda ve ark 2012), büyük hidrofobik ligand bağlayıcı protein ailesinin bir üyesidir (Takaoka ve ark 2017), nükleer reseptörlerle etkileşimleri yoluyla transkripsiyonu modüle eder (Goto ve ark 2006). FABP7, sinir sisteminin gelişmesi yoluyla glia hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir. Birkaç çalışma melanomlarda FABP7'nin downregülasyonunu bildirmiş olmasına rağmen, bazı çalışmalar melanom hastalarından alınan cerrahi numunelerde FABP7'nin yüksek ekspresyon seviyesini bildirmiştir (Kaloshi ve ark 2007). FABP7'nin, in vitro olarak melanom hücrelerinde proliferasyon ve invazyonu düzenleyebilen melanositik lezyonlarda eksprese edildiği doğrulanmıştır (Goto ve ark 2006). PKC (protein kinaz C), MAPK / ERK1/2 yolunun iyi bilinen bir aktivatörüdür (Mauro ve ark 2002). FABP7, PKC ve MAPK / ERK1/2 sinyal yolu yoluyla düzenlenir, bu daha sonra melanom hücrelerinde proliferasyon ve invazyon gelişimini uyarır. Bir PKC aktivatörü olan Phorbol-12-miristat-13-asetat (PMA), MAPK / ERK1/2'yi upstream aktivatörü MEK1'den bağımsız olarak aktive eder (Jørgensen ve ark 2005) ve proliferasyonu artırır ve melanom hücrelerinin FABP7'nin düzenlenmesi aracılığıyla bağımsız hayatta kalmasını indükler. Aynı zamanda, PKC yoluyla MAPK / ERK1/2 yolu aktivasyonu,

melanom hücrelerinin apoptozunu bağımsız bir şekilde azaltmaya katkıda bulunur. Ayrıca, FABP7 ekspresyonu, melanom biyopsilerinin proliferasyonu ve tümör büyüklüğü ile ilişkilidir. FABP7'nin tedavi için potansiyel bir hedef olarak sunulabileceğini öne sürmektedir (Slipicevic ve ark 2008).

Öte yandan, PKC aktivasyonu FABP7'yi bir MAPK / ERK1/2'den bağımsız bir şekilde negatif olarak düzenleyebilir. PMA muamelesi, aktif ERK1/2 varlığında bile FABP7'yi downregüle edebilir. Bu downregülasyonun PMA/PKC aracılığı ile olması muhtemeldir, ancak MAPK / ERK1/2'den bağımsızdır. Bu kanıtlar FABP7'nin melanom hücrelerinde bağımsız olarak her iki sinyal yolu ile düzenlenebileceğini öne sürmüştür. Bazı raporlar, MAPK / ERK1/2 yolunun aktivasyonunun PPAR α/γ aktivitesinin artmasına neden olabileceğini göstermiştir. Benzer şekilde, PKC, PPAR α 'ya bağlı transkripsiyonu hem pozitif hem de negatif olarak düzenleyebilir. PPAR γ 'nin kendi tepki elementi olan PPRE'ye bağlanması, hücre hatlarında FABP1 ve FABP4'ü upregüle ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle, FABP7'nin de bu mekanizma ile düzenlenebileceği varsayılmaktadır (Haunerland ve Spener 2004).

FABP7'nin nükleer ekspresyonu spesifik olarak daha invaziv tümörlerde EGFR amplifikasyonu ile ilgilidir. Gelişmekte olan beyinde, olgunlaşmamış nöronların migrasyonunda yer alan radyal glial fiber sisteminin kurulması için FABP7 gereklidir. EGFR aktivasyonu, FABP7 nükleer translokasyonunu indükler ve migrasyonu destekler. FABP7, radyal glia tarafından eksprese edilir ve glial-klavuzlu nöronal migrasyonda rol oynar. Çoğunlukla genomik amplifikasyon yoluyla EGFR aktivasyonu, FABP7'yi upregüle eder ve nükleer translokasyonunu glioblastomda indükler (Kaloshi ve ark 2007). FABP7 ekspresyonunun inhibisyonu, FABP7'nin EGFR'nin neden olduğu glioblastoma invazyonuna katkısını öne sürerek EGF'nin neden olduğu glioma hücre migrasyonunu baskılar (Morihiro ve ark 2013). FABP7'nin belirgin bir ekspresyon örneğinin, prostat kanserinin evresine bağlı olduğu gösterilmiştir. FABP7'nin yüksek seviyesi orta (Gleason'un prostat kanseri sınıflandırmasına göre skor 5-7) ve ilk derecede (skor 1-4) olduğu belirlendi. Aksine, kötü şekilde farklılaşmış (skor 8-10) prostat kanserinde downregüle olduğu gösterildi. Bu bilgilerle, B-FABP'yi prostat kanserinde evre tanı markörü olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir (Das ve ark 2001). Ayrıca, FABP7'nin renal hücreli karsinomlar için spesifik bir biyobelirteç olduğu gösterilmiştir (Phuchareon ve ark 2014). Ek olarak, FABP7'nin artan ekspresyonu, melanom hücrelerinin proliferasyonu ve invazyonu ile ilişkilidir. Her ne kadar Prognostik bir strateji olarak sitoplazmik ve nükleer FABP7 immün reaktivitesini

değerlendirmek önemli olsa da, FABP7'nin diğer önemli tümör markerleri ile kombinasyon halinde olası klinik değerini tanımlamak için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir (Alshareeda ve ark 2012).

8-FABP8

Yağ asidi bağlayıcı protein 8 (FABP8), PMP2 (Periferik Miyelin Protein 2); Miyelin yağ asidi bağlayıcı protein (M-FABP); MP2 (Miyelin P2 Protein), periferik miyelinin başlangıçta üç ana miyelin proteini olarak tanımlanan küçük, bazik ve sitoplazmik bir lipit bağlayıcı proteindir. FABP8 geni ve protein yapıları, FABP'lerin korunan yapılarına benzerdir (Majava ve ark 2010). İnsan FABP8 geni, 8q21.3-q22.1 kromozomuna konumlanmıştır (Hayasaka ve ark 1993). FABP8, hidrofobik bir ligand bağlayıcı çekirdek olarak görev yapan ve bir hidrofilik yüzey ile çevrili 10 iplikçikli bir antiparalel β -varilden oluşur (Ruskamo ve ark 2014). PMP2'nin kolesterol, oleik asit, retinoik asit ve retinol ile bağlandığı gösterilmiştir. Çift lipit katmanına bağlanan PMP2, membran dinamiklerini azaltır (Suresh ve ark 2010). PMP2, Guillain-Barre 'Sendromunun (GBS) bir hayvan modeli olan deneysel otoimmün nöriti (EAN) uyarmak için bir hedef antijen olarak kabul edilmiştir. PMP2, diğer periferik miyelin proteinleriyle karşılaştırıldığında benzersiz bir ekspresyon düzenine sahiptir (Knoll ve ark 2010). İlk olarak, sadece Schwann hücrelerinin bir kısmında bulunduğu gösterilmiştir.

9-FABP9

Yağ asidi bağlayıcı protein 9 (FABP9), Testis-FABP (T-FABP) veya PERF15, FABP ailesinin prostat kanserinin ilerlemesinde ve gelişiminde önemli bir role sahip olan, az anlaşılmış bir üyesidir. FABP9, karsinomlarda, iyi huylu prostat hiperplazisinden (BPH) çok daha yüksektir (Slipicevic ve ark 2008). FABP9, memeli sperminin nükleer zarfının iç akrozomal zarında ve dış yüzeyinde bulunan majör bir proteindir. FABP9'un artmış ekspresyonu, artmış malignite derecesi ile anlamlı şekilde ilişkilidir ve prostat karsinomunda artmış glutamin sentetaz ile ilişkilidir. FABP9 ekspresyonunun prostat kanserinde yararlı bir prognostik faktör olabileceği düşünülmektedir (Al Fayi ve ark 2016).

10-FABP10

Yağ asidi bağlayıcı protein 10 (FABP10), memeli olmayan omurgalı türlerinde karaciğer ile sınırlı bir dokuya özgü ekspresyon örneği göstermiştir. Memeli türlerinde FABP10 tespit edilmemiştir. İn vitro bağlanma analizlerine dayanan bir ilk çalışmada, yayın balığı FABP10'un tek bir yağ asidi molekülüne bağlandığı (DI Pietro ve ark

1997), tavuk FABP10'un ise FABP'ler arasında FABP1 ile ortak bir özelliği olan iki ligand molekülüne bağlandığı gösterilmiştir.

11-FABP11

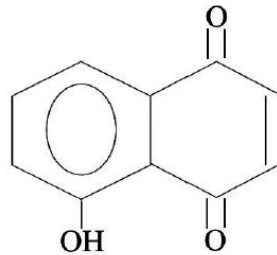
Yağ asidi bağlayıcı protein 11 (FABP11) ekspresyonu, atretik folikülleri çevreleyen somatik hücrelerde çok fazla artış gösterir. Ayrıca, vldlr (vitellogenin reseptörü)'in yumurtalık transkript seviyeleri, çok düşük yoğunluklu bir lipoprotein reseptörü ve FABP11, previtelogenez ve atrezide folikül yüzdesi ile anlamlı bir pozitif korelasyon göstermiştir (Agulleiro ve ark 2007).

12-FABP12

Yağ asidi bağlayıcı protein 12 (FABP12), yakın zamanda FABP ailesine eklenmiştir. Bugüne kadar, bu proteinin fonksiyonel özellikleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Liu ve ark 2008). FABP4, FABP5, FABP8 ve FABP9 ile aynı kromozomal bölgeye haritalanmıştır (8q21.13). FABP12 insanda, sıçanda ve farede tanımlanmış, ancak tavuk ve zebra balığı genomlarında muadili tanımlanmamıştır. FABP12 mRNA retina ve testiste yüksek düzeylerde tanımlanmış olsa da, sıçan ve fare dokularının beyin korteksi, böbrek ve epididimisinde düşük seviyelerde olduğu tahmin edilmiştir. Aynı zamanda, FABP12'nin transkripti insan retinoblastom hücrelerinde de tanımlanmıştır. FABP12 geni, tek bir ata genden FABP protein ailesinin evrimsel sapmalarına ilişkin daha iyi kanıt sağlar (Asmaa ve ark 2017).

2.4. Juglon

Allelopati, bir bitkinin ürettiği özgün bir maddeyle, başka bir bitkiyi etkilemesi şeklinde görülen bitkiler arasındaki doğal etkileşimleri ifade eder. Ceviz (Juglandaceae) ailesinin birçok üyesi juglon (5-hidroksi-1,4-naftakinon) denilen bir allelokimyasal üretir.



Şekil 2.3. Juglonun kimyasal yapısı(Thakur 2011)

Juglon, Juglandaceae familyasında, özellikle siyah cevizde (*Juglans nigra*) yapraklarda, köklerde, kabuklarda, meyvelerde (epikarp) ve bitki kabuğunda doğal olarak bulunan naftokinon yapılı bir bileşiktir ve birçok bitki türü için toksik veya büyüme engelidir. Bazen bir herbisit olarak, kumaş ve mürekkepler için bir boya olarak ve gıdalar ve kozmetikler için bir renklendirici olarak kullanılır (Oliveira ve ark 2008).

Juglonun son zamanlarda güçlü antitümör aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Kamei ve ark 1998) (Ji ve ark 2011). Juglon; fare asit hepatomu, fare S180 katı sarkomu, SGC-7901 insan mide kanseri hücreleri, HL-60 insan lösemi hücreleri ve HCT-15 insan kolon karsinom hücrelerine karşı güçlü antikanser aktivitesi sergilemiştir (Segura-Aguilar ve ark 1992) (Kamei ve ark 1998, Ji ve ark 2011). Juglonun antikanser aktivitesinin, bileşiğin tümör hücrelerini doğrudan öldürme, apoptozu indüklemeye, hücre döngüsünün S-fazını inhibe etmeye, potasyum kanalını bloke etmeye (insan periferik kan lenfositlerinde) yeteneğine bağlı olduğu bulunmuştur (Ji ve ark 2011).

Juglon, farklı meme kanseri modelleri üzerinde antikanser etkileri sergilemiştir. MCF-7'de, juglon G1 evresinde hücre döngüsünü durdurmuş ve ROS güdümlü apoptozu desteklemiştir. MCF-7 üzerine yapılan kapsamlı bir çalışma, juglonun Bax / Bcl2 oranını, hücre içi kalsiyum (Ca^{2+}) seviyelerini, sitokrom c (Cyt-c) salınımını ve kaspaz-3 aktivasyonunu arttırdığını ve intrinsik apoptotik yolun aktivasyonunu sağladığını kanıtlamıştır. Bu sonuçlar, meme kanseri tedavisinde uygulamalarla birlikte, juglon kaynaklı apoptoz mekanizması hakkında değerli bilgiler sunmaktadır (Ji ve ark 2016). MCF-7'de hücre proliferasyonunu, koloni oluşumunu ve migrasyon kabiliyetini inhibe ettiğini göstermiştir. Juglon-aracılı oksidatif stres O_3 'ü (FOXO3) tetiklemiş, bu da p53'ü modüle etmiş ve hücre homeostatik dengesi değiştirilerek apoptozu tetiklemiştir.

Bir başka çalışma da, juglon sitotoksitesinin kısmen DNA hasarına atfedildiğini göstermiştir. Aslında juglonun, MCF-7 hücrelerinde DNA'ya interkalasyonu sonucunda oksidatif bölünmeye neden olduğunu belirtmiştir. Ancak biyomarker fosforile-H2A histon ailesi üyesi X (-H2AX) şeklinde hiçbir çift iplik kopması kaydedilmemiştir. Buna karşılık, juglon askorbat ile kombinasyon halinde test edildiğinde yüksek seviyelerde -H2AX kaydedilmiştir. Nitekim juglonun antikanser profili (proliferasyon inhibisyonu, sitotoksitesite ve ROS indüksiyonu açısından) yüksek ihtimalle bu iki bileşik arasında ilginç bir sinerjistik aktivite olduğunu açıklayan

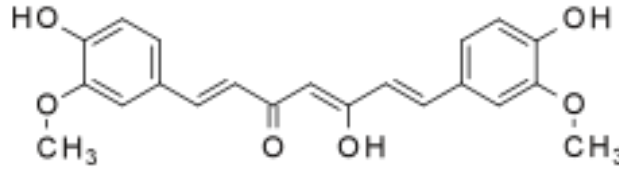
askorbat vasıtasıyla geliştirildiği düşünülmektedir (Sajadimajd ve ark 2016, Catanzaro ve ark 2018).

2.5. Kurkumin

Kurkumin, *Curcuma longa* bitkisinin rizomlarından üretilen parlak sarı bir polifenol kimyasaldır. Zencefil ailesinin Zingiberaceae üyesi olan zerdeçal (*Curcuma longa*) kurkumin (%77), demetoksi kurkumin (%17) ve bisdemetoksi kurkumin (%3) olmak üzere çeşitli kurkuminoidleri içermektedir ve kurkumin başlıca kurkuminoididir. *Curcuma longa* L. (*C. longa*), evde hazırlanan ilaçlarla çeşitli hastalıkların tedavisinin yapıldığı, Ayurveda, Unani ve Siddha tıbbında yaygın olarak kullanılan tıbbi bir bitkidir. Geleneksel Asya tıbbında, kurkumin romatizma, karaciğer hastalığı, böcek ısırıkları, öksürük, sinüzit, anoreksiya ve safra bozuklukları gibi çoklu hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (YILDIZ ve KONUKLUGİL 2018).

Yaklaşık 6.850 yayın ile onlarca yıldır kurkumin hakkında yapılan kapsamlı araştırmalar tıbbi ve sağlık faydaları konusunda daha fazla bilgi sağlamıştır. Anti-inflamatuar, anti-trombotik, anti-diyabetik, anti-oksidatif, analjezik, hepato-protektif ve antitümörjenik fonksiyonlar dahil olmak üzere çeşitli biyolojik fonksiyonlar için uygulandığında arzu edilen tıbbi etkileri ortaya çıkardığı bildirilmiştir (Bahrami ve ark 2019). Geçtiğimiz çeyrek yüzyılda çeşitli klinik çalışmalarda kurkuminin kanser, kardiyovasküler hastalık, diyabet, oral liken planus, artrit ve β -talasemi gibi birçok hastalığa karşı çok yönlü rol oynadığı gösterilmiştir. Özellikle oral, akciğer, meme, prostat, pankreas, kolorektal ve başboyun skuamöz hücreli karsinom olmak üzere kurkuminin antikanser potansiyeli çeşitli kanser türlerinde başarılı bir şekilde sergilenmiştir. Sitokinler (tümör nekroz faktörü- α , interleukin (IL) -1 β , IL-6), apoptotik proteinler, NF-kB, siklooksijenaz (COX)-2, STAT3, endotelin-1, malondialdehit (MDA), C-reaktif protein (CRP), prostaglandin E2, glutatyon S-transferaz (GST), prostata özgü antijen (PSA), vasküler hücre yapışma molekülü (VCAM-1), glutatyon, pepsinojen, fosforilaz kinaz, transferrin reseptörü, trigliserit, kreatinin, antioksidanlar, aspartat transaminaz (AST) ve alanin transaminaz (ALT) gibi çoklu hücre sinyal moleküllerini modüle etme yeteneğinin kanıtını gösteren çok sayıda araştırma makalesi yayınlanmıştır. Bu farklı mekanizmaların hepsi birbiriyle bağlantılı olabilir (Gupta ve ark 2011, Javeri ve Chand 2016).

Kurkumin ilk kez 1810 yılında izole edilmiştir ve kimyasal yapısı 1973 yılında Roughley ve Whiting tarafından belirlenmiştir. Erime noktası 183 °C, moleküler formülü $C_{21}H_{20}O_6$ ve moleküler ağırlığı 368,37 g/mol'dir. Ayrıca kurkumin suda çözünmeyen bir lipofilik polifenoldür ve etanol, dimetil sülfoksit (DMSO), asetik asit ve kloroformda çözünmektedir (Araujo ve Leon 2001).



Şekil 2.4. Kurkuminin kimyasal yapısı (Fuchs ve ark 2009)

Kurkumin'in en ilginç özelliklerinden biri, çeşitli sinyal yollarına müdahale etme ve çeşitli biyoaktif molekülleri hedefleme yeteneğidir. Kurkumin, endoplazmik retikulum stresini bloke ederek oksidasyona karşı hücrel homeostazı korur (Wang ve ark 2016). Kurkumin ayrıca karaciğer ve böbrek gibi organlarda fibrozu baskılar (Zhou ve ark 2014, Parsamanesh ve ark 2018), yağ fonksiyon bozukluğunu azaltır ve insülin duyarlılığı ve glikoz metabolizmasındaki iyileşmelerle hiperglisemiye azaltır (Ding ve ark 2016). Biriken kanıtlar kurkuminin tümör gelişiminin çeşitli aşamalarını, yani proliferasyon, anjiyogenez, yayılma ve apoptozu inhibe etmede etkili olabileceğini göstermektedir (Barati ve ark 2019).

Kurkumin siklooksijenaz-2 (COX-2), DNA polimeraz, sitokinler ve tümör gelişimi için önemli olan hücrel sinyal proteinlerine (NF- κ B, sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatör (STAT) proteinleri, aktivatör proteini 1 (AP-1), Nrf-2, β -katenin ve peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör γ (PPAR γ)) doğrudan bağlanır (Jacob ve ark 2008, Shehzad ve ark 2010). Kurkumin, NF- κ B, AP-1 ve hücre sağkalımı ile ilgili birkaç düzenleyici geninin [Bcl-2, Bcl-xL, apoptoz inhibitörü (IAP) ve hücrel FLICE inhibitör protein (cFLIP)], proliferasyonun [siklin D1 (CycD1) ve c-Myc], invazyonun [matris metaloproteinazlar (MMP-9) ve ürokinaz tipi plazminojen aktivatör (uPA)] ve Akt/protein kinaz B (PKB) ve I κ Ba (NF- κ B inhibitörü) kinaz (IKK) 'ya müdahale ederek anjiyogenezin [vasküler epitelyal büyüme faktörü (VEGF)] indüksiyonunu bloke eder (Han ve ark 2002, Thangapazham ve ark 2006, Bhandarkar ve Arbiser 2007). Kurkumin benzer şekilde hepsi kanser gelişimi ve ilerlemesi için çok önemli olan protein kinaz C (PKC), MAPK, makrofaj uyarıcı 1 (MST1), zeste homolog

2 arttırıcısı (EZH2) ve STAT3 sinyalleme kaskadlarını azaltır (Squires ve ark 2003, Seo ve ark 2010, Yu ve ark 2013).

Kurkuminin çeşitli sağlık yararlarına ve faz 1 klinik deneylerinde insanlarda yüksek dozlarda (12 g/gün) bile güvenilir olmasına rağmen, zayıf emilimi, düşük çözünürlüğü ve hızlı sistemik eliminasyonu nedeniyle klinik uygulamalarının sınırlı olduğu gösterilmiştir. Biyoyararlanımını arttırmak için bazı yeni kurkumin formülasyonları patentlenmiştir (Anand ve ark 2007). Bu konudaki çalışmalar, fitozomal kurkuminin emilimini geleneksel kurkumin ürünlerinden 29 kat daha fazla artırarak söz konusu sorunları ortadan kaldırmaya yardımcı olduğunu doğrulamıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, geleneksel kurkumin sınırlamasının üstesinden gelmek için klinik çalışmaların çoğunda fitozomal kapsüllenmiş kurkumin kullanılmıştır (Dulbecco ve Savarino 2013).

2.6. MCF-7 Hücre Hattı ve Özellikleri

MCF-7, 1970 yılında 69 yaşında Kafkas bir kadının meme dokusundan izole edilmiş bir meme kanseri hücre hattıdır (Soule ve ark 1973). Hastaya primer hücre kültürü başlamadan 7 yıl önce sağ memesinde mastektomi yapılmıştır ve çıkarılan dokunun iyi huylu olduğu tespit edilmiştir. 4 yıl sonra, ikinci bir operasyon plevral efüzyonda malign bir adenokarsinomu ortaya çıkarmış ve bu doku sonunda MCF-7 hücre hattını oluşturmuştur. Hücre hattının izole edildiği hasta meme kanseri için radyoterapi ve hormonoterapi ile tedavi edilmiştir (Levenson ve Jordan 1997).

MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) hücre hattının isimlendirilmesi, 1973 yılında Dr. Soule ve meslektaşları tarafından kurulan Michigan Kanser Vakfı'nın adlarından türetilerek yapılmıştır (Soule ve ark 1973).

MCF-7 hücreleri, meme epiteline özel çeşitli ideal özellikleri koruyan hücre hattı olarak meme kanseri laboratuvar çalışmaları için kullanımı uygundur. Geniş ölçüde incelenen, meme adenokarsinomundan türevlendirilmiş bir epitelyal kanser hücre hattı olan, MCF-7 farklılaşmış meme epitelinin özelliklerine sahiptir. MCF-7 hücrelerinin, hücre sitoplazmasındaki östrojen reseptörleri aracılığıyla östradiol formundaki östrojeni işleme yeteneği vardır. Bu, MCF-7 hücre hattının bir östrojen reseptörü (ER) pozitif hücre hattı olmasına neden olur. MCF-7 ayrıca progesteron reseptörü pozitif ve HER2 negatiftir (Shirazi ve ark 2011).

MCF-7, MDA-MB-231 veya LCC15-MB gibi diğer meme kanseri hücre hatlarına kıyasla düşük metastatik potansiyele ve minimal invaziviteye sahip olması nedeniyle zayıf agresiflik gösterir (Gest ve ark 2013). MCF-7 hücrelerinin kolay proliferasyonuna rağmen, genellikle yavaş büyüyen bir popülasyon olduğu gözlemlenmiştir. MCF-7'nin karakteristik olarak iki katına çıkması 30-40 saat sürmektedir.

MCF-7 hücre hattı genetik olarak, başlangıçtaki izole edilen kopyası ile tam olarak aynı değildir. Başlangıçta, o zamandan beri 16 kromozoma kadar indirgenmiş 85 kromozom içeren bir karyotipe sahip olmasına rağmen bugün ise MCF-7 hücre hattında 69 kromozom içeren bir karyotip bulunmaktadır. Ayrıca, MCF-7 hücre hattında, Michigan Kanser Vakfı ve ATCC hücre hattı arasında genetik farklılıklar vardır. Bu farklılıklar, ATCC hücre hattının, diğer MCF-7 hücre hattından daha farklı bir kaynaktan elde edildiğini gösterir.

MCF-7 meme kanseri hücreleri, %10 fetal sıgır serumu (FBS), 2 mM glutamin, 0.01 mg/ml insülin, %1 penisilin / streptomisin karışımı içeren düşük glikozlu Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyerine (DMEM) ekilebilir ve 37°C'de %5 CO₂ atmosferinde inkübe edilmesi gerekir. Besiyeri yenilenmesi haftada 2 kez yapılmalı, hücreler ise haftada 1:3 ekim oranında pasajlanmalıdır. Alternatif bir hücre kültür besiyeri olarak, antibiyotikler ve %10 FBS ile desteklenmiş DMEM veya RPMI-1640 kullanılabilir.

2.7. MDA-MB-231 Hücre Hattı ve Özellikleri

MDA-MB-231 hücre hattı, metastatik bir meme adenokarsinoması olan 51 yaşında beyaz bir kadının plevral efüzyonundan oluşturulan (Cailleau ve ark 1978) ve insanda en sık kullanılan epitelyal meme kanseri hücre hattıdır.

MDA-MB-231 östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) ekspresyonundan ve HER2 (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2) amplifikasyonundan eksik olduğu için agresif, invaziv ve zayıf diferansiye üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücre hattıdır. Diğer invaziv kanser hücre hatlarına benzer şekilde, MDA-MB-231 hücrelerinin invazivliğine, ekstraselüler matriksin proteolitik degradasyonuna aracılık eder. Üçlü negatif meme kanseri, sınırlı tedavi seçeneklerine sahip agresif bir meme kanseri formudur. Bu nedenle, üçlü negatif meme kanserinin

moleküler temelini anlamak ve etkili yeni ilaç gelişimi için çok önemlidir (Chavez ve ark 2010).

MDA-MB-231 hücreleri, 2mM glutamin ve %15 fetal sığır serumu (FBS) ile desteklenen Leibovitz'in L-15 besiyerinde 37°C'de büyütülür. Bu besiyeri, CO₂ dengesi olmayan ortamlarda hücrelerin büyümesini destekler. MDA-MB-231 hücreleri 1-3x10⁴ hücre/cm² arasında bir yoğunlukta ekilmeli ve %70-80 konfluent olduğunda pasajlanmalıdır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Marka
Güvenlik Kabini Sınıf II	Metisafe
Karbondiyoksitli İnkübatör	Thermo Scientific
Işık Mikroskobu	Olympus
Inverted Mikroskop	Nikon Eclipse TS100
Su Banyosu	WiseBath
Multiplate Okuyucu	Biotech
Thermal Cyclers	Bio-Rad
Vorteks	Heidolph
Real-time PCR	Roche
Santrifüj	Nüve
Mikrosantrifüj (Soğutmalı)	Thermo Scientific
Manyetik Karıştırıcı (Isıticılı)	Stuart
Çalkalayıcı	WiseShake
Hassas Terazî	Kern
Otomatik Pipet	Thermo Scientific
Nanodrop Spektrofotometri	Thermo Scientific
-80 Derin Dondurucu	Haier
-20 Derin Dondurucu	Arçelik
+4 Buzdolabı	Uğur

Şekil 3.1. Kullanılan cihaz ve markaları

3.2. Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullanılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları ATCC (American Type Culture Collection)' den temin edildi. MCF-7 ve MDA MB-231 hücre hatları %10 fetal sıgır serum (FBS) ve %1 antibiyotik (penisilin (100 U/ml), streptomisin (100 µg/µl)) eklenmiş RPMI-1640 besiyeri ile 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edildi.

3.2.1. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Flaskta yapışık halde bulunan hücrelerin üzerine 1-2 ml %0,05 tripsin-EDTA uygulandı. Hücrelerin kalkması için 2-3 dakika 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra flasktaki tripsin-EDTA ve hücre karışımı falkon tüpe alındı. Falkon tüpün üzerine flaska eklenen tripsin-EDTA miktarının 2 katı kadar taze besiyeri eklendi ve 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve peletin üzerine 1 ml besiyeri eklendi. Hücreler kriyotüpe alındı ve üzerine 1/9 oranında DMSO damla damla eklenerek yavaş bir şekilde pipetaj yapıldı. İçinde DMSO'lu hücre solüsyonu bulunan kriyotüp +4°C ve -20°C'de kademeli olarak dondurulduktan sonra -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.2. Hücrelerin Çözdürülmesi

Dondurulmuş hücreleri içeren kriyotüp 37°C su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürüldü. Çözülen hücreler 5 ml taze besiyeri bulunan falkon tüpe aktarıldı ve 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve peletin üzerine uygun miktarda taze besiyeri eklenerek çözdürüldü. Hücreler uygun büyüklükteki flaska alındı ve 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Hücreler kontrol edilerek 1 veya 2 günde bir eski besiyeri uzaklaştırılarak taze besiyeri eklendi.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Üremekte olan hücre pasajları %80-90 doygunluğa ulaştıktan sonra hücrelerin kültürdeki devamlılığı için pasajlama işlemi yapıldı. Flask içerisindeki eski besiyeri uzaklaştırıldı ve flaska ilave edilen 1-2 ml 1X DPBS ile hücreler yıkandı. Flasktaki fazlalık boşaltıldıktan sonra hücrelerin yapıştıkları alandan kaldırılması için 1-2 ml %0,05 tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 3-4 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücrelerin tamamının kalktığından emin olmak için inverted mikroskop altında inceleme yapıldı. Kalkmış hücrelerin bulunduğu süspansiyon halindeki hücre ve tripsin-EDTA solüsyonu 15 ml hacimli falkon tüp içerisine alındı. Solüsyonun üzerine tripsinin inhibisyonu için tripsin hacminin 2 katı besiyeri eklenerek hücrelerin homojen dağılması için pipetaj yapıldı ve 1500 rpm' de 4 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti üzerine

yaklaşık 10 ml taze besiyeri ilavesinden sonra yavaşça pipetaj yapılarak çözdürüldü. Tripan mavisi boyası ile hücre sayım lamı kullanılarak inverted mikroskobu altında hücre sayımı yapıldı ve belirlenen hücre yoğunluğuna göre hücrelerin flasklara ekim işlemi gerçekleştirildi. Hücrelerin gelişimlerini sürdürebilmeleri için 37 °C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı.

3.3. Juglon Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Katı kimyasal madde halinde satın alınan juglon (MA: 174,15, Sigma H47003) konsantrasyonu 40 mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözünmesi sağlandı. Hazırlanmış olan bu juglon stok solüsyonu steril ortamda 0,22 µm' lik steril filtrelerden geçirildi ve -20°C' de muhafaza edildi. Çalışmamızda kullanılan farklı konsantrasyondaki juglon solüsyonları, stok solüsyondan RPMI-1640 besiyeri ile seyreltilerek hazırlandı.

3.4. Kurkumin Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Katı kimyasal madde halinde satın alınan kurkumin (MA: 368,38 g/mol, Merck C7727) konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözünmesi sağlandı. Hazırlanmış olan kurkumin stok solüsyonu steril ortamda 0,22 µm' lik steril filtrelerden geçirildi ve -20°C' de muhafaza edildi. Çalışmamızda kullanılan farklı konsantrasyondaki kurkumin solüsyonları, stok solüsyondan RPMI-1640 besiyeri ile seyreltilerek hazırlandı.

3.5. MTT Analizi

MTT analizi; hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksitesinin bir göstergesi olarak hücrel metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılır. Bu kolorimetrik analiz, sarı tetrazolium tuzunun (3- (4,5-dimetidiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolym bromid veya MTT) 'nin metabolik olarak aktif hücreler tarafından mor formazan kristallerine indirgenmesine dayanmaktadır. Canlı hücreler, MTT'yi formazana indirgeyen NAD(P)H'ye bağlı oksidoredüktaz enzimleri içerir. Uygulanan maddenin sitotoksik etkisiyle hücrede oksidoredüktaz aktivitesinin etkilendiği durumlarda mor renkli formazan oluşamamakta, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde

formazan oluşumu görülmektedir. Formazan oluşumu ise, spektrofotometre ile optik yoğunluğu ölçülerek tespit edilir.

3.5.1. Juglonun Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Juglonun *MCF-7* ve *MDA-MB-231* hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla MTT testi uygulandı. 96 kuyucuklu platelere her bir kuyucukta 100 µl besiyeri içerisinde yaklaşık 6×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılarak hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlandı. İnkübasyon sonrası eski besiyeri pipet ile çekildi. Kuyucuklardaki *MCF-7* hücre hattına 1, 5, 10, 20, 40 µM ve *MDA-MB-231* hücre hattına 1, 5, 10, 15 µM juglon konsantrasyonu içeren besiyerlerinden 100 µl ilave edilerek 24 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası etken madde içeren besiyeri pipetle çekilerek uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 100 µl MTT solüsyonu eklenerek 4 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklardan MTT solüsyonunun tamamı uzaklaştırılarak yerine 100 µl DMSO eklendi ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası mor renkli formazan kristallerinin sarı renge dönüşümü gerçekleşti ve mikropate okuyucuda 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Juglon muamelesi yapılmış grupların absorbans değerlerinin kontrol grubu absorbans değerine bölünüp 100 ile çarpılması ile yüzde hücre canlılığı hesaplandı. Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre canlılığı eğrisi grafiği oluşturularak %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC₅₀) değeri tespit edildi.

3.5.2. Kurkuminin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Kurkuminin *MCF-7* ve *MDA-MB-231* hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için MTT testi uygulandı. 96 kuyucuklu platelere her bir kuyucukta 100 µl besiyeri içerisinde yaklaşık 6×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılarak hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlandı. İnkübasyon sonrası eski besiyeri pipet yardımı ile uzaklaştırıldı. Kuyucuklardaki *MCF-7* hücre hattına 0,1, 1, 5, 10,15, 20, 25 ve 40 µM ve *MDA-MB-231* hücre hattına 1, 5, 10, 15 ve 20 µM kurkumin konsantrasyonu içeren besiyerlerinden 100 µl eklenerek 24 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası etken madde içeren besiyerinin tamamı uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 100 µl MTT solüsyonu

eklenerek 4 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. 4 saat sonrasında kuyucuklardan MTT solüsyonunun tamamı pipet ile çekilerek yerine 100 µl DMSO eklendi ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 20 dk inkübe edildi. Inkübasyon sonrası mor renkli formazan kristallerinin sarı renge dönüşümü gerçekleşti ve mikropate okuyucuda 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Kurkumin muamelesi yapılmış grupların absorbans değerlerinin kontrol grubu absorbans değerine bölünüp 100 ile çarpılması ile yüzde hücre canlılığı hesaplandı. Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre canlılığı eğrisi grafiği oluşturularak %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC₅₀) değeri tespit edildi.

3.6. Gen Ekspresyon Analizleri

Farklı konsantrasyonlarında juglon ve kurkumin uygulamalarının, *MCF-7* ve *MDA-MB-231* hücrelerinde *FABP5* ve *FABP9* genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerine etkilerini belirlemek amacıyla Roche Light Cycler 1.2 cihazı kullanılarak kantitatif Real-Time PCR (qPCR) çalışması yapıldı.

3.6.1. Total RNA İzolasyonu

6 kuyucuklu platelere bir kuyucukta 3 ml besiyeri içerisinde yaklaşık 3×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında kuyucuklardaki hücrelere belirlenen IC₅₀ değerlerine göre juglon muamelesi için *MCF-7* hücre hattına 5, 10 ve 15 µM ve *MDA-MB-231* hücre hattına 1, 2 ve 3 µM juglon konsantrasyonu içeren besiyerinden; kurkumin muamelesi için ise *MCF-7* hücre hattına 5, 10 ve 15 µM ve *MDA-MB-231* hücre hattına 1, 5 ve 10 µM kurkumin konsantrasyonu içeren besiyerinden 3 ml eklendi. Madde uygulamasından sonra plateler 24 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin 24 saat inkübasyonundan sonra RNA izolasyonu aşamasına geçildi ve RNA izolasyonu için TRidity G solüsyonu (Appllichem, A4051) kullanıldı.

1. Platedeki hücrelerin üzerinden madde muamelesini bitirmek için besiyeri pipet yardımı ile çekildi ve bir miktar PBS eklenerek hücreler yıkandı.
2. Her kuyucuğa 1ml tripsin eklendi ve 3-4 dk 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi.

3. Kuyucuk yüzeyinden kaldırılan hücreler bir falkon tüpe alındı, üzerine 2-3 ml besiyeri eklendi ve 1500 rpm’de 4 dk santifüj edildi.
4. Süpernatant atıldı ve hücrelere 2 kez PBS ile yıkama yapıldı.
5. Her bir falkon tüpe 1 ml TRidity G solüsyonu eklenerek pipetaj yapıldı ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
6. Hücre ve TRidity G süspansiyonu 1,5 ml’lik tüpe aktarıldı ve üzerine 200 µl kloroform eklendi. Tüpler nazikçe alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonrasında tüpler 12000 g’de 15dk +4°C’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant yeni bir 1,5 ml’lik tüpe alındı.
8. Süpernatant üzerine 250 µl 2-propanol ilave edildi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüpler, 12000 g’de 10dk +4°C’de santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine 50 µl %70’lik etanol eklendikten sonra 12000 g’de 5 dk +4°C’de tekrar santifüj edildi.
10. Tekrar süpernatant atıldıktan sonra geriye kalan RNA pelleti kurumaya bırakıldı. Kuruma işleminden sonra RNA pelleti 50 µl nükleaz içermeyen dH₂O ile çözdürüldü.
11. Nanodrop spektrofotometrede RNA konsantrasyonu ve saflıkları belirlendi.
12. RNA’lar, stabil kalabilmeleri için -80°C’de muhafaza edildi.

3.6.2. cDNA Sentezi

Total RNA’dan cDNA sentezi, 2-kademeli RT-PCR Kiti (Vivantis, RTPL12) kullanılarak, kitin mevcut protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirildi.

1. İlk olarak her numune için spektrofotometrede ölçülen RNA konsantrasyonlarına göre 5 µg RNA için hesaplamalar yapıldı.
2. Daha sonra 200 µl’lik pcr tüplerine belirlenen miktarda nükleaz içermeyen dH₂O, 1 µl 40 µM oligod(T) primer ve 1 µl 10 mM dNTP miks eklendi ve en son belirlenen miktarda 5 µg RNA eklenerek pipetaj yapıldı.
3. Tamamı 15 µl olan karışım denatürasyon için 65°C’de 5 dk inkübe edildi.
4. Denatürasyon aşamasından sonra tüpler 2 dk buz üzerinde bekletilerek reaksiyonun sonlandırılması sağlandı.

5. Buzdan alınan tüplerin üzerine, 2 µl 10X Buffer M-MuLV, 0,5 µl 100 üniteM-MuLV Reverse Transcriptase enzimi ve 7,5 µl nükleaz içermeyen dH₂O ile hazırlanan 10 µl cDNA sentez miksi ilave edilerek pipetaj yapıldı.
6. Karışımı içeren pcr tüpleri cDNA sentezi için 42°C’de 60 dk inkübe edildi.
7. 1 saatin sonunda reaksiyonu sonlandırmak için tüpler 85°C’de 5 dk inkübe edildi ve sentezlenen cDNA’lar PCR’da kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edildi.

3.6.3. Real-Time PCR

Real-time PCR, SYBR Green qPCR Master Miks (Thermo, K0251) kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmada ekspresyonu araştırılan FABP5 ve FABP9 hedef genler ve referans olarak kullanılan β -actin’e özgü primerler aşağıda gösterilmiştir.

β -aktin

Fw: 5’- ACTCTTCCAGCCTTCCTTC -3’

Rw: 5’- ATCTCCTTCTGCATCCTGTC -3’

Fatty Acid Binding Protein 5 (FABP5)

Fw: 5’- CAG TTC AGC AGC TGG AAG GA -3’

Rw: 5’- TGC TTT CCT TCC CAT CCC AC -3’

Fatty Acid Binding Protein 9 (FABP9)

Fw: 5’- CGG AAC ATG GCA GGG TTA GT -3’

Rw: 5’- ACT TTC CGG TTG TCT GCT GT -3’

Real-Time PCR karışımını hazırlamak için belirlenen miktarlarda nükleaz içermeyen dH₂O, forward ve reverse primerler ve SYBR Green qPCR Master Miks karıştırıldı. Karışım 96-well PCR platedeki kuyucuklara dağıtıldı ve sentezlenen cDNA pipetaj yapılarak kuyucuklara ilave edildi. Hazırlanan reaksiyon karışımını içeren 96-well PCR plate Roche Light Cycler 1.2 cihaz içerisine yerleştirildi. Hedef genlerin ve referans genin amplifikasyonu, Çizelge 2.3.’de belirtilen protokol kullanılarak yapıldı. PCR işlemi tamamlandıktan sonra hedef genler olan FABP5 ve FABP9 genlerinin ekspresyon düzeyleri C_t değerleri üzerinden yorumlandı. Referans gen olarak kullanılan β -aktin’in gen ekspresyonuna göre normalizasyon işlemi yapıldı. Kontrol grubu ile

juglon ve kurkumin muamelesi yapılmış gruplarda gen ekspresyon düzeyleri $-\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılarak hesaplandı.

Denatürasyon	95°C'de 10 dk
Amplifikasyon (45 döngü)	94°C'de 30 sn 60°C'de 30 sn 72°C'de 30 sn
Soğuma	40°C'de 30 sn

Çizelge 3.2. Genler için uygulanan Real-Time PCR protokolü.

3.7. Western Blot İle Protein Kantitasyon Analizi

Western blot elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde yürütülen proteinlerin, destek membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metodlarla gösterilmesidir (Burnette, 1981; Harlow ve Lane, 1988). Blotlamadan önce çalışılan numunedeki proteinler elektriksel ortamda jel üzerinde yürütülmektedir. Proteinlerin elektroforezleri, proteinlerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında kullanılan temel biyokimyasal yöntemlerden biri olan, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jelde (SDS-PAGE) gerçekleştirilmektedir (Harlow ve Lane, 1988). Proteinlerin elektroforezinde kullanılan SDS-PAGE, proteinin moleküler ağırlığıyla orantılı olarak elektrik akımı ile artı kutuba doğru göç etmesini ve jelde bulundukları yerde bantlar oluşturmasını sağlar. Western blot tekniği elektroforez işlemi takip eden 4 aşamada gerçekleştirilir. Bu aşamalar; jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve proteinlerin görüntülenmesi şeklindedir.

3.7.1. Hücre Lizatların Hazırlanması

Hücrelerin hazırlanması için öncelikle 6 kuyucuklu plate'e her bir kuyucukta yaklaşık 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki MCF-7 hücre hattı için 5, 10 ve 15 μ M konsantrasyonlarında juglon ve 5, 10 ve 15 μ M konsantrasyonlarında kurkumin,

MDA-MB-231 hücre hattı içinse 1, 2 ve 3 μM konsantrasyonlarda juglon ve 1, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında kurkumin uygulanarak 24 saat 37°C 'de %5 CO_2 'li etüvde inkübasyona bırakıldı. 24 saat bitiminden sonra muameleyi ortadan kaldırmak için juglon ve kurkumin içeren besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra 3-4 dk tripsin muamelesi ile hücreler kuyucuk yüzeyinden kaldırıldı ve bir falkon tüpe alındı. Hücreler, 1500 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve PBS eklenerek 1500 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Yıkama işlemi 2 kez yapıldı. Tekrar süpernatant uzaklaştırıldı, hücre pelleti $2 \times 10^7/\text{ml}$ oranına uygun miktarda Ripa Lysis Buffer System (Santa Cruz, sc-24948) ile çözdürüldü ve proteaz inhibitör kokteyli eklendi. Süspansiyon 1,5 μl 'lik tüplere alındı ve 16,000 g'de 20 dk 4°C 'de santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra protein miktar tayini analizini yapmak için küçük bir lizat hacmi alındı. Her hücre lizatı için protein konsantrasyonu belirlendi ve hücre lizatları -80°C 'de muhafaza edildi.

3.7.2. Hücrelerin Protein Analizleri

Elektroforez işlemlerine başlamadan önce jele yüklenecek protein miktarlarının analizi için BCA Protein Assay Kit (Thermo, 23225)'i kullanıldı.

Hücrelerin protein sonuçlarını hesaplayabilmek için kitin içeriğindeki prosedüre göre 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ albümin standartları hazırlandı. Ardından da çalışmada kullanmak için 50 birim A reaktifi ile 1 birim B reaktifi birleştirilerek protein reaktifi hazırlandı.

Kullanılacak solüsyonlar hazırlandıktan sonra 96 kuyucuklu platelere gruplar 3 tekrarlı olacak şekilde her kuyucuğa 200 μl hazırlanmış olan protein reaktifi eklendi ve üzerlerine 10 μl standart veya hücrelerden ilave edildi. Daha sonra 37°C 'de %5 CO_2 'li etüvde ve karanlıkta 30 dk inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonunda 562 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda absorbansı ölçüldü ve her gruptaki 3'lü tekrarların ortalamaları alındı. Albümin standartlarının sonuçlarına göre kalibrasyon grafiği çizildi ve her numunenin jele yüklemek için gerekli olan protein miktarı grafik denkleminde hesaplandı ve eşitlemeleri (30 μg) yapıldı.

3.7.3. SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması ve Elektroforez

Proteinleri moleküler boyutlarına göre ayırmak için %4'lük üst jel (dH_2O , akrilamid-bis, 0,5M Tris (6,8 pH), %10 SDS, %10 amonyum persülfat (APS), Temed)

ve %10'luk alt jel (dH₂O, akrilamid-bis, 1,5M Tris (8,8 pH), %10 SDS, %10 amonyum persülfat (APS), Temed) kullanıldı.

İlk önce %10'luk alt jel hazırlandı ve jel kalıbı içerisine pipet yardımı ile eklendi. Jelin polimerizasyonu için 20 dk bekletildi. Daha sonra %4'lük üst jel hazırlandı ve alt jel polimerize olduktan sonra pipet yardımı ile jel kalıbına ilave edildi. Kuyucukların oluşması için jel tarağı takıldı ve tekrar 20 dk polimerizasyon için bekletildi.

Hazırlanan jelin üzerindeki tarak çıkartıldı ve jel kalıbı elektroforez kabına yerleştirildi. Oluşan kuyucuklara moleküler ağırlık belirteci ile birlikte 30 µg protein örnekleri yüklendi. Kabın içerisine yürütme tamponu (tris base, glisin, %10 SDS, distile su) eklendi ve jel 120 V'de 2 saat yürümeye bırakıldı.

3.7.4. Proteinlerin Membrana Transferi

Transfer için kullanılacak olan PVDF (Poli-viniliden diflorür) membranı 1 dk metanol ile aktive edildi ve jel ve membran yüklemeden önce transfer tamponu (tris base, glisin, %20 v/v metanol) ile çalkalandı. Bir miktar transfer tamponunun içine koyulan transfer kasetine sırası ile sünger, 2 tane kurutma kağıdı ve jel yerleştirildi. Jelin üzerine aktive edilmiş PVDF membran ve tekrar 2 tane kurutma kağıdı ile sünger yerleştirildi. Kaset kapatıldıktan sonra transfer kabına takıldı ve üzerine transfer tamponu ilave edildi. 100 V, 200 mA' de 2 saat transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.7.5. Bloklama

Bloklama işlemi, proteinlerin transferinden sonra membranla antikorlar arasındaki spesifik olmayan bağlanmaları en aza indirmek için uygulanır.

Transfer kasedinden çıkarılan PVDF membranı üzerindeki proteinlerin transferi, Ponceau S boyaması kullanılarak kontrol edildi. Daha sonra PVDF membranı 1X TBST (%0,1 Tween20) yıkama tamponu içerisinde 2 kez 10 dk çalkalayıcıda bırakıldı. Yıkama solüsyonu döküldükten sonra membran üzerine %5 BSA (Bovine Serum Albumin) ve 1X TBST ile hazırlanan bloklama tamponu eklenir. 1 saat çalkalayıcıda bırakılır. Bloklama yapıldıktan sonra membrana 2 kez 1X TBST ile 10 dakika yıkama yapılır.

3.7.6. Primer ve Sekonder Antikor İnkübasyonu

Primer antikorlar (E-FABP Antibody sc-365166, T-FABP Antibody sc-390196 Santa Cruz) 1X TBST ve %5 BSA ile dilüe edilerek hazırlandı ve membran üzerine ilave edildi. Membran antikorla muamelesi için gece boyunca 4°C’de inkübe edildi. Primer antikor muamelesinden sonra tutunmayan fazla antikorları uzaklaştırmak için 3 kez 1X TBST ile 5 dk çalkalayıcıda yıkama işlemi yapıldı.

HRP (horse-radish peroksidaz) konjuge sekonder antikorlar (m-IgGκ BP-HRP sc-516102 Santa Cruz) 1X TBST ve %5 BSA ile dilüe edilerek hazırlandı ve membran üzerine eklendi. Membran 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Muameleden sonra fazla antikorları uzaklaştırmak için 3 kez 1X TBST ile 5 dk çalkalayıcıda yıkama işlemi yapıldı.

3.7.7. ECL ile Görüntüleme

Sekonder antikor ile konjuge horse-radish peroksidaz (HRP) enzimi, ECL çözeltisi içinde bulunan Lumigen PS-3 substratını katalizler. Bu reaksiyon sonucu açığa çıkan luminol ışımaya yol açar. Bu ışıma özel filmler ile saptanır.

A reaktifi ve B reaktifinin belli oranlarda karıştırılmasıyla ECL solüsyonu hazırlandı. Karanlık ortamda şeffaf dosya arasına yerleştirilmiş membran üzerine 1 ml ECL solüsyonu eklendi. Membranı kaplayacak şekilde X-ray filmi kapatıldı ve 3-4 dk bekletildi. Membranın üzerine koyulan X-ray filmi banyo edildi ve protein bantlarının görünür hale gelmesi sağlanarak değerlendirme yapıldı.

3.8. İstatistiksel Analiz

MTT, Real-Time PCR ve western blot analizi sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Farklı konsantrasyonda juglon ve kurkumin muamelesi yapılmış gruplar ile negatif kontrol olarak juglon ve kurkumin muamelesi yapılmamış grup kullanıldı ve bu madde muamelesi yapılmış gruplar ve negatif kontrol grubu arasında istatistiksel olarak karşılaştırma yapmak için nonparametrik- kruskal wallis analizi uygulandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

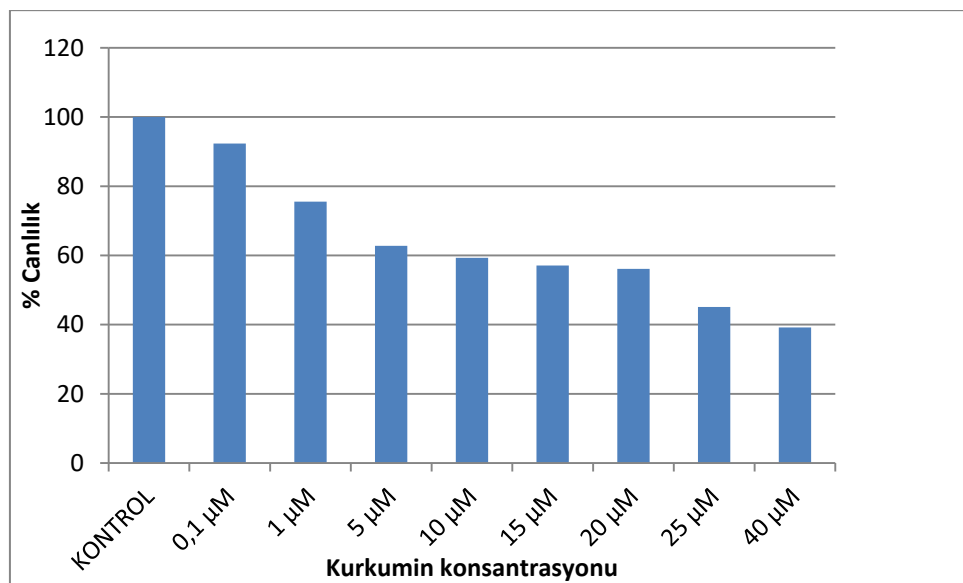
4.1. BULGULAR

Çalışmada yapılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında juglon ve kurkuminin sitotoksik etkisini gösteren MTT analizi sonuçları ve FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonu ve protein düzeyini gösteren Real-Time PCR analizi ve Western blot analizi sonuçları aşağıda verilmiştir.

4.1.1. MCF-7 Hücre Hattı Üzerinde Kurkuminin Sitotoksik Etkileri

MCF-7 hücre hattına IC₅₀ dozunu belirlemek için 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25 ve 40 µM konsantrasyonlarında kurkumin muamelesi yapıldı ve 24 saat etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra MTT analizi uygulandı ve spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Kontrol grubu ve kurkumin muamelesi yapılan grupların absorbans sonuçlarına göre % hücre canlılığı hesaplandı.

24 saatlik kurkumin uygulamasından sonra farklı kurkumin konsantrasyonlarında MCF-7 hücre hattının hücre canlılığı yüzdeleri 0,1 µM için %92,32, 1 µM için %75,55, 5 µM için %62,8, 10 µM için %59,3, 15 µM için %57,11, 20 µM için %56,11 ve 25 µM için %45,11 ve 40 µM için %39,18 olarak tespit edildi. %50 inhibisyon konsantrasyonu yani IC₅₀ dozu 22,41 µM olarak hesaplandı (p<0.05) (Şekil 4.1.).

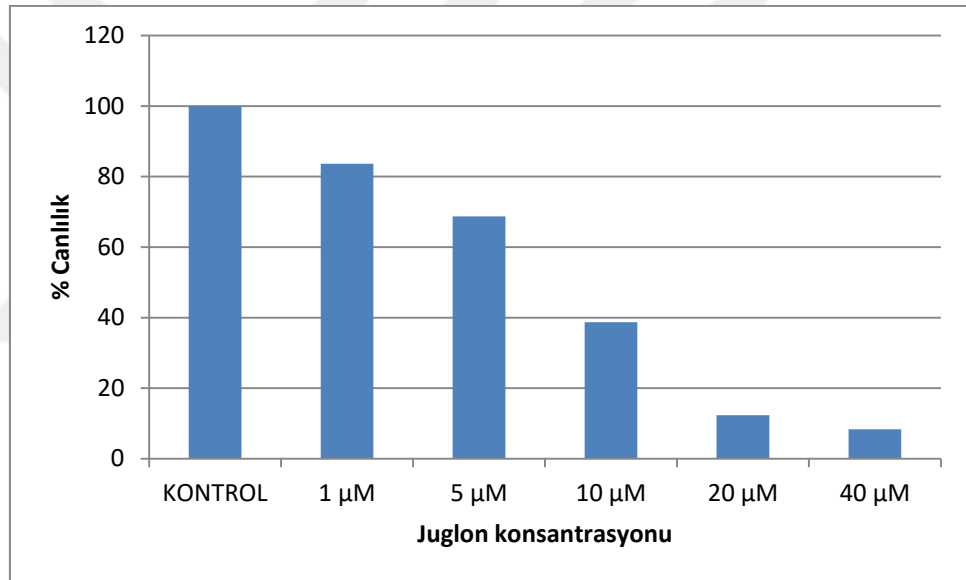


Şekil 4.1. MCF-7 hücre hattında kurkumin uygulama dozlarının hücre canlılığına etkisi

4.1.2. MCF-7 Hücre Hattı Üzerinde Juglonun Sitotoksik Etkileri

MCF-7 hücre hattına IC_{50} dozunu belirlemek için 7,5, 10, 15 ve 20 μM konsantrasyonlarında juglon muamelesi yapıldı ve 24 saat etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra MTT analizi uygulandı ve spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Kontrol grubu ve juglon muamelesi yapılan grupların absorbans sonuçlarına göre % hücre canlılığı hesaplandı.

24 saatlik juglon uygulamasından sonra farklı kurkumin konsantrasyonlarında MCF-7 hücre hattının hücre canlılığı yüzdeleri 7,5 μM için %98,97, 10 μM için %90,6, 15 μM için %54,95, 20 μM için %27,89 olarak tespit edildi. %50 inhibisyon konsantrasyonu yani IC_{50} dozu 16,27 μM olarak hesaplandı ($p < 0.05$) (Şekil 4.2.).

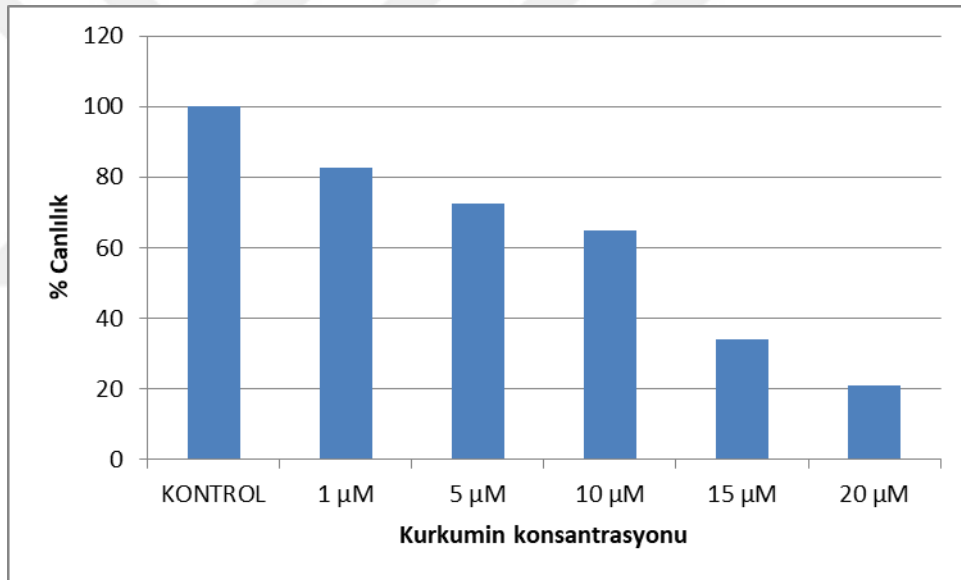


Şekil 4.2. MCF-7 hücre hattında juglon uygulama dozlarının hücre canlılığına etkisi

4.1.3. MDA-MB-231 Hücre Hattı Üzerinde Kurkuminin Sitotoksik Etkileri

MDA-MB-231 hücre hattına IC_{50} dozunu belirlemek için 1, 5, 10, 15 ve 20 μM konsantrasyonlarında kurkumin muamelesi yapıldı ve 24 saat etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra MTT analizi uygulandı ve spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü. Kontrol grubu ve kurkumin muamelesi yapılan grupların absorban sonuçlarına göre % hücre canlılığı hesaplandı.

24 saatlik kurkumin uygulamasından sonra farklı kurkumin konsantrasyonlarında MDA-MB-231 hücre hattının hücre canlılığı yüzdeleri 1 μM için %82,56, 5 μM için %72,36, 10 μM için %64,73, 15 μM için %33,85, 20 μM için %20,8 olarak tespit edildi. %50 inhibisyon konsantrasyonu yani IC_{50} dozu 10,43 μM olarak hesaplandı ($p < 0.05$) (Şekil 4.3.).

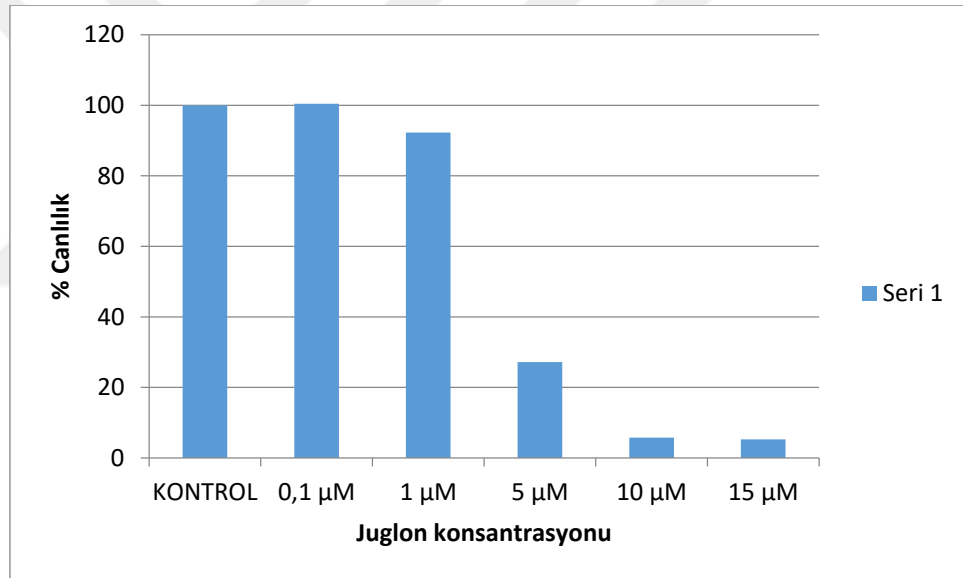


Şekil 4.3. MDA-MB-231 hücre hattında kurkumin uygulama dozlarının hücre canlılığına etkisi

4.1.4. MDA-MB-23 Hücre Hattı Üzerinde Juglonun Sitotoksik Etkileri

MDA-MB-231 hücre hattına IC_{50} dozunu belirlemek için 0,1, 1, 5, 10 ve 15 μM konsantrasyonlarında juglon muamelesi yapıldı ve 24 saat etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra MTT analizi uygulandı ve spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü. Kontrol grubu ve juglon muamelesi yapılan grupların absorban sonuçlarına göre % hücre canlılığı hesaplandı.

24 saatlik juglon uygulamasından sonra farklı juglon konsantrasyonlarında MDA-MB-231 hücre hattının hücre canlılığı yüzdeleri 0,1 μM için %100,45, 1 μM için %92,28, 5 μM için %27,2 10 μM için %5,78, 15 μM için %5,26 olarak tespit edildi. %50 inhibisyon konsantrasyonu yani IC_{50} dozu 3,38 μM olarak hesaplandı ($p < 0.05$) (Şekil 4.4.).

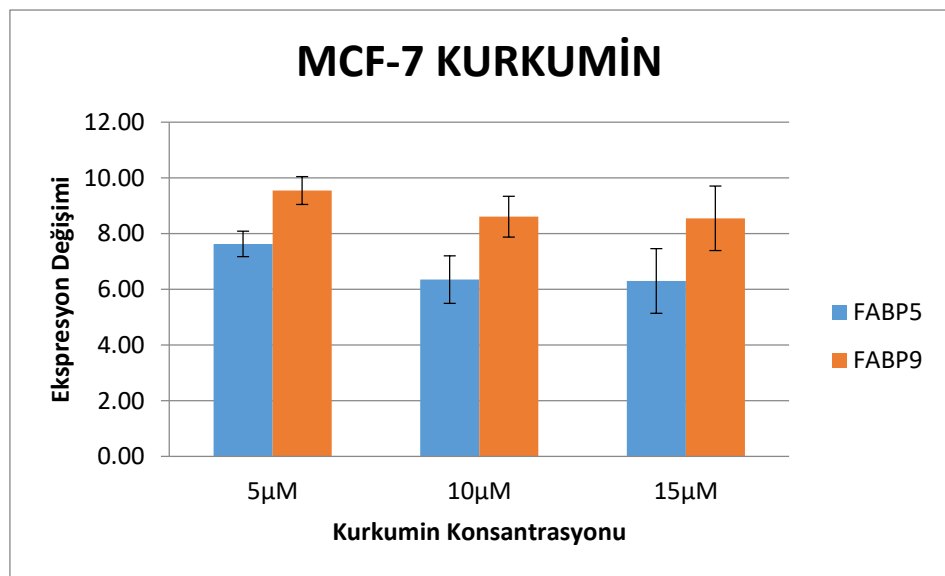


Şekil 4.4. MDA-MB-231 hücre hattında juglon uygulama dozlarının hücre canlılığına etkisi

4.1.5. MCF-7 Hücre Hattında Kurkumin Uygulamasının FABP5 ve FABP9 Gen Ekspresyonlarına Etkileri

MCF-7 hücre hattına belirlenen IC_{50} değerine göre 5, 10 ve 15 μM konsantrasyonlarında kurkumin muamelesi yapıldı ve 24 saat inkübasyon işlemi uygulandı. 24 saat sonunda MCF-7 hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı ve sonrasında cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'larla Real-Time PCR'da MCF-7 hücrelerinde kurkumin uygulaması sonucu FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarına bakıldı. Real-Time PCR sonuçlarından elde edilen C_t değerlerine göre MCF-7 hücre hattında 24 saatlik kurkumin uygulaması yapılan gruplar ve kontrol grubunda FABP5 ve FABP9'un β -aktin'e normalizasyonu ile $-\Delta\Delta C_t$ değerleri hesaplandı. Daha sonra kurkumin muamelesi yapılmış gruplar ile kontrol grubu arasında FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde kruskal wallis tek yön varyans analizi kullanıldı.

Buna göre; MCF-7 hücre hattında 24 saatlik 5 μM , 10 μM , 15 μM 'lik konsantrasyonlarda kurkumin uygulaması yapılan gruplardaki FABP5 ve FABP9 gen ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna göre kıyasla FABP5 gen ekspresyonunda sırasıyla 7.63; 6.35; 6.3 kat artış tespit edildi ve FABP9 gen ekspresyonunda ise sırasıyla 9.55; 8.61; 8.55 kat artış tespit edildi. Her iki gen için de kontrole göre anlamlı bir artış tespit edilmesine rağmen gruplar arası anlamlı fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.5).

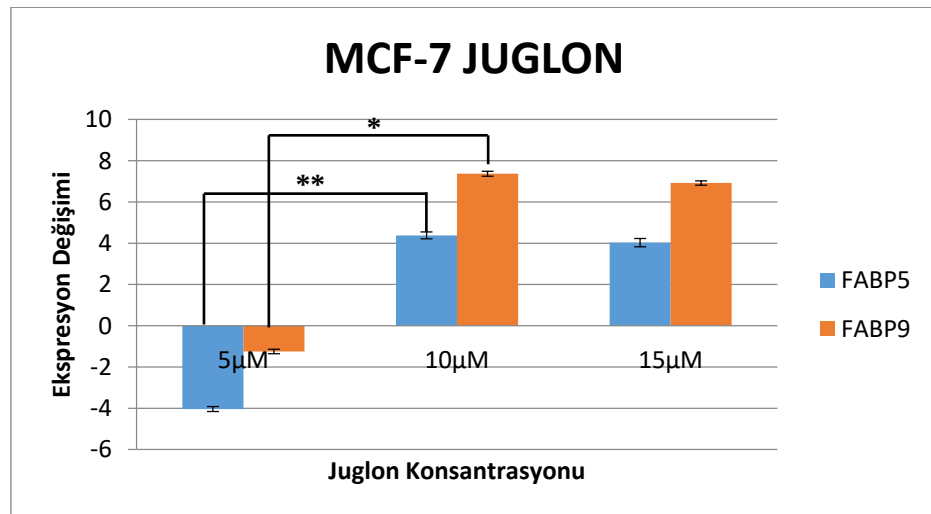


Şekil 4.5. MCF-7 hücre hattında kurkumin uygulama dozlarının FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi

4.1.6. MCF-7 Hücre Hattında Juglon Uygulamasının FABP5 ve FABP9 Gen Ekspresyonlarına Etkileri

Mcf-7 hücre hattına belirlenen IC_{50} değerine göre 5, 10 ve 15 μM konsantrasyonlarında juglon muamelesi yapıldı ve 24 saat inkübasyon işlemi uygulandı. 24 saat sonunda MCF-7 hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı ve sonrasında cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'larla Real-Time PCR'da MCF-7 hücrelerinde juglon uygulaması sonucu FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarına bakıldı. Real-Time PCR sonuçlarından elde edilen C_t değerlerine göre MCF-7 hücre hattında 24 saatlik juglon uygulaması yapılan gruplar ve kontrol grubunda FABP5 ve FABP9'un β -aktin'e normalizasyonu ile $-\Delta\Delta C_t$ değerleri hesaplandı. Daha sonra juglon muamelesi yapılmış gruplar ile kontrol grubu arasında FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde kruskal wallis tek yön varyans analizi kullanıldı.

Buna göre; MCF-7 hücre hattında 24 saatlik 5 μM , 10 μM , 15 μM 'lik konsantrasyonlarda juglon uygulaması yapılan gruplardaki FABP5 ve FABP9 gen ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna göre kıyasla FABP5 gen ekspresyonunda sırasıyla 4.04 kat azalış tespit edilirken, 4.38; 4.03 kat artış tespit edildi ve 5 μM ve 10 μM konsantrasyonları arasındaki sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,011$) bir fark olduğu belirlendi. FABP9 gen ekspresyonunda ise sırasıyla 1.25 kat azalış tespit edilirken, 7.37; 6.92 kat artış tespit edildi ve 5 μM ve 10 μM konsantrasyonları arasındaki sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,007$) bir fark olduğu belirlendi. (Şekil 4.6).

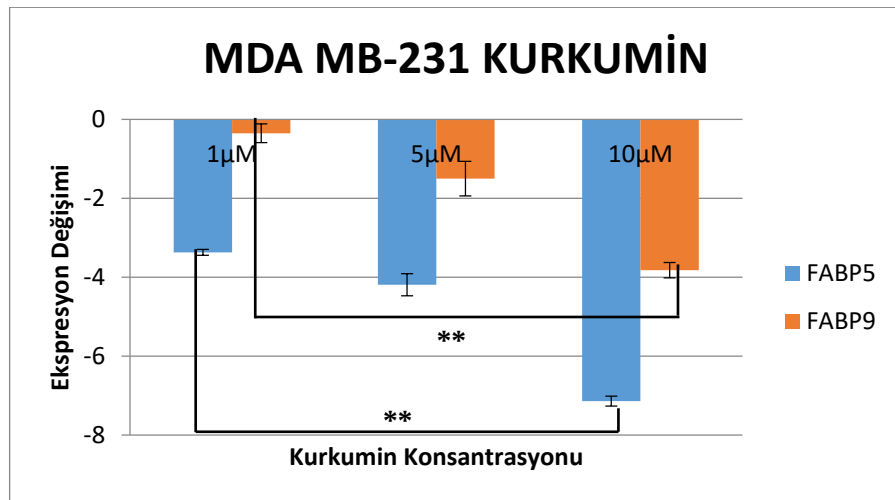


Şekil 4.6. MCF-7 hücre hattında juglon uygulama dozlarının FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

4.1.7. MDA-MB-231 Hücre Hattında Kurkumin Uygulamasının FABP5 ve FABP9 Gen Ekspresyonlarına Etkileri

MDA-MB-231 hücre hattına belirlenen IC_{50} değerine göre 1, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında kurkumin muamelesi yapıldı ve 24 saat inkübasyon işlemi uygulandı. 24 saat sonunda MDA-MB-231 hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı ve sonrasında cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'larla Real-Time PCR'da MDA-MB-231 hücrelerinde kurkumin uygulaması sonucu FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarına bakıldı. Real-Time PCR sonuçlarından elde edilen C_t değerlerine göre MDA-MB-23 hücre hattında 24 saatlik kurkumin uygulaması yapılan gruplar ve kontrol grubunda FABP5 ve FABP9'un β -aktin'e normalizasyonu ile $-\Delta\Delta C_t$ değerleri hesaplandı. Daha sonra kurkumin muamelesi yapılmış gruplar ile kontrol grubu arasında FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde kruskal wallis tek yön varyans analizi kullanıldı.

Buna göre; MDA-MB-231 hücre hattında 24 saatlik 1 μM , 5 μM , 10 μM 'lik konsantrasyonlarda kurkumin uygulaması yapılan gruplardaki FABP5 ve FABP9 gen ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna göre kıyasla FABP5 gen ekspresyonunda sırasıyla 3.37; 4.19; 7.14 kat azalış tespit edildi ve 1 μM ve 10 μM konsantrasyonları arasındaki sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,007$) bir fark olduğu belirlendi. FABP9 gen ekspresyonunda ise sırasıyla 0.35; 1.5; 3.82 kat azalış tespit edildi ve 1 μM ve 10 μM konsantrasyonları arasındaki sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,007$) bir fark olduğu belirlendi (Şekil 4.7).

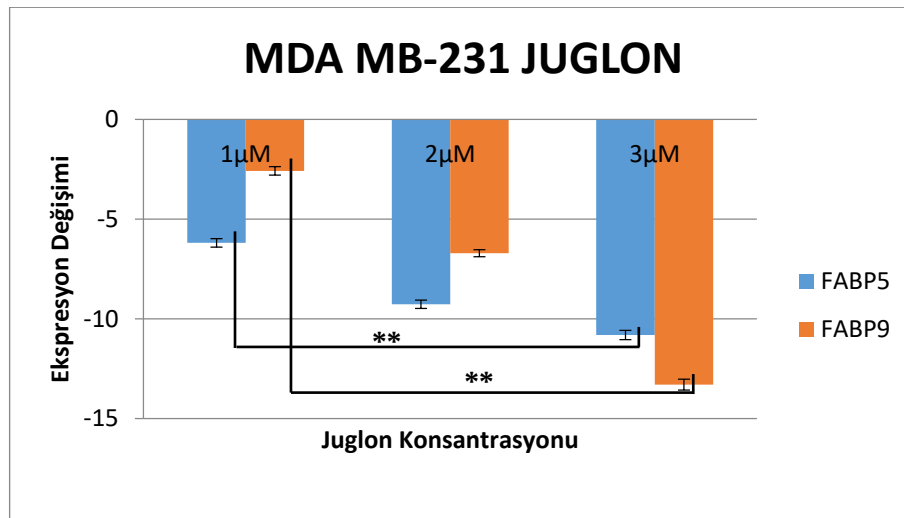


Şekil 4.7. MDA-MB-231 hücre hattında kurkumin uygulama dozlarının FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi (**: $p<0,01$)

4.1.8. MDA-MB-231 Hücre Hattında Juglon Uygulamasının FABP5 ve FABP9 Gen Ekspresyonlarına Etkileri

MDA-MB-231 hücre hattına belirlenen IC_{50} değerine göre 1, 2 ve 3 μM konsantrasyonlarında juglon muamelesi yapıldı ve 24 saat inkübasyon işlemi uygulandı. 24 saat sonunda MDA-MB-231 hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı ve sonrasında cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'larla Real-Time PCR'da MDA-MB-231 hücrelerinde juglon uygulaması sonucu FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarına bakıldı. Real-Time PCR sonuçlarından elde edilen C_t değerlerine göre MDA-MB-23 hücre hattında 24 saatlik juglon uygulaması yapılan gruplar ve kontrol grubunda FABP5 ve FABP9'un β -aktin'e normalizasyonu ile $-\Delta\Delta C_t$ değerleri hesaplandı. Daha sonra juglon muamelesi yapılmış gruplar ile kontrol grubu arasında FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde kruskal wallis tek yön varyans analizi kullanıldı.

Buna göre; MDA-MB-231 hücre hattında 24 saatlik 1 μM , 2 μM , 3 μM 'lik konsantrasyonlarda juglon uygulaması yapılan gruplardaki FABP5 ve FABP9 gen ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna göre kıyasla FABP5 gen ekspresyonunda sırasıyla 6.19; 9.27; 10.81 kat azalış tespit edildi ve 1 μM ve 3 μM konsantrasyonları arasındaki sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,007$) bir fark olduğu belirlendi. FABP9 gen ekspresyonunda ise sırasıyla 2.58; 6.71; 13.3 kat azalış tespit edildi ve 1 μM ve 3 μM konsantrasyonları arasındaki sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,007$) bir fark olduğu belirlendi (Şekil 4.8).



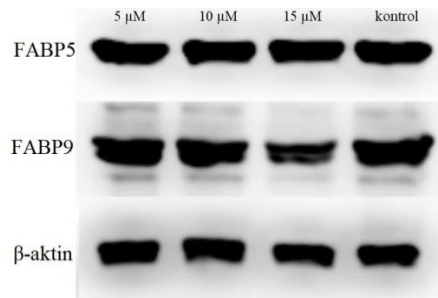
Şekil 4.8. MDA-MB-231 hücre hattında juglon uygulama dozlarının FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi (**: $p<0,01$)

4.1.9. MCF-7 Hücre Hattında Kurkumin Uygulamasının FABP5 ve FABP9 Protein Düzeylerine Etkileri

MCF-7 hücre hattına belirlenen IC_{50} değerine göre 5, 10 ve 15 μM konsantrasyonlarında kurkumin muamelesi yapıldı ve 24 saat inkübasyon işlemi uygulandı. 24 saat sonunda Ripa Lysis Buffer ve proteaz inhibitör kokteyli kullanılarak hücre lizatları hazırlandı. Hücre lizatlarındaki protein miktar tayini yapıldı ve western blot analizi aşamaları gerçekleştirildi. Daha sonra FABP5 ve FABP9 protein bant yoğunlukları görüntülendi ve hedef proteinlerle birlikte normalizasyon işlemleri için β -aktin proteinin tespiti de yapıldı. Image J programı kullanılarak FABP5 ve FABP9 bant yoğunlukları β -aktin bant yoğunlukları ile normalize edildi ve SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programında istatistiksel analizleri yapıldı.

Buna göre; MCF-7 hücre hattında 24 saat 5, 10 ve 15 μM konsantrasyonlarında kurkumin uygulaması yapılan gruplar ve kontrol grubu arasında FABP5 ve FABP9 protein düzeyleri sonuçları şu şekildedir:

FABP5 protein düzeylerinde, kontrol grubuna göre 5, 10 ve 15 μM kurkumin uygulaması yapılan grupların hepsinde azalma olduğu görüldü. 5 μM ve kontrol grubu arasındaki sonuçlarda ($p=0,04$) ve 10 μM ve kontrol grubu arasındaki sonuçlarda ($p=0,02$) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi. 10 μM ve 15 μM konsantrasyonları arasındaki sonuçlarda da istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi ($p=0,04$) (Şekil 4.9.). FABP9 protein düzeylerinde ise, kontrol grubuna göre 5, 10 ve 15 μM kurkumin uygulaması yapılan grupların hepsinde azalma olduğu görüldü. 10 μM ve kontrol grubu arasındaki sonuçlarda ($p=0,04$) ve 15 μM ve kontrol grubu arasındaki sonuçlarda ($p=0,003$) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi (Şekil 4.9.)



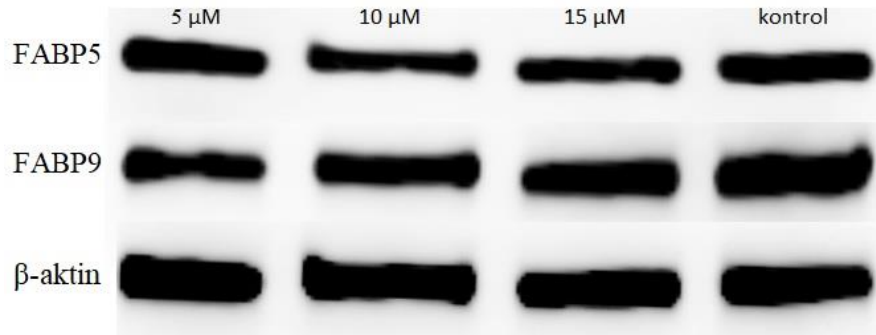
Şekil 4.9. MCF-7 hücre hattında kurkumin uygulama dozlarının FABP5, FABP9 ve β -aktin protein seviyeleri üzerindeki etkisini gösteren protein bant yoğunlukları

4.1.10. MCF-7 Hücre Hattında Juglon Uygulamasının FABP5 ve FABP9 Protein Düzeylerine Etkileri

MCF-7 hücre hattına belirlenen IC_{50} değerine göre 5, 10 ve 15 μ M konsantrasyonlarında juglon muamelesi yapıldı ve 24 saat inkübasyon işlemi uygulandı. 24 saat sonunda Ripa Lysis Buffer ve proteaz inhibitör kokteyli kullanılarak hücre lizatları hazırlandı. Hücre lizatlarındaki protein miktar tayini yapıldı ve western blot analizi aşamaları gerçekleştirildi. Daha sonra FABP5 ve FABP9 protein bant yoğunlukları görüntülendi ve hedef proteinlerle birlikte normalizasyon işlemleri için β -aktin proteinin tespiti de yapıldı. Image J programı kullanılarak FABP5 ve FABP9 bant yoğunlukları β -aktin bant yoğunlukları ile normalize edildi ve SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programında istatistiksel analizleri yapıldı.

Buna göre; MCF-7 hücre hattında 24 saat 5, 10 ve 15 μ M konsantrasyonlarında juglon uygulaması yapılan gruplar ve kontrol grubu arasında FABP5 ve FABP9 protein düzeyleri sonuçları şu şekildedir:

FABP5 protein düzeylerinde, kontrol grubuna göre 5, 10 ve 15 μ M juglon uygulaması yapılan grupların hepsinde azalma olduğu görüldü. 10 μ M ve kontrol grubu arasındaki sonuçlarda ($p=0,003$) ve 15 μ M ve kontrol grubu arasındaki sonuçlarda ($p=0,04$) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi. (Şekil 4.10.) FABP9 protein düzeylerinde ise, kontrol grubuna göre 5, 10 ve 15 μ M juglon uygulaması yapılan grupların hepsinde azalma olduğu görüldü. 5 μ M ve kontrol grubu arasındaki sonuçlarda ($p=0,002$) ve 10 μ M ve kontrol grubu arasındaki sonuçlarda ($p=0,04$) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi. 5 μ M ve 15 μ M konsantrasyonları arasındaki sonuçlarda da istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi ($p=0,04$) (Şekil 4.10.).



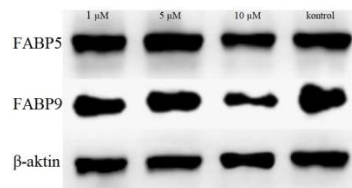
Şekil 4.10. MCF-7 hücre hattında juglon uygulama dozlarının FABP5, FABP9 ve β -aktin protein seviyeleri üzerindeki etkisini gösteren protein bant yoğunlukları

4.1.11. MDA-MB-231 Hücre Hattında Kurkumin Uygulamasının FABP5 ve FABP9 Protein Düzeylerine Etkileri

MDA-MB-231 hücre hattına belirlenen IC_{50} değerine göre 1, 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarında kurkumin muamelesi yapıldı ve 24 saat inkübasyon işlemi uygulandı. 24 saat sonunda Ripa Lysis Buffer ve proteaz inhibitör kokteyli kullanılarak hücre lizatları hazırlandı. Hücre lizatlarındaki protein miktar tayini yapıldı ve western blot analizi aşamaları gerçekleştirildi. Daha sonra FABP5 ve FABP9 protein bant yoğunlukları görüntülendi ve hedef proteinlerle birlikte normalizasyon işlemleri için β -aktin proteinin tespiti de yapıldı. Image J programı kullanılarak FABP5 ve FABP9 bant yoğunlukları β -aktin bant yoğunlukları ile normalize edildi ve SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programında istatistiksel analizleri yapıldı.

Buna göre; MDA-MB-231 hücre hattında 24 saat 1, 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarında kurkumin uygulaması yapılan gruplar ve kontrol grubu arasında FABP5 ve FABP9 protein düzeyleri sonuçları şu şekildedir:

FABP5 protein düzeylerinde, kontrol grubuna göre 1 ve 5 μ M konsantrasyonlarında kurkumin uygulaması yapılan gruplarda yükselme görülürken, 10 μ M konsantrasyonlarında kurkumin uygulaması yapılan grupta azalma olduğu görüldü. 1 μ M ve 10 μ M konsantrasyonları arasındaki sonuçlarda ($p=0,006$) ve 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonları arasındaki sonuçlarda ($p=0,017$) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi. (Şekil 4.11.) FABP9 protein düzeylerinde ise, kontrol grubuna göre 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarında kurkumin uygulaması yapılan gruplarda azalma olduğu görülürken 5 μ M konsantrasyonlarında kurkumin uygulaması yapılan grupta ise yükselme olduğu görüldü. 10 μ M ve kontrol grubu arasındaki sonuçlarda ($p=0,025$) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi. 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonları arasındaki sonuçlarda da istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi ($p=0,003$)(Şekil 4.11.).



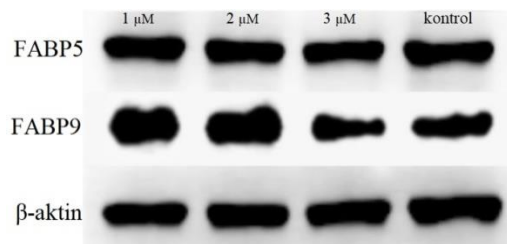
Şekil 4.11. MDA-MB-231 hücre hattında kurkumin uygulama dozlarının FABP5, FABP9 ve β -aktin protein seviyeleri üzerindeki etkisini gösteren protein bant yoğunlukları

4.1.12. MDA-MB-231 Hücre Hattında Juglon Uygulamasının FABP5 ve FABP9 Protein Düzeylerine Etkileri

MDA-MB-231 hücre hattına belirlenen IC_{50} değerine göre 1, 2 ve 3 μM konsantrasyonlarında juglon muamelesi yapıldı ve 24 saat inkübasyon işlemi uygulandı. 24 saat sonunda Ripa Lysis Buffer ve proteaz inhibitör kokteyli kullanılarak hücre lizatları hazırlandı. Hücre lizatlarındaki protein miktar tayini yapıldı ve western blot analizi aşamaları gerçekleştirildi. Daha sonra FABP5 ve FABP9 protein bant yoğunlukları görüntülendi ve hedef proteinlerle birlikte normalizasyon işlemleri için β -aktin proteinin tespiti de yapıldı. Image J programı kullanılarak FABP5 ve FABP9 bant yoğunlukları β -aktin bant yoğunlukları ile normalize edildi ve SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programında istatistiksel analizleri yapıldı.

Buna göre; MDA-MB-231 hücre hattında 24 saat 1, 2 ve 3 μM konsantrasyonlarında juglon uygulaması yapılan gruplar ve kontrol grubu arasında FABP5 ve FABP9 protein düzeyleri sonuçları şu şekildedir:

FABP5 protein düzeylerinde, kontrol grubuna göre 1 ve 3 μM konsantrasyonlarında juglon uygulaması yapılan gruplarda azalma olduğu görülürken, 2 μM konsantrasyonlarında juglon uygulaması yapılan grupta yükselme olduğu görüldü. Kontrol grubu veya grupların kendi aralarındaki kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.12.). FABP9 protein düzeylerinde ise, kontrol grubuna göre 1 ve 2 μM konsantrasyonlarında juglon uygulaması yapılan gruplarda yükselme olduğu görülürken, 3 μM konsantrasyonlarında juglon uygulaması yapılan grupta ise azalma olduğu görüldü. 2 μM ve kontrol grubu arasındaki sonuçlarda ($p=0,04$) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi. 1 μM ve 3 μM konsantrasyonları arasındaki sonuçlarda ($p=0,04$) ve 2 μM ve 3 μM konsantrasyonları arasındaki sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi ($p=0,002$) (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. MDA-MB-231 hücre hattında juglon uygulama dozlarının FABP5, FABP9 ve β -aktin protein seviyeleri üzerindeki etkisini gösteren protein bant yoğunlukları

4.2. TARTIŞMA

Meme kanserinin, dünya çapında kadınlarda en sık rastlanan kanser türü olarak, 2008 yılından itibaren diğer kanser türlerine oranla kadınlarda görülme oranının %23'ünü, kanserden dolayı gerçekleşen ölüm oranlarının ise %14'ünü oluşturduğu saptanmıştır (Jemal ve ark 2011). Meme kanserinin teşhis ve tedavisindeki ilerlemelere rağmen bu hastalıktan dolayı oluşan ölüm oranları son 20 yıl içerisinde artış göstermiştir (Al-Hajj ve ark 2003).

Hastalığa çözüm olabilmesi için endokrin tedavisi ve kemoterapi uygulanması sonucunda bile sonuç ölümle neticelenebilmektedir. Son on yıl içerisinde bu hastalığın tedavisinde kullanılması için pek çok ilaç geliştirilmiştir. Bu şekilde uygulanan anti-tümör ilaçları ile kanser kemoterapisi hızla ilerlemekte ve böylece pek çok kanser türünde daha pozitif sonuçlar gözlenmektedir. Çoğunlukla birçok kanser türünde uygulanan kemoterapi başarılı sonuçlar oluştururken, bazı durumlarda bu ilaçlar normal doku ve hücrelerde yan etkiler oluşturabilmektedir. Aynı zamanda vücudun ilaca karşı geliştirdiği direnç nedeniyle de tedavi etkisini gösterememektedir. Klinik açısından da çok ciddi bir problem olan ilaç direncinin nedenleri ve mekanizmaları hala daha araştırılmaktadır. Bundan dolayı parenteral veya oral yolla alınan farklı özellik ve yapıdaki antioksidan maddeler aracılığıyla ROS seviyeleri azaltılmaya ve antioksidan aktiviteleri arttırılarak kemoterapötiklerin oluşturduğu yan etkiler azaltılmaya veya tamamen engellenmeye çalışılmaktadır (Tsuruo ve ark 2003).

Kurkuminin; antioksidan (Dinkova-Kostova ve Talalay 2008), anti-enflamatuar (Pulido-Moran ve ark 2016), kanser kemoprevansiyonu (Hu ve ark 2015) ve anti-kanser aktiviteleri (López-Lázaro 2008) dahil olmak üzere birçok farmakolojik aktivitesi bildirilmiştir. İn vitro ve in vivo olarak yapılan çalışmalarda beyin, meme, karaciğer, pankreas, gastrointestinal, baş ve boyun, kolon, prostat ve deri gibi farklı organlardaki çeşitli kanser hücrelerinin kurkumin tarafından baskılandığı belirtilmiştir. Kurkuminin transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, proenflamatuar sitokinler, enzimler, ayrıca serbest radikaller ve insan kanserinde yer alan protein hedefleri dahil olmak üzere 30'dan fazla proteinle etkileşime girdiği bulunmuştur (Shanmugam ve ark 2015, Bahrami ve ark 2019) ve angiogenez de dahil olmak üzere birçok tümör gelişim sürecini engelleyen bir ajan olduğu tespit edilmiştir (Aggarwal ve Harikumar 2009).

Kurkumin, kaspazların aktivasyonu ve mitokondriyal sitokrom C salınımı yoluyla kanserli hücrelerde apoptozu başlatır (Anto ve ark 2002). Ayrıca glutatyon S-

transferazlarının (GST) (Hayeshi ve ark 2007) aşırı ekspresyonu aracılığıyla, sitokrom P450 (CYP) enzimlerini (Thapliyal ve Maru 2001) veya oksidatif stresi ve enflamasyonu iptal ederek hem tümör oluşumunu hem de ilerlemeyi baskılayabildiği gözlemlenmiştir (Ruby ve ark 1995).

Hu ve ark. tarafından yapılan çalışmada; MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına uygulanan kurkuminin, proliferasyonu azalttığı ve koloni oluşumunu engellediği ayrıca MDA-MB-231 hücre hattında ise migrasyon ve invazyonu inhibe ettiği bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmamızda da hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerinde kurkuminin hücre canlılığını azalttığını belirledik. Çalışmamızda iki hücre hattı gruplarında da MTT analizi sonucunda hücre yoğunluğunun, kurkumin uygulanmayan grupta en yüksek değere sahip olduğunu ve bu değer kurkumin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak düştüğünü tespit ettik. 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda MCF-7 hücre hatında kurkuminin IC₅₀ değerinin 22,41 µM, MDA-MB-231 hücre hattında ise kurkuminin IC₅₀ değeri 10,43 µM olarak tespit ettik. Hu ve ark. yaptığı çalışmada 24 ve 48 saat kurkumin uygulaması sonucunda MCF-7 hücre hattında IC₅₀ değerini 20 µM, MDA-MB-231 hücre hattında ise 15 µM olarak bulmuşlardır. Tez çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar Hu ve ark. sonuçları ile benzerlik göstermiştir. İki çalışmada da çıkan sonuçlara göre kurkumine MDA-MB-231 hücreleri, MCF-7 hücrelerine göre daha duyarlı olduğu görüşüne varılmıştır (Hu ve ark 2019).

Juglon, farklı meme kanseri modelleri üzerinde antikanser etkileri sergilemiştir. MCF-7'de, juglon G1 evresinde hücre döngüsünü durdurmuş ve ROS güdümlü apoptozu desteklemiştir. MCF-7 üzerine yapılan kapsamlı bir çalışma, juglonun Bax / Bcl2 oranını, hücre içi kalsiyum (Ca²⁺) seviyelerini, sitokrom c (Cyt-c) salınımını ve kaspaz-3 aktivasyonunu arttırdığını ve intrinsik apoptotik yolun aktivasyonunu sağladığını kanıtlamıştır. Bu sonuçlar, meme kanseri tedavisinde uygulamalarla birlikte, juglon kaynaklı apoptoz mekanizması hakkında değerli bilgiler sunmaktadır. (M10) MCF-7'de hücre proliferasyonunu, koloni oluşumunu ve migrasyon kabiliyetini inhibe ettiğini göstermiştir. Juglon-aracılı oksidatif stres O₃'ü (FOXO3) tetiklemiş, bu da p53'ü modüle etmiş ve hücrel homeostatik dengeyi değiştirerek apoptozu tetiklemiştir.

Y. B. Ji ve ark. yapmış olduğu çalışmada juglonun MCF-7 hücre hattında hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir. MCF-7 hücre hattında 24 saat juglon uygulamasının hücre üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için yaptıkları MTT analizi sonucuna göre IC₅₀ değeri 11.99 µM olarak bulmuşlardır. Yapmış olduğumuz

çalışmamızda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 24 saatlik juglon uygulamasından sonra yapılan MTT analizi sonuçlarına göre, juglon uygulanmayan grupta en yüksek hücre yoğunluğu görülürken juglon konsantrasyonları yükseldikçe hücre yoğunluğunun azaltıldığı tespit edilmiştir. Juglonun sitotoksik etkisine göre belirlenen IC_{50} değerleri MCF-7 hücre hattında 16,27 μ M, MDA-MB-231 hücre hattında ise 3,38 μ M olarak hesaplanmıştır. Y. B. Ji ve ark. çalışması ile tez çalışmamızın MTT analizi sonuçları eşdeğer görünmektedir. Bizim çalışmamızda da juglonun MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında hücre canlılığını azalttığı sonucuna varılmıştır (Ji ve ark 2016).

FABP ailesinin birkaç üyesinin kanserde farklı şekilde ifade edildiği bildirilmiştir. Mesane kanserinde FABP4 ekspresyon kaybı rapor edilirken, FABP1 ve FABP2 prostat ve meme kanserlerinde aşırı eksprese edildiği gözlemlenmiştir (Das ve ark 2001, Hammamieh ve ark 2005). FABP7 meme dokusunda belirgin bir şekilde eksprese edilir (Shi ve ark 1997). MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde FABP7'nin aşırı ekspresyonu, büyüme inhibisyonu (Wang ve ark 2000) ve önemli morfolojik değişikliklerle sonuçlanmıştır. FABP7'yi aşırı eksprese eden hücrelerde kontrol hücrelerine göre daha güçlü bir büyüme inhibisyonu gözlenmiştir. FABP7'nin meme kanseri hücrelerinin in vivo büyümesini modüle edip edemeyeceğini belirlemek için Shi ve ark. insan meme kanseri hücrelerini FABP7 cDNA ile transfekte etmiş ve atimik nud farelerde tümör proliferasyonunu incelemiştir. Daha önce H-FABP için gözlemlendiği gibi, FABP7'nin aşırı ekspresyonu, bu model sistemdeki tümör büyümesini açıkça inhibe etmiştir (Shi ve ark 1997).

FABP5 cilt, mesane, pankreas, prostatik, mide, hepatoselüler karsinom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, baş ve boyun kanseri, melanom ve endometriyal kanser gibi birçok insan kanserinde yüksek oranda eksprese edilir. FABP5, yağ asidi metabolitleri ile hücre sinyal yolu üzerindeki etkisi aracılığıyla hücre döngüsü düzenlemesi, proliferasyon, apoptoz ve mide kanserinin invazyonuna dahil olabilir. FABP5'in susturulması, G0/G1'de hücre döngüsü durması vasıtasıyla invazyon, proliferasyon ve hücre büyümesini azaltmış ve gen ekspresyonundaki değişikliklerle mide kanseri hücrelerinin apoptozunu arttırmıştır. FABP5'in yüksek ekspresyonu daha büyük tümör boyutu ve daha yüksek metastazlı tümör seviyesi ile ilişkilidir. Meme kanseri fare modeline ilişkin gözlemler, FABP5 ekspresyonunun, ErbB2'nin amplifikasyonuna bağlı olarak meme tümörlerinde yüksek oranda arttığını göstermiştir.

Sıçan meme epitel hücrelerine odaklanan bir çalışma, FABP5 aşırı ekspresyonunun, uygun koşullar altında, bazı insan kanserlerinde metastazı indükleyebileceğini bulmuştur: iyi huylu, metastatik olmayan bir sıçan meme epitel hücre hattı FABP5 ile transfekte edilmiştir. Singenik sıçanlara aşılamının ardından, bu hayvanların neredeyse üçte birinde metastaz gelişirken, transfekte edilmemiş hücrelerle muamele edilen tüm hayvanlarda metastatik olmama özelliğini devam ettirmiştir (Jing ve ark 2001). Meme kanseri hastalarında prognostik bir belirteç olarak FABP5'in önemi, bir göğüs dokusu kohortunda yapılan incelenme sonucu, yüksek FABP5 düzeylerinin tümör derecesi ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmesiyle belirlenmiştir (Liu ve ark 2011). Yüksek FABP5 seviyeleri sadece meme karsinomunun tümörjenik özelliklerinde önemli bir belirleyici olmakla kalmaz (Levi ve ark 2013), aynı zamanda yüksek FABP5 düzeylerine sahip pankreas kanseri hücre alt tipleri, tümör büyümesinin inhibisyonu eksikliğine paralel olarak hücrelerin migrasyonu ve invazyonuyla ilişkili bulunmuştur (Gupta ve ark 2012). FABP5'in kanser hücresi hatlarındaki rolü hakkındaki kanıtlar ışığında, FABP5 yeni bir prognostik belirteç olarak işlev görebilir ve FABP5'in inhibe edilmesi, meme karsinom hücrelerini retinoid terapiye duyarlı hale getirmek için potansiyel bir kombinasyon tedavisi olarak işlev görebilir (Thulasiraman ve ark 2014).

Kanserde retinoid tedavisinin kullanımı, retinoidlerin farklılaşmayı, apoptozu ve hücre döngüsü durmasını indüklemeye yeteneği ile desteklenmektedir. Yapılan bir çalışmada kurkuminin, üçlü negatif meme karsinom (TNBC) hücrelerinde FABP5 ve PPAR β/δ ekspresyon seviyesini baskıladığı gözlemlenmiştir. Bu FABP5 / PPAR γ yolu, aktif EGFR ile meme karsinom hücrelerinin proliferasyonunun indüksiyonu için kritik öneme sahiptir. FABP5 / PPAR β/δ yolunu hedefleyerek, kurkumin, retinoik asidin PPAR β/δ 'ya verilmesini önlemiş ve retinoik asite bağlı PPAR β/δ hedef geni VEGF-A'yı baskılamıştır. Elde edilen sonuçlar, FABP5 / PPAR β/δ yolunun kurkumin tarafından baskılanmasının retinoik aside dirençli üçlü negatif meme kanseri hücrelerini retinoik asit aracılı büyüme süpresyonuna duyarlı hale getirdiğini göstermektedir. Bu sonuçlar ışığında, kurkuminin meme kanserinde retinoid asit direncini tersine çevirdiği mekanizmaları anlayarak, retinoid asit dirençli TNBC hastaları için kurkumin alternatif tedaviler sağlayabilir (Thulasiraman ve ark 2014).

Rong-Zong Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, FABP5'in meme kanserinde klinikopatolojik önemi araştırılmış ve FABP5 meme kanserinde prognostik bir belirteç ve olası yeni bir terapötik hedef olarak değerlendirilmiştir. Gen ekspresyon mikroyarray analizi, yüksek FABP5 RNA seviyeleri ile östrojen reseptörü (ER)/progesteron

reseptörü (PR) negatif durumu, yüksek tümör derecesi ve kötü prognoz arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. FABP5'in tümör büyümesi üzerindeki etkilerine öncelikle sitoplazmik FABP5 aracılık ettiği görülmektedir, çünkü nükleer FABP5 ve ER / PR-negatif durum, rekürrens ve sağkalım arasında korelasyon bulunmamıştır (Liu ve ark 2011).

Önceki çalışmaların bulgularına baktığımızda FABP5'in meme kanserinde prognostik bir belirteç olarak görülmesi ve meme kanseri hücrelerinde tümör gelişimini, invazyon ve migrasyonu engellemesi sonuçları bizim de FABP5'in gen ekspresyonuna ve protein düzeyindeki farklılıkları araştırmamıza neden olmuştur. Literatür taramasında FABP9 ve meme kanseri arasındaki ilişkiyi inceleyen herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Fakat meme kanseri ve diğer kanser türlerinde FABP'lerin birçok çeşidi ile yapılan çalışmalar vardır. Bu çalışmalar nedeniyle bizde bu tez çalışmamızda meme kanserinde FABP9'un etkilerini araştırarak literatüre katkı sağlamayı amaçladık.

Yapmış olduğumuz çalışmamızda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında uyguladığımız kurkumin ve juglon konsantrasyonları sonucu FABP5 ve FABP9 genlerinin ekspresyonları Real-Time PCR ile tespit edilmiştir. MCF-7 hücre hattında kurkumin uygulaması FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarında artışa neden olduğu ve juglon uygulaması ise 5 µM dozda azalma gösterirken yükselen dozlarda artış gösterdiği belirlenmiştir. FABP5 ve FABP9 protein düzeyleri western blot analizi ile tespit edilmiştir. MCF-7 hücre hattında kurkumin ve juglon uygulaması FABP5 ve FABP9 protein düzeylerinin her iki gen grubunda da azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Hem FABP5 de hem de FABP9 da gen ekspresyonlarında up regülasyon oluşmasına rağmen protein düzeylerinde down regülasyon olduğu saptanmıştır. MDA-MB-231 hücre hattında ise kurkumin ve juglon uygulaması FABP5 ve FABP9 protein düzeylerinde ilk dozlarda artışa neden olmuştur fakat yükselen dozlarda azalma tespit edilmiştir.

Çalışmamızda tespit ettiğimiz sonuçlar literatürdeki çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir. MCF-7 ve MDA-MB-213 meme kanseri hücre hatlarında juglon ve kurkumin uygulamasının hücre canlılığını ve FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonunu ve protein düzeyini azalttığı gözlemlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. SONUÇLAR

Çalışmamızda MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarında juglon ve kurkumin uygulaması sonucu hücre üzerindeki sitotoksik etkileri ve FABP5 ve FABP9 genlerinin ekspresyon analizleri ve protein düzeyleri araştırılmıştır. Her iki hücre hattında da kurkumin ve juglon uygulamasının hücre canlılığını ve FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonunu ve protein düzeyini azalttığı tespit edilmiştir.

Çalışma sonunda, MCF-7 hücre hattında kurkumin uygulaması sonucu IC_{50} dozu 22,41 μ M, juglon uygulaması sonucunda IC_{50} dozu 16,27 μ M olarak hesaplanmıştır. MDA-MB-231 hücre hattında ise kurkumin uygulaması sonucu IC_{50} dozu 10,43 μ M, juglon uygulaması sonucunda IC_{50} dozu 3,38 μ M olarak hesaplanmıştır.

MCF-7 hücre hattında 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda kurkumin uygulaması sonucunda, FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarının arttığı, fakat istatistiksel olarak kontrolle gruplar arasında anlamlı bir artış olmasına rağmen gruplar arası anlamlı fark olmadığı bulunmuştur.

MCF-7 hücre hattında 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda juglon uygulaması sonucunda FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarının ilk dozda azaldığı fakat yükselen dozlarda arttığı tespit edilmiştir. Juglonun 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p_{FABP5}=0,011$, $p_{FABP9}=0,007$).

MDA-MB-231 hücre hattında, 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda kurkumin uygulaması sonucunda FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarının azaldığı tespit edilmiştir. Kurkuminin 1 μ M ve 10 μ M konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p=0,007$).

MDA-MB-231 hücre hattında, 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda juglon uygulaması sonucunda FABP5 ve FABP9 gen ekspresyonlarının azaldığı tespit edilmiştir. Juglonun 1 μ M ve 3 μ M konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p=0,007$).

FABP5 ve FABP9 gen ekspresyon analizleri yapıldıktan sonra, bu proteinlere ait özgün antikorlar kullanılarak Western blot analizi yapılmıştır. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında kontrol grubuna göre kurkumin ve juglon uygulanan gruplarda FABP5 ve FABP9 protein düzeyinde azalma olduğu bulunmuştur.

5.2. ÖNERİLER

Kurkumin ve juglonun antikanserojenik etkilerinin yeni yapılacak çalışmalarda daha geniş kapsamlı analizler yapılarak yeni bir ilaç ya da mevcut ilaçlarla beraber kullanılması ile terapötik potansiyelleri açıklanabilir ve antikanser, antimetastatik ve antianjiyogenik etkileri hücre kültürü ve hayvan deneyleri ile desteklenebilir.

FABP5 ve FABP9'un gen ve protein seviyelerindeki azalmalarının hangi sinyal yolları ile bağlantılı olduğu ve meme kanserinde tümör gelişme sürecindeki etkileri araştırılabilir.

Çalışmada tespit ettiğimiz sonuçlar, literatürdeki diğer çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde meme kanserinde kurkumin ve juglon kullanımının yeni tedavi stratejileri geliştirilmesi konusunda umut verici olduğu kanısına varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Adamson J, Morgan EA, Beesley C, Mei Y, Foster CS, Fujii H, Rudland PS, Smith PH, Ke Y, 2003. High-level expression of cutaneous fatty acid-binding protein in prostatic carcinomas and its effect on tumorigenicity. *Oncogene*, 22, 18, 2739-49.
- Aggarwal BB, Harikumar KB, 2009. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41, 1, 40-59.
- Agulleiro MJ, André M, Morais S, Cerdà J, Babin PJ, 2007. High transcript level of fatty acid-binding protein 11 but not of very low-density lipoprotein receptor is correlated to ovarian follicle atresia in a teleost fish (*Solea senegalensis*). *Biology of reproduction*, 77, 3, 504-16.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF, 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 7, 3983-8.
- Al-Jameel W, Gou X, Forootan SS, Al Fayi MS, Rudland PS, Forootan FS, Zhang J, Cornford PA, Hussain SA, Ke Y, 2017. Inhibitor SBFI26 suppresses the malignant progression of castration-resistant PC3-M cells by competitively binding to oncogenic FABP5. *Oncotarget*, 8, 19, 31041.
- Al Fayi MS, Gou X, Forootan SS, Al-Jameel W, Bao Z, Rudland PR, Cornford PA, Hussain SA, Ke Y, 2016. The increased expression of fatty acid-binding protein 9 in prostate cancer and its prognostic significance. *Oncotarget*, 7, 50, 82783.
- Alshareeda AT, Rakha EA, Nolan CC, Ellis IO, Green AR, 2012. Fatty acid binding protein 7 expression and its sub-cellular localization in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 134, 2, 519-29.
- Amiri M, Yousefnia S, Forootan FS, Peymani M, Ghaedi K, Esfahani MHN, 2018. Diverse roles of fatty acid binding proteins (FABPs) in development and pathogenesis of cancers. *Gene*, 676, 171-83.
- Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB, 2007. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular pharmaceuticals*, 4, 6, 807-18.
- Anto RJ, Mukhopadhyay A, Denning K, Aggarwal BB, 2002. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis*, 23, 1, 143-50.
- Araujo C, Leon L, 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, 5, 723-8.

- Asmaa A-B, Majed A-F, Al-Jameel W, Jiacheng Z, Youqiang K, 2017. Increased FABP12 expression in prostate cancer and its possible promoting role in malignant progression. *European Journal of Surgical Oncology*, 43, 11, 2208.
- Bahrami A, Majeed M, Sahebkar A, 2019. Curcumin: A potent agent to reverse epithelial-to-mesenchymal transition. *Cellular Oncology*, 1-17.
- Barati N, Momtazi-Borojeni AA, Majeed M, Sahebkar A, 2019. Potential therapeutic effects of curcumin in gastric cancer. *Journal of cellular physiology*, 234, 3, 2317-28.
- Bhandarkar SS, Arbiser JL, 2007. Curcumin as an inhibitor of angiogenesis. In: *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*. Eds: Springer, p. 185-95.
- Bingold TM, Franck K, Holzer K, Zacharowski K, Bechstein WO, Wissing H, Scheller B, 2015. Intestinal fatty acid binding protein: a sensitive marker in abdominal surgery and abdominal infection. *Surgical infections*, 16, 3, 247-53.
- Blackwood MA, Weber BL, 1998. BRCA1 and BRCA2: from molecular genetics to clinical medicine. *Journal of Clinical Oncology*, 16, 5, 1969-77.
- Boiteux G, Lascombe I, Roche E, Plissonnier ML, Clairotte A, Bittard H, Fauconnet S, 2009. A-FABP, a candidate progression marker of human transitional cell carcinoma of the bladder, is differentially regulated by PPAR in urothelial cancer cells. *International journal of cancer*, 124, 8, 1820-8.
- Bray F, McCarron P, Parkin DM, 2004. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast cancer research*, 6, 6, 1-11.
- Cailleau R, Olive M, Cruciger QV, 1978. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In vitro*, 14, 11, 911-5.
- Campbell JB, 2002. Breast cancer-race, ethnicity, and survival: a literature review. *Breast cancer research and treatment*, 74, 2, 187-92.
- Catanzaro E, Greco G, Potenza L, Calcabrini C, Fimognari C, 2018. Natural products to fight cancer: A focus on *Juglans regia*. *Toxins*, 10, 11, 469.
- Cerrada I, Ruiz-Saurí A, Carrero R, Trigueros C, Dorronsoro A, Sanchez-Puelles JM, Diez-Juan A, Montero JA, Sepúlveda P, 2013. Hypoxia-inducible factor 1 alpha contributes to cardiac healing in mesenchymal stem cells-mediated cardiac repair. *Stem cells and development*, 22, 3, 501-11.
- Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S, 2010. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast disease*, 32, 1-2, 35.
- Chmurzyńska A, 2006. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *Journal of applied genetics*, 47, 1, 39-48.

- Cokkinides V, Albano J, Samuels A, Ward M, Thum J, 2005. American cancer society: Cancer facts and figures. Atlanta: American Cancer Society.
- Colditz GA, Kaphingst KA, Hankinson SE, Rosner B, 2012. Family history and risk of breast cancer: nurses' health study. *Breast cancer research and treatment*, 133, 3, 1097-104.
- Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese Jr RV, 2013. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell metabolism*, 18, 2, 153-61.
- Darimont C, Gradoux N, Persohn E, Cumin F, De Pover A, 2000. Effects of intestinal fatty acid-binding protein overexpression on fatty acid metabolism in Caco-2 cells. *Journal of lipid research*, 41, 1, 84-92.
- Das R, Hammamieh R, Neill R, Melhem M, Jett M, 2001. Expression pattern of fatty acid-binding proteins in human normal and cancer prostate cells and tissues. *Clinical cancer research*, 7, 6, 1706-15.
- De Santis ML, Hammamieh R, Das R, Jett M, 2004. Adipocyte-fatty acid binding protein induces apoptosis in DU145 prostate cancer cells. *Journal of experimental therapeutics & oncology*, 4, 2.
- DeSantis CE, Fedewa SA, Goding Sauer A, Kramer JL, Smith RA, Jemal A, 2016. Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66, 1, 31-42.
- DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD, Goding Sauer A, Jemal A, Siegel RL, 2019. Breast cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*, 69, 6, 438-51.
- DI Pietro SM, Dell'angelica EC, Veerkamp JH, Sterin-Speziale N, Santomé JA, 1997. Amino acid sequence, binding properties and evolutionary relationships of the basic liver fatty-acid-binding protein from the catfish *Rhamdia sapo*. *European journal of biochemistry*, 249, 2, 510-7.
- Ding L, Li J, Song B, Xiao X, Zhang B, Qi M, Huang W, Yang L, Wang Z, 2016. Curcumin rescues high fat diet-induced obesity and insulin sensitivity in mice through regulating SREBP pathway. *Toxicology and applied pharmacology*, 304, 99-109.
- Dinkova-Kostova AT, Talalay P, 2008. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Molecular nutrition & food research*, 52, S1, S128-S38.
- Dong L, Li H, Wang F, Li F, Zhou H, Yang H, 2007. Expression of liver-type fatty acid-binding protein and vascular endothelial growth factor and their correlation in human hepatocellular carcinoma. *Nan fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*, 27, 3, 318-21.
- Dulbecco P, Savarino V, 2013. Therapeutic potential of curcumin in digestive diseases. *World journal of gastroenterology: WJG*, 19, 48, 9256.

- Fang C, Dean J, Smith JW, 2007. A novel variant of ileal bile acid binding protein is up-regulated through nuclear factor- κ B activation in colorectal adenocarcinoma. *Cancer research*, 67, 19, 9039-46.
- Fang LY, Wong TY, Chiang WF, Chen YL, 2010. Fatty-acid-binding protein 5 promotes cell proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine*, 39, 4, 342-8.
- Forootan FS, Forootan SS, Malki MI, Chen D, Li G, Lin K, Rudland PS, Foster CS, Ke Y, 2014. The expression of C-FABP and PPAR γ and their prognostic significance in prostate cancer. *International journal of oncology*, 44, 1, 265-75.
- Forootan SS, Bao ZZ, Forootan FS, Kamalian L, Zhang Y, Bee A, Foster CS, Ke Y, 2010. Atelocollagen-delivered siRNA targeting the FABP5 gene as an experimental therapy for prostate cancer in mouse xenografts. *International journal of oncology*, 36, 1, 69-76.
- Fuchs JR, Pandit B, Bhasin D, Etter JP, Regan N, Abdelhamid D, Li C, Lin J, Li P-K, 2009. Structure–activity relationship studies of curcumin analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19, 7, 2065-9.
- Furuhashi M, Hotamisligil GS, 2008. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature reviews Drug discovery*, 7, 6, 489-503.
- Galloway D, Owen R, Jarrett F, Boyle P, Hill M, George W, 1986. Experimental colorectal cancer: the relationship of diet and faecal bile acid concentration to tumour induction. *British journal of surgery*, 73, 3, 233-7.
- Gest C, Joimel U, Huang L, Pritchard L-L, Petit A, Dulong C, Buquet C, Hu C-Q, Mirshahi P, Laurent M, 2013. Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC cancer*, 13, 1, 1-14.
- Gilbert FJ, Pinker-Domenig K, 2019. Diagnosis and Staging of Breast Cancer: When and How to Use Mammography, Tomosynthesis, Ultrasound, Contrast-Enhanced Mammography, and Magnetic Resonance Imaging. In: *Diseases of the Chest, Breast, Heart and Vessels 2019-2022*. Eds: Springer, Cham, p. 155-66.
- Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN, 2007. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. In: *Breast Cancer Chemosensitivity*. Eds: Springer, p. 1-22.
- Goto Y, Matsuzaki Y, Kurihara S, Shimizu A, Okada T, Yamamoto K, Murata H, Takata M, Aburatani H, Hoon DS, 2006. A new melanoma antigen fatty acid–binding protein 7, involved in proliferation and invasion, is a potential target for immunotherapy and molecular target therapy. *Cancer research*, 66, 8, 4443-9.
- Gray JM, Rasanayagam S, Engel C, Rizzo J, 2017. State of the evidence 2017: an update on the connection between breast cancer and the environment. *Environmental Health*, 16, 1, 94.

- Guaita-Esteruelas S, Guma J, Masana L, Borrás J, 2018. The peritumoural adipose tissue microenvironment and cancer. The roles of fatty acid binding protein 4 and fatty acid binding protein 5. *Molecular and cellular endocrinology*, 462, 107-18.
- Gupta S, Pramanik D, Mukherjee R, Campbell NR, Elumalai S, De Wilde RF, Hong S-M, Goggins MG, De Jesus-Acosta A, Laheru D, 2012. Molecular determinants of retinoic acid sensitivity in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 18, 1, 280-9.
- Gupta SC, Prasad S, Kim JH, Patchva S, Webb LJ, Priyadarsini IK, Aggarwal BB, 2011. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Natural product reports*, 28, 12, 1937-55.
- Halldén G, Aponte GW, 1997. Evidence for a role of the gut hormone PYY in the regulation of intestinal fatty acid-binding protein transcripts in differentiated subpopulations of intestinal epithelial cell hybrids. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 19, 12591-600.
- Hamamieh R, Chakraborty N, Barmada M, Das R, Jett M, 2005. Expression patterns of fatty acid binding proteins in breast cancer cells. *J Exp Ther Oncol*, 5, 2, 133-43.
- Han S-S, Keum Y-S, Seo H-J, Surh Y-J, 2002. Curcumin suppresses activation of NF-kappaB and AP-1 induced by phorbol ester in cultured human promyelocytic leukemia cells. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 35, 3, 337-42.
- Hancke K, Grubeck D, Hauser N, Kreienberg R, Weiss J, 2010. Adipocyte fatty acid-binding protein as a novel prognostic factor in obese breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment*, 119, 2, 367.
- Hashimoto T, Kusakabe T, Watanabe K, Sugino T, Fukuda T, Nashimoto A, Honma K-i, Sato Y, Kimura H, Fujii H, 2004. Liver-type fatty acid-binding protein is highly expressed in intestinal metaplasia and in a subset of carcinomas of the stomach without association with the fatty acid synthase status in the carcinoma. *Pathobiology*, 71, 3, 115-22.
- Haunerland NH, Spener F, 2004. Fatty acid-binding proteins—insights from genetic manipulations. *Progress in lipid research*, 43, 4, 328-49.
- Hayasaka K, Himoro M, Takada G, Takahashi E-i, Minoshima S, Shimizu N, 1993. Structure and localization of the gene encoding human peripheral myelin protein 2 (PMP2). *Genomics*, 18, 2, 244-8.
- Hayeshi R, Mutingwende I, Mavengere W, Masiyanise V, Mukanganyama S, 2007. The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin. *Food and chemical toxicology*, 45, 2, 286-95.
- Hendrick AG, Müller I, Willems Ht, Leonard PM, Irving S, Davenport R, Ito T, Reeves J, Wright S, Allen V, 2016. Identification and investigation of novel binding

- fragments in the fatty acid binding protein 6 (FABP6). *Journal of medicinal chemistry*, 59, 17, 8094-102.
- Henry NL, Shah PD, Haider I, Freer PE, Jagsi R, Sabel MS, 2020. Cancer of the breast. In: *Abeloff's Clinical Oncology*. Eds: Elsevier, p. 1560-603. e12.
- Horváth G, Egyed O, Toke O, 2014. Temperature dependence of backbone dynamics in human ileal bile acid-binding protein: implications for the mechanism of ligand binding. *Biochemistry*, 53, 31, 5186-98.
- Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM, 1996. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science*, 274, 5291, 1377-9.
- Howlader N, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary C, Yu M, (2017). Cronin KA (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014*, National Cancer Institute. Bethesda, MD.
- Hsu K-T, Storch J, 1996. Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 23, 13317-23.
- Hu C, Li M, Guo T, Wang S, Huang W, Yang K, Liao Z, Wang J, Zhang F, Wang H, 2019. Anti-metastasis activity of curcumin against breast cancer via the inhibition of stem cell-like properties and EMT. *Phytomedicine*, 58, 152740.
- Hu C, Niestroj M, Yuan D, Chang S, Chen J, 2015. Treating cancer stem cells and cancer metastasis using glucose-coated gold nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 10, 2065.
- Inoue M, Takahashi Y, Fujii T, Kitagawa M, Fukusato T, 2014. Significance of downregulation of liver fatty acid-binding protein in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20, 46, 17541.
- Jacob A, Wu R, Zhou M, Wang P, 2008. Mechanism of the anti-inflammatory effect of curcumin: PPAR- γ activation. *PPAR research*, 2007.
- Javeri I, Chand N, 2016. Curcumin. In: *Nutraceuticals*. Eds: Elsevier, p. 435-45.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D, 2011. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61, 2, 69-90.
- Jeong C-Y, Hah Y-S, Cho BI, Lee SM, Joo Y-T, Jung E-J, Jeong S-H, Lee Y-J, Choi S-K, Ha W-S, 2012. Fatty acid-binding protein 5 promotes cell proliferation and invasion in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncology reports*, 28, 4, 1283-92.
- Ji Y-B, Qu Z-Y, Zou X, 2011. Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells via the mitochondrial pathway. *Experimental and toxicologic pathology*, 63, 1-2, 69-78.

- Ji Y, Xin G, Qu Z, Zou X, Yu M, 2016. Mechanism of juglone-induced apoptosis of MCF-7 cells by the mitochondrial pathway. *Genet. Mol. Res.*, 15.
- Jing C, Beesley C, Foster CS, Chen H, Rudland PS, West DC, Fujii H, Smith PH, Ke Y, 2001. Human cutaneous fatty acid-binding protein induces metastasis by up-regulating the expression of vascular endothelial growth factor gene in rat Rama 37 model cells. *Cancer research*, 61, 11, 4357-64.
- Jochelson MS, Dershaw DD, Sung JS, Heerdt AS, Thornton C, Moskowitz CS, Ferrara J, Morris EA, 2013. Bilateral contrast-enhanced dual-energy digital mammography: feasibility and comparison with conventional digital mammography and MR imaging in women with known breast carcinoma. *Radiology*, 266, 3, 743-51.
- Jørgensen K, Skrede M, Cruciani V, Mikalsen S-O, Slipicevic A, Flørenes VA, 2005. Phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate promotes anchorage-independent growth and survival of melanomas through MEK-independent activation of ERK1/2. *Biochemical and biophysical research communications*, 329, 1, 266-74.
- Kaloshi G, Mokhtari K, Carpentier C, Taillibert S, Lejeune J, Marie Y, Delattre J-Y, Godbout R, Sanson M, 2007. FABP7 expression in glioblastomas: relation to prognosis, invasion and EGFR status. *Journal of neuro-oncology*, 84, 3, 245-8.
- Kamei H, Koide T, Kojima T, Hashimoto Y, Hasegawa M, 1998. Inhibition of cell growth in culture by quinones. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 13, 3, 185-8.
- Kanda T, Foucand L, Nakamura Y, Niot I, Besnard P, Fujita M, Sakai Y, Hatakeyama K, Ono T, Fujii H, 1998. Regulation of expression of human intestinal bile acid-binding protein in Caco-2 cells. *Biochemical Journal*, 330, 1, 261-5.
- Kawaguchi K, Kinameri A, Suzuki S, Senga S, Ke Y, Fujii H, 2016. The cancer-promoting gene fatty acid-binding protein 5 (FABP5) is epigenetically regulated during human prostate carcinogenesis. *Biochemical Journal*, 473, 4, 449-61.
- Kawaguchi K, Senga S, Kubota C, Kawamura Y, Ke Y, Fujii H, 2016. High expression of fatty acid-binding protein 5 promotes cell growth and metastatic potential of colorectal cancer cells. *FEBS open bio*, 6, 3, 190-9.
- Knoll W, Natali F, Peters J, Nanekar R, Wang C, Kursula P, 2010. Dynamic properties of a reconstituted myelin sheath. *Spectroscopy*, 24, 6, 585-92.
- Lass A, Zimmermann R, Oberer M, Zechner R, 2011. Lipolysis—a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Progress in lipid research*, 50, 1, 14-27.
- Levenson AS, Jordan VC, 1997. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer research*, 57, 15, 3071-8.
- Levi L, Lobo G, Doud MK, von Lintig J, Seachrist D, Tochtrop GP, Noy N, 2013. Genetic ablation of the fatty acid-binding protein FABP5 suppresses HER2-induced mammary tumorigenesis. *Cancer research*, 73, 15, 4770-80.

- Levi L, Wang Z, Doud MK, Hazen SL, Noy N, 2015. Saturated fatty acids regulate retinoic acid signalling and suppress tumorigenesis by targeting fatty acid-binding protein 5. *Nature communications*, 6, 1, 1-10.
- Li X, Yang J, Peng L, Sahin AA, Huo L, Ward KC, O'Regan R, Torres MA, Meisel JL, 2017. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 161, 2, 279-87.
- Liu R-Z, Graham K, Glubrecht DD, Germain DR, Mackey JR, Godbout R, 2011. Association of FABP5 expression with poor survival in triple-negative breast cancer: implication for retinoic acid therapy. *The American journal of pathology*, 178, 3, 997-1008.
- Liu R-Z, Li X, Godbout R, 2008. A novel fatty acid-binding protein (FABP) gene resulting from tandem gene duplication in mammals: transcription in rat retina and testis. *Genomics*, 92, 6, 436-45.
- López-Lázaro M, 2008. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Molecular nutrition & food research*, 52, S1, S103-S27.
- Majava V, Polverini E, Mazzini A, Nanekar R, Knoll W, Peters J, Natali F, Baumgärtel P, Kursula I, Kursula P, 2010. Structural and functional characterization of human peripheral nervous system myelin protein P2. *PLoS One*, 5, 4, e10300.
- Makowski L, Hotamisligil GS, 2005. The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*, 16, 5, 543.
- Mauro A, Ciccarelli C, De Cesaris P, Scoglio A, Bouché M, Molinaro M, Aquino A, Zani BM, 2002. PKC α -mediated ERK, JNK and p38 activation regulates the myogenic program in human rhabdomyosarcoma cells. *Journal of cell science*, 115, 18, 3587-99.
- Morgan EA, Forootan SS, Adamson J, Foster CS, Fujii H, Igarashi M, Beesley C, Smith PH, Ke Y, 2008. Expression of cutaneous fatty acid-binding protein (C-FABP) in prostate cancer: potential prognostic marker and target for tumourigenicity-suppression. *International journal of oncology*, 32, 4, 767-75.
- Morihiro Y, Yasumoto Y, Vaidyan LK, Sadahiro H, Uchida T, Inamura A, Sharifi K, Ideguchi M, Nomura S, Tokuda N, 2013. Fatty acid binding protein 7 as a marker of glioma stem cells. *Pathology international*, 63, 11, 546-53.
- Myers JS, von Lersner AK, Sang Q-XA, 2016. Proteomic upregulation of fatty acid synthase and fatty acid binding protein 5 and identification of cancer-and race-specific pathway associations in human prostate cancer tissues. *Journal of Cancer*, 7, 11, 1452.
- Ohmachi T, Inoue H, Mimori K, Tanaka F, Sasaki A, Kanda T, Fujii H, Yanaga K, Mori M, 2006. Fatty acid binding protein 6 is overexpressed in colorectal cancer. *Clinical cancer research*, 12, 17, 5090-5.

- Oliveira I, Sousa A, Ferreira IC, Bento A, Estevinho L, Pereira JA, 2008. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and chemical toxicology*, 46, 7, 2326-31.
- Oncology L, 2012. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol*, 13, 11, 1141-51.
- Parsamanesh N, Moossavi M, Bahrami A, Butler AE, Sahebkar A, 2018. Therapeutic potential of curcumin in diabetic complications. *Pharmacological Research*, 136, 181-93.
- Pegram MD, Pauletti G, Slamon DJ, 1998. HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast cancer research and treatment*, 52, 1-3, 65-77.
- Phuchareon J, Overdevest JB, McCormick F, Eisele DW, van Zante A, Tetsu O, 2014. Fatty Acid binding protein 7 is a molecular marker in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: implications for clinical significance. *Translational oncology*, 7, 6, 780-7.
- Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Ramirez-Tortosa M, 2016. Curcumin and health. *Molecules*, 21, 3, 264.
- Qian Q, Kuo L, Yu Y-T, Rottman JN, 1999. A concise promoter region of the heart fatty acid-binding protein gene dictates tissue-appropriate expression. *Circulation research*, 84, 3, 276-89.
- Ruby AJ, Kuttan G, Babu KD, Rajasekharan K, Kuttan R, 1995. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer letters*, 94, 1, 79-83.
- Ruskamo S, Yadav RP, Sharma S, Lehtimäki M, Laulumaa S, Aggarwal S, Simons M, Bürck J, Ulrich AS, Juffer AH, 2014. Atomic resolution view into the structure–function relationships of the human myelin peripheral membrane protein P2. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70, 1, 165-76.
- Sajadimajd S, Yazdanparast R, Roshanzamir F, 2016. Augmentation of oxidative stress-induced apoptosis in MCF7 cells by ascorbate–tamoxifen and/or ascorbate–juglone treatments. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 52, 2, 193-203.
- Santos CR, Schulze A, 2012. Lipid metabolism in cancer. *The FEBS journal*, 279, 15, 2610-23.
- Schug TT, Berry DC, Toshkov IA, Cheng L, Nikitin AY, Noy N, 2008. Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPAR β/δ to RAR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 21, 7546-51.

- Segura-Aguilar J, Jönsson K, Tidefelt U, Paul C, 1992. The cytotoxic effects of 5-OH-1, 4-naphthoquinone and 5, 8-diOH-1, 4-naphthoquinone on doxorubicin-resistant human leukemia cells (HL-60). *Leukemia research*, 16, 6-7, 631-7.
- Seo JH, Jeong KJ, Oh WJ, Sul HJ, Sohn JS, Kim YK, Kang JK, Park CG, Lee HY, 2010. Lysophosphatidic acid induces STAT3 phosphorylation and ovarian cancer cell motility: their inhibition by curcumin. *Cancer letters*, 288, 1, 50-6.
- Shanmugam MK, Rane G, Kanchi MM, Arfuso F, Chinnathambi A, Zayed M, Alharbi SA, Tan BK, Kumar AP, Sethi G, 2015. The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. *Molecules*, 20, 2, 2728-69.
- Shehzad A, Wahid F, Lee YS, 2010. Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials. *Archiv der Pharmazie*, 343, 9, 489-99.
- Shi YE, Ni J, Xiao G, Liu YE, Fuchs A, Yu G, Su J, Cosgrove JM, Xing L, Zhang M, 1997. Antitumor activity of the novel human breast cancer growth inhibitor, mammary-derived growth inhibitor-related gene, MRG. *Cancer research*, 57, 15, 3084-91.
- Shirazi FH, Zarghi A, Ashtarinezhad A, Kobarfard F, Nakhjavani M, Anjidani N, Zendehdel R, Arfaiee S, Shoeibi S, Mohebi S, 2011. Remarks in successful cellular investigations for fighting breast cancer using novel synthetic compounds, INTECH Open Access Publisher Croatia, p.
- Slipicevic A, Jørgensen K, Skrede M, Rosnes AKR, Trøen G, Davidson B, Flørenes VA, 2008. The fatty acid binding protein 7 (FABP7) is involved in proliferation and invasion of melanoma cells. *BMC cancer*, 8, 1, 276.
- Smathers RL, Petersen DR, 2011. The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. *Human genomics*, 5, 3, 1-22.
- Song GX, Shen YH, Liu YQ, Sun W, Miao LP, Zhou LJ, Liu HL, Yang R, Kong XQ, Cao KJ, 2012. Overexpression of FABP3 promotes apoptosis through inducing mitochondrial impairment in embryonic cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*, 113, 12, 3701-8.
- Soule H, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M, 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the national cancer institute*, 51, 5, 1409-16.
- Squires MS, Hudson EA, Howells L, Sale S, Houghton CE, Jones JL, Fox LH, Dickens M, Prigent SA, Manson MM, 2003. Relevance of mitogen activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/PKB) pathways to induction of apoptosis by curcumin in breast cells. *Biochemical pharmacology*, 65, 3, 361-76.
- Storch J, Herr FM, Hsu KT, Kim HK, Liou HL, Smith ER, 1996. The role of membranes and intracellular binding proteins in cytoplasmic transport of hydrophobic molecules: fatty acid-binding proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 115, 3, 333-9.

- Storch J, Thumser AE, 2000. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1486, 1, 28-44.
- Suresh S, Wang C, Nanekar R, Kursula P, Edwardson JM, 2010. Myelin basic protein and myelin protein 2 act synergistically to cause stacking of lipid bilayers. *Biochemistry*, 49, 16, 3456-63.
- Tabár L, Vitak B, Chen TH-H, Yen AM-F, Cohen A, Tot T, Chiu SY-H, Chen SL-S, Fann JC-Y, Rosell J, 2011. Swedish two-county trial: impact of mammographic screening on breast cancer mortality during 3 decades. *Radiology*, 260, 3, 658-63.
- Takaoka N, Takayama T, Ozono S, 2017. Functional analysis of fatty acid binding protein 7 and its effect on fatty acid of renal cell carcinoma cell lines. *BMC cancer*, 17, 1, 1-8.
- Tamama K, Kawasaki H, Kerpedjieva SS, Guan J, Ganju RK, Sen CK, 2011. Differential roles of hypoxia inducible factor subunits in multipotential stromal cells under hypoxic condition. *Journal of cellular biochemistry*, 112, 3, 804-17.
- Thakur A, 2011. Juglone: A therapeutic phytochemical from *Juglans regia* L. *Journal of medicinal plants research*, 5, 22, 5324-30.
- Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari RK, 2006. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *The AAPS journal*, 8, 3, E443.
- Thapliyal R, Maru G, 2001. Inhibition of cytochrome P450 isozymes by curcumins in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 6, 541-7.
- Thulasiraman P, McAndrews DJ, Mohiudddin IQ, 2014. Curcumin restores sensitivity to retinoic acid in triple negative breast cancer cells. *BMC cancer*, 14, 1, 1-14.
- Tölle A, Suhail S, Jung M, Jung K, Stephan C, 2011. Fatty acid binding proteins (FABPs) in prostate, bladder and kidney cancer cell lines and the use of IL-FABP as survival predictor in patients with renal cell carcinoma. *BMC cancer*, 11, 1, 302.
- Tsuruo T, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, Sakamoto H, Haga N, 2003. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer science*, 94, 1, 15-21.
- Uehara H, Takahashi T, Oha M, Ogawa H, Izumi K, 2014. Exogenous fatty acid binding protein 4 promotes human prostate cancer cell progression. *International journal of cancer*, 135, 11, 2558-68.
- Wang L, Zhang B, Huang F, Liu B, Xie Y, 2016. Curcumin inhibits lipolysis via suppression of ER stress in adipose tissue and prevents hepatic insulin resistance. *Journal of lipid research*, 57, 7, 1243-55.
- Wang M, Liu YE, Ni J, Aygun B, Goldberg ID, Shi YE, 2000. Induction of mammary differentiation by mammary-derived growth inhibitor-related gene that interacts

with an ω -3 fatty acid on growth inhibition of breast cancer cells. *Cancer Research*, 60, 22, 6482-7.

- Wang S, Zhou Y, Andreyev O, Hoyt Jr RF, Singh A, Hunt T, Horvath KA, 2014. Overexpression of FABP3 inhibits human bone marrow derived mesenchymal stem cell proliferation but enhances their survival in hypoxia. *Experimental cell research*, 323, 1, 56-65.
- YILDIZ V, KONUKLUGİL B, 2018. Zerdeçalın (*Curcuma Longa*) Pankreas Kanseri Üzerine Etkileri. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 7, 2, 89-96.
- Yu J, Peng Y, Wu L-C, Xie Z, Deng Y, Hughes T, He S, Mo X, Chiu M, Wang Q-E, 2013. Curcumin down-regulates DNA methyltransferase 1 and plays an anti-leukemic role in acute myeloid leukemia. *PloS one*, 8, 2, e55934.
- Zhang F, Du G, 2012. Dysregulated lipid metabolism in cancer. *World journal of biological chemistry*, 3, 8, 167.
- Zhao G, Wu M, Wang X, Du Z, Zhang G, 2017. Effect of FABP5 gene silencing on the proliferation, apoptosis and invasion of human gastric SGC-7901 cancer cells. *Oncology Letters*, 14, 4, 4772-8.
- Zhou X, Zhang J, Xu C, Wang W, 2014. Curcumin ameliorates renal fibrosis by inhibiting local fibroblast proliferation and extracellular matrix deposition. *Journal of Pharmacological Sciences*, 126, 4, 344-50.
- Zhu C, Hu D, Liu Y, Zhang Q, Chen F, Kong X, Cao K, Zhang J, Qian L, 2011. Fabp3 inhibits proliferation and promotes apoptosis of embryonic myocardial cells. *Cell biochemistry and biophysics*, 60, 3, 259-66.

EKLER

EK-1 Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Kararı

T.C. NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI	
Toplantı Sayısı:81	Toplantı Tarihi: 18 Ocak 2019

Karar Sayısı:2019/1668; N.E.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU' nun "MCF-7 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Juglon ve Kurkumin Uygulamasının FABP Proteinleri (Fatty Acid Binding Protein) Üzerine Etkilerinin Moleküler Yöntemler ile Belirlenmesi" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 14.01.2019 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Dilek SÖYLER' in yüksek lisans tez çalışmasının N.E.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU' nun sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU

Yardımcı Araştırmacılar: Doç. Dr. Esma MENEVŞE, Dr. Öğr. Üyesi Dudu ERKOÇ KAYA, Dilek SÖYLER

ASLI GİBİDİR,
18.01.2019
Prof. Dr. Saim AÇIKGÖZOĞLU
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Dilek SÖYLER
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Selçuklu - 1995
Telefon : 057625167830
Faks :
e-mail : dileksylr95@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	T.T. Anadolu Öğretmen Lisesi, Sandıklı, Afyonkarahisar	2013
Üniversite	Necmettin Erbakan Üniversitesi	2017
Yüksek Lisans	Necmettin Erbakan Üniversitesi	2020
Doktora	:	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2016	Konya Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü	Stajer