



KAHRAMAN S. N.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ

2024

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Kıymet TABAKÇIOĞLU

MEME KANSERİ MODELİ OLARAK MCF-7 HÜCRE
HATTINDA İYOT UYGULAMASININ HÜCRE
ÇOĞALMASI ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Seda Nur KAHRAMAN

EDİRNE-2024

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Kıymet TABAKÇIOĞLU

MEME KANSERİ MODELİ OLARAK MCF-7 HÜCRE
HATTINDA İYOT UYGULAMASININ HÜCRE
ÇOĞALMASI ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Seda Nur KAHRAMAN

Destekleyen Kurum: TÜBAP

EDİRNE-2024

İÇİNDEKİLER

ONAY	i
ETİK BEYAN	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGE VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Sağlıklı Meme Dokusu	2
2.2. Meme Kanseri.....	3
2.3. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	4
2.4. Meme Kanseri Etiyolojisi	5
2.4.1. Cinsiyet:.....	5
2.4.2. Yaş:	6
2.4.3. Pozitif Aile Öyküsü:	6
2.4.4. Genetik Yatkınlık:	6
2.4.5. Hormonal Değişimler, Üreme ve Emzirme Dönemleri:	7
2.4.6. İyonizan Radyasyon Tedavisi:.....	8
2.4.7. Obezite:.....	8
2.4.8. Beslenme:.....	9
2.4.9. Alkol Tüketimi:.....	10
2.4.10. Sigara Kullanımı:	10
2.4.11. Çevresel Etmenler:	10
2.5. Meme Kanseri Gelişimi	12
2.6. Meme Kanseri Sınıflaması	13
2.6.1. TNM Sınıflaması:	13
2.6.2. Histolojik Sınıflama:	15
2.6.3. Moleküler Sınıflama:.....	19
2.7. MCF-7 Hücre Hattı.....	23
2.8. İyot.....	23
2.9. İyot Metabolizması.....	24

2.10.	Meme Dokusu ve İyot İlişkisi	29
2.11.	İyot ve Meme Hastalıklarının İlişkisi	30
2.12.	Ki-67 ve Meme Kanseri İlişkisi	31
2.13.	Ki-67'nin Meme Kanseri Kliniğindeki Önemi	34
3.	GEREÇ VE YÖNTEMLER	36
4.	BULGULAR	44
5.	TARTIŞMA	70
	KAYNAKLAR	76
	ÖZGEÇMİŞ	89
	BENZERLİK RAPORU	90





T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ



ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji** Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve **Dr. Öğretim Üyesi Kıymet TABAKÇIOĞLU** danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi **Seda Nur KAHRAMAN** tarafından tez başlığı “**Meme Kanseri Modeli Olarak MCF-7 Hücre Hattında İyot Uygulamasının Hücre Çoğalması Üzerine Etkisi**” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı **29.02.2024** tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Zeynep Sami Dönmez
(Jüri Başkanı)



Dr. Öğr. Üyesi Kıymet Tabakcıoğlu
(Üye)



Dr. Öğr. Üyesi Zeynal Metin KARACA
(Üye)

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr.
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

“Meme Kanseri Modeli Olarak MCF-7 Hücre Hattında İyot Uygulamasının Hücre Çoğalması Üzerine Etkisi” adlı bana ait olan tez çalışmamın bütün aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, bütün verileri ve bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, verilerde ve sonuçlarda herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezimin yazımında yapay zeka yazılımları kullanmadığımı, diğer kaynaklardan elde ettiğim bilgi ve yorumları tezimde uygun şekilde kaynak gösterdiğimi ve kaynaklar bölümünde yer verdiğimi, patent ve telif haklarını ihlal edici herhangi bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

SEDA NUR KAHRAMAN

İmza

İTHAF

Tezimi, hayallerimi gerçekleştirmek için cesaretli ve sabırlı olmamı öğütleyen,
her daim desteğini üzerimden esirgemeyen canım aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bana rehberlik eden ve bilimsel gelişimime katkıda bulunan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Kıymet TABAKÇIOĞLU hocama, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sn. Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR' a, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında görevli değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Suat ERDOĞAN ve Sn. Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR' a ve Sn. Arş. Gör. Rıza SERTTAŞ' a, bu çalışmaya 2022/153 numaralı proje ile maddi anlamda destek sağlayan TÜBAP Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkür ederim.

SEDA NUR KAHRAMAN

SİMGE VE KISALTMALAR

AJCC	: American Joint Committee on Cancer (Amerikan Birleşik Kanser Komitesi)
BRCA1	: Meme Kanseri 1
BRCA 2	: Meme Kanseri 2
CK	: Sitokeratin
CO₂	: Karbondioksit
DCIS	: Ductal Carcinoma In Situ
DIT	: Diiodotirozin
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ER	: Estrogen Receptor (Östrojen Reseptörü)
EGF	: Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)
Her-2 (CERBB2)	: Human Epidermal Growth Factor 2 (İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2)
HRT	: Hormon replasman tedavisi
ICCIDD	: Uluslararası İyot Eksikliği Bozukluklarının Kontrolü Konseyi (International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders)
IDC	: Invaziv Ductal Carcinoma
ILC	: Invaziv Lobular Carcinoma
LCIS	: Lobular Carcinoma In Situ
MCF-7	: Michigan Cancer Foundation-7
MIT	: Monoiodotirozin
NIS	: Sodyum-iyodür simportör taşıyıcı proteinini
PBS	: Phosphate buffered saline
PR	: Progesteron reseptörü
TG	: Triglobulin
T3	: Triiodotironin
T4	: Tiroksin

TNM : Tümör, Nod, Metastaz
TSH : Tiroid Stimüle Edici Hormon

µl : Mikrolitre
µg : Mikrogram
µM : Mikromolar
mM : Milimolar



ÖZET

“Meme Kanseri Modeli Olarak MCF-7 Hücre Hattında İyot Uygulamasının Hücre Çoğalması Üzerine Etkisi”, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Edirne, 2024.

Giriş ve Amaç: Meme kanseri, günümüzde kadınlarda sıklığı ve ölüm oranlarıyla ilk sıradaki kanser türüdür. Cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve akıllı ilaç tedavileri uygulansa da halen alternatif tedavilere ihtiyaç vardır. Artan vakalar, koruyucu olduğu düşünülen takviye besinlerin, vitaminlerin, eser elementlerin ve birtakım bitkisel ürünlerin kullanımını arttırmıştır. İyotlu ürünler de bunlardan bazılarıdır. İyot kullanımı ve meme kanseri insidansındaki arasındaki bağlantı ilk olarak epidemiyolojik çalışmalarda fark edilmiş, ardından hayvan ve hücre çalışmaları ile desteklenmiştir. Çalışmamızda da, MCF-7 meme kanseri hücre hattında, iyot uygulamalarının çoğalma davranışına etkisini belirlemeyi, homeopatik amaçla alınan iyotlu ürünlerin, farkında olunmayan bir tümöre etkisini in vitroda simüle etmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntemler: MCF-7 hücrelerinde değişen dozlarda (1, 2 ve 3 mM) iyot (I_2) ve I_2+KI uygulamalarıyla, çoğalma davranışı MTT, koloni formasyon, 3D sferoid kültür ve migrasyon deneyleri ile kalitatif olarak incelendi. Hücre çoğalma belirteci olan Ki-67 molekülünün immün floresan boyama ile pozitiflik oranları değerlendirildi.

Bulgular: MTT deney sonuçlarına göre, en düşük dozda her iki iyot grubunda canlı hücre sayısında anlamlı bir azalma olmadığı, 2 mM dozda I_2 'nin, hücre canlılığında 48 saatte %20'lik bir düşüş sağladığı, I_2+KI 'nin canlı hücre sayısını 24 saatte %85'e, 48 saatte %74'e düşürdüğü belirlendi. En yüksek dozda 24 saatte I_2 , %61'e, I_2+KI , %45'e, 48 saatte I_2 %31'e, I_2+KI %21'e düşürdü. Migrasyon deneyi ile, yüksek doz iyot gruplarında çizim kenarlarındaki yoğun düzensizleşmeler ölçümlerin sağlıklı yapılmasını engelledi. Analizler değerlendirme dışı bırakıldı. Koloni formasyon deneyi ile 3 mM I_2 'de canlı kalan hücreler gözlenirse de koloni oluşumu saptanmadı. Diğer gruplarda koloni formasyon belirlendi. I_2+KI 'da hücrelerin her üç dozda da kontrol grubuna oranla daha çok koloni oluşturduğu gözlemlendi. 3D kültürlerde I_2 'nin 2 mM ve 3 mM dozlarında, I_2+KI 'nin sadece 3 mM dozunda kontrole kıyasla sferoid alanında anlamlı bir artış görüldü. I_2 'nin 2 mM ve 3 mM dozlarında ve I_2+KI 'nin sadece 1 mM dozunda sferoid yoğunluğunda anlamlı değişiklik gözlemlendi. Ki-67 skorlaması, Ki-67 pozitif boyanan hücrelerin 3 mM I_2+KI dışındaki gruplarda aritmetik olarak birbirine yakın olduğu, 3 mM I_2+KI 'de ise diğer gruplardan %28,5-%8,3 oranında daha düşük pozitiflik gözlenmiştir.

Sonuç: I₂ ve I₂+KI uygulamasının MCF-7 hücrelerinde doza ve süreye bağlı olarak canlılığı azalttığı gösterilmiştir. Migrasyon deneyleri değerlendirme dışı bırakılmıştır. Farklı formlarda uygulanan iyot, koloni oluşturma kabiliyeti üzerine farklı etkiler göstermiştir. Etki, iyot formlarının farklı tutulumunun olabilmesine bağlanmıştır. 3D kültürlerde iyodun hücrelerarası bağlantıları zayıflattığı, bu durumun hücreyi apoptoza sürükleyebileceği ya da hücrenin epitelyal mezenkimal dönüşüm geçirebileceği şeklinde yorumlanmıştır. Ki-67 sağ kalan hücrelerde değerlendirildiğinden, iyot da ileri seviyede hücre kaybına yol atığından, MCF-7 hücrelerinde, in vitroda Ki-67'nin verimli bir belirteç olmadığını dşnlmştir.

Anahtar kelimeler: MCF-7, Meme Kanseri, İyot, Ki-67, Proliferasyon

Destekleyen Kurum: Bu alışma, TÜBAP Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2022/153

ABSTRACT

“The Effect of Iodine on Cell Proliferation in the MCF-7 Cell Line as a Breast Cancer Model”, Trakya University Institute of Health Sciences, Department of Medical Biology, Master's Thesis, Edirne, 2024.

Introduction and Purpose: Breast cancer is the first cancer type in women today in terms of frequency and mortality rates. Although surgery, radiotherapy, chemotherapy and smart drug treatments are used, alternative treatments are still needed. Increasing cases have increased the use of nutritional supplements, vitamins, trace elements and some herbal products thought to be protective. Iodine products are some of them. The link between iodine use and breast cancer incidence was first recognized in epidemiological studies and subsequently supported by animal and cell studies. In our study, we aimed to determine the effect of iodine treatments on the proliferation behaviour of the MCF-7 breast cancer cell line and to simulate the effect of iodine products taken for homoeopathic purposes on an unknown tumour in vitro.

Materials and Methods: Proliferation behavior was qualitatively examined by MTT, colony formation, 3D spheroid culture and migration experiments in MCF-7 cells with varying doses (1, 2 and 3 mM) of molecular iodine (I_2) and I_2+KI . Positivity rates of Ki-67 molecule, a cell proliferation marker, were evaluated with immunofluorescent staining.

Results: According to the MTT experiment results, there was no significant decrease in the number of viable cells in both iodine groups at the lowest dose, I_2 at a dose of 2 mM caused a 20% decrease in cell viability in 48 hours, and I_2+KI increased the number of viable cells by 24 hours. It was determined that it decreased to 85% in an hour and to 74% in 48 hours. At the highest dose, I_2 decreased to 61%, I_2+KI to 45% in 24 hours, I_2 to 31% and I_2+KI to 21% in 48 hours. With the migration experiment, intense irregularities at the edges of the drawings in the high-dose iodine groups prevented accurate measurements. Analyzes were excluded from the evaluation. Although cells surviving in 3 mM I_2 were observed with the colony formation assay, no colony formation was detected. Colony formation was determined in other groups. It was observed that the cells formed more colonies in I_2+KI than in the control group at all three doses. In 3D cultures, a significant increase in spheroid area was observed at 2 mM and 3 mM doses of I_2 and only at 3 mM dose of I_2+KI compared to the control. A significant change in spheroid density was observed at 2 mM and 3 mM doses of I_2 and only at 1 mM dose of I_2+KI . Ki-67 scoring showed that Ki-67 positive stained cells were arithmetically close to each other

in groups other than 3 mM I₂+KI, while 28.5%-8.3% lower positivity was observed in 3 mM I₂+KI than other groups.

Conclusion: It has been shown that I₂ and I₂+KI treatments reduce the viability of MCF-7 cells depending on dose and time. Migration experiments were excluded from the evaluation. Iodine applied in different forms showed different effects on colony formation ability. The effect is attributed to the different retention of iodine forms. It has been interpreted that iodine weakens intercellular connections in 3D cultures, and this may lead the cell to apoptosis or undergo epithelial-mesenchymal transformation. Since Ki-67 was evaluated in surviving cells and iodine causes advanced cell loss, it was thought that Ki-67 was not a productive marker in vitro in MCF-7 cells.

Key words: MCF-7, breast cancer, iodine, Ki-67, proliferation

Supporting Institution: This study was supported by TÜBAP Scientific Research Projects Commission. Project Number: 2022/153

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde sanayileşmenin artışıyla beraber pek çok kanser türünün gözlenme sıklığı da artış göstermektedir. Meme kanseri de gözlenme sıklığı artan kanser türlerinden birisidir. Bu kanser, dünya genelinde kadınlarda en yaygın görülen kanser türüdür.

Kanser sıklıklarında gözlenen artışlar, kanserden koruyucu olduğu düşünülen alternatif takviye besinlerin, vitaminlerin, eser elementlerin ve birtakım bitkisel kaynaklı ürünlerin kullanımını arttırmıştır. Bunlardan bazıları da homeopatik tedavide kullanılan iyotlu ürünlerdir.

İyot ve meme kanseri arasında ilişki olabileceği fikri ilk olarak, Asya kökenli kadınların diğer toplumlara nazaran daha az meme kanserine yakalandığının fark edilmesiyle öne sürülmüş, diyetlerinin yüksek miktarda deniz ürünü içermesinin buna etken olabileceği düşünceleri yoğunlaşmıştır.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda iyotça zengin beslenen toplumlarda görece düşük meme kanseri insidansı saptanmıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak; projemizde iyot uygulamalarının meme kanseri hücrelerinde çoğalma davranışını nasıl etkilediğini, hücre proliferasyon deneyleri ile kalitatif olarak ve meme kanserinde bir hücre çoğalması belirteci olarak kabul edilen Ki-67 molekülünün protein seviyelerine bakarak moleküler düzeyde incelemeyi amaçladık.

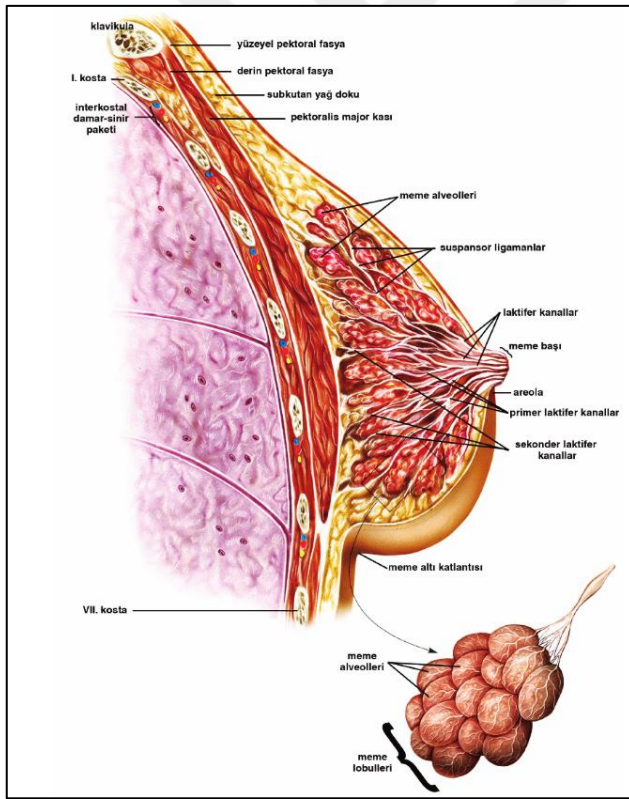
Projemizin hedefleri de iyot uygulamasının bir hücre proliferasyon belirteci olan Ki-67 seviyeleri üzerine etkisini immün floresan boyama ile kalitatif olarak belirlemek ve MTT deneyi, koloni formasyon deneyi, 3D kültür ve migrasyon deneyi ile hücrelerin çoğalma davranışını çeşitli açılardan analiz etmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sağlıklı Meme Dokusu

Anatomik olarak memeler göğüs kafesinin ön yüzünde ve sternumun her iki yanında ana göğüs kası olan pektoralis majör kasına dayalı bulunan, erişkin kadınlarda doğumdan sonra süt üretiminde görevli ekzokrin bezlerdir. Meme dokusu başlıca cilt, destek elemanları (Yağ dokusu ve fibröz bağ dokusu) duktuslar, lobüller ve meme başı (Areola) kompleksinden oluşur.

Normal erişkin kadın meme dokusunda epitelyal ve stromal bileşenler bulunur. Epitelyal bileşenler, dallanan duktus yapıları ile birleşen lobların yapısında bulunurken, değişik oranlardaki adipoz ve fibröz bağ doku (Kan damarları, lenf damarları ve sinirler) stromal bileşenleri oluşturur (1). Memede kas dokusu bulunmaz, ancak bir yağ tabakası bezleri çevreler (2). Yağ dokusu miktarı memenin asıl büyüklüğünü belirleyen temel faktördür (1).



Şekil 2.1. Meme anatomisi (1)

Meme yerleşim olarak yüzeysel fasya içerisinde yer alır. Memenin parankimal dokuları hem ön hem de arka fasyal tabaka ile sarılmış durumdadır. Yüzeysel fasyanın subkutan tabakası hemen dermisin altında bulunur. Bu tabakadan başlayan fibröz lifler deriye ve meme başına kadar uzanır ve memenin üst kısmında daha fazla gelişmiş olup fibröz yapıdaki Cooper ligamentlerini oluşturur. Bu yapılar memenin süt üreten birimlerini birbirine bağlar. Cooper

ligamentleri malign tümörlerle infiltre olduğunda veya herhangi bir sebeple fibrozis gelişimi durumlarında kısalarak meme başı derisinde karakteristik olarak içeri çekilmeye (Portakal kabuğu görünümü) sebebiyet verir (3).

Meme başı laktiferöz kanalların açıldığı meme ucundaki çıkıntıdır. Meme ucunu çevreleyen pigmentli alana areola denir. Ergenlikte meme ucu ve areolanın pigmentasyonu artar, gebelik döneminde ise areola büyür ve ikinci ayından itibaren pigmentasyonu daha da artar. Areolada ter bezleri ve yağ bezleri bulunur. Memenin uç kısmı çok sayıda duyu sinirleri ve dokunma duyusunu alan Meissner cisimciklerini içerir (4).

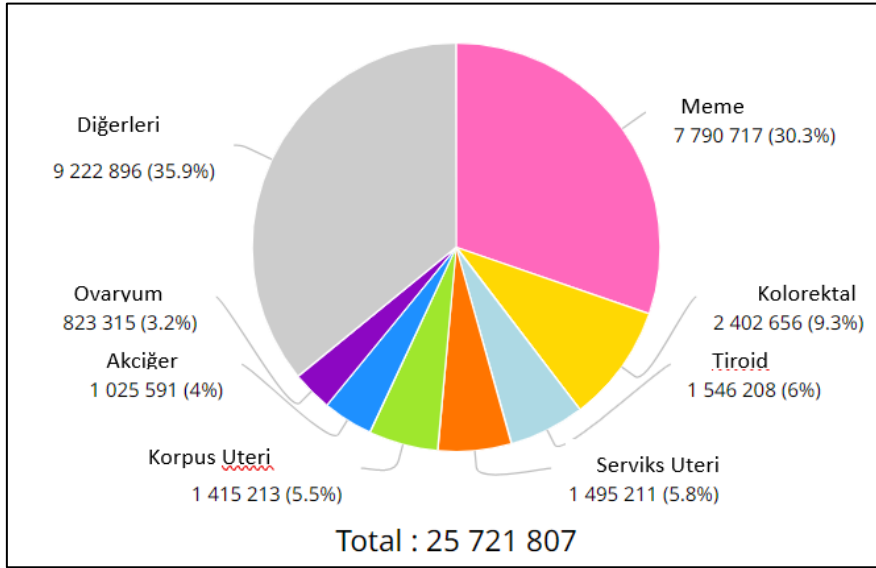
Memenin şekil, büyüklük ve durumu hayat boyunca sürekli değişim gösterir. Irk ve yaş faktörleri, doğum, menstruasyon, gebelik, emzirme ve menopoza gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Doğumda ve çocukluk döneminde memede sadece rudimenter duktuslar bulunurken, puberte döneminde laktojenik hormonlar (Foliküler Stimülant Hormon (FSH) Lüteinizan Hormon (LH)) ve östrojen ve progesteron gibi steroid hormonlara yanıt olarak bağ dokusu kitlesi içerisinde terminal duktuslarda artma, lobül sistemlerinin gelişmesi, meme bezlerinin büyümesi ve yağ dokusu birikimi gerçekleşir (5).

2.2. Meme Kanseri

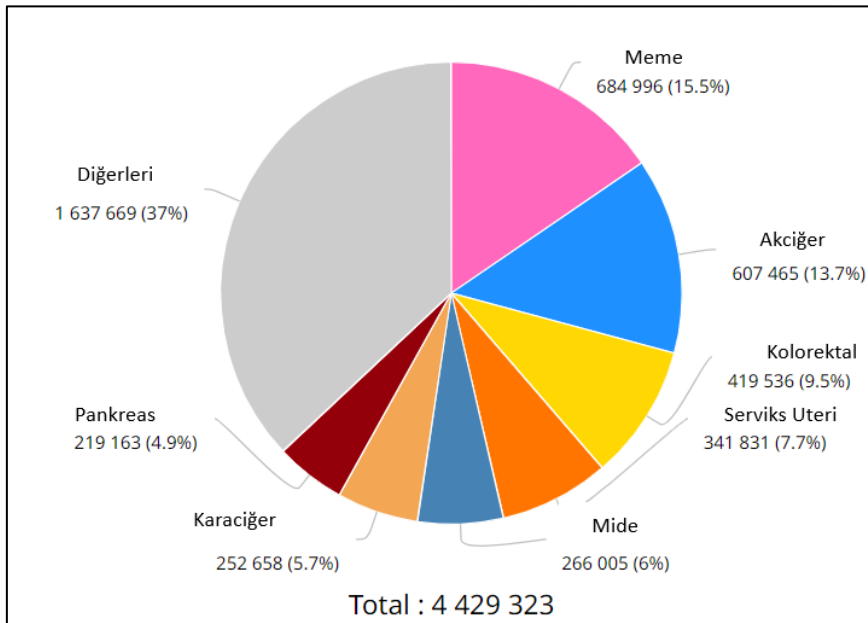
Meme kanseri, meme dokusunu meydana getiren hücrelerden köken alan malignansilerin ortak adıdır. M.Ö. 3000 yılında Edwin Smith papirüsünde meme kanseri ile ilgili ilk kayıtlara rastlanmıştır. Bu tıbbi papirüste meme tümörü olan 8 vaka tanımlanmaktadır (6). Sıklıkla meme kanallarını döşeyen epitel dokudan ya da meme parankiminden köken alan meme kanseri çoğunlukla meme dokusunda bir kitle meydana gelmesiyle fark edilir. Tedavi edilmezse hızla çoğalmaya devam eden kanser hücreleri genellikle kendi çevrelerinde yer alan dokulara ve belli uzak dokulara yayılma eğilimi gösterirler (7).

2.3. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda en yaygın görülen kanser türüdür. DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) verilerine göre, 2020 yılı meme kanseri görülme sıklığı 7.790.717 (Şekil 2.2) vaka iken, meme kanserine bağlı 684.996 ölüm bildirilmiştir (Şekil 2.3) ve kadınlar arasında kanserden ölümlerin ilk nedenidir(8).



Şekil 2.2. Dünya genelinde her yaştan kadınlar için, 2020 yılı kanser görülme sıklığı (8)

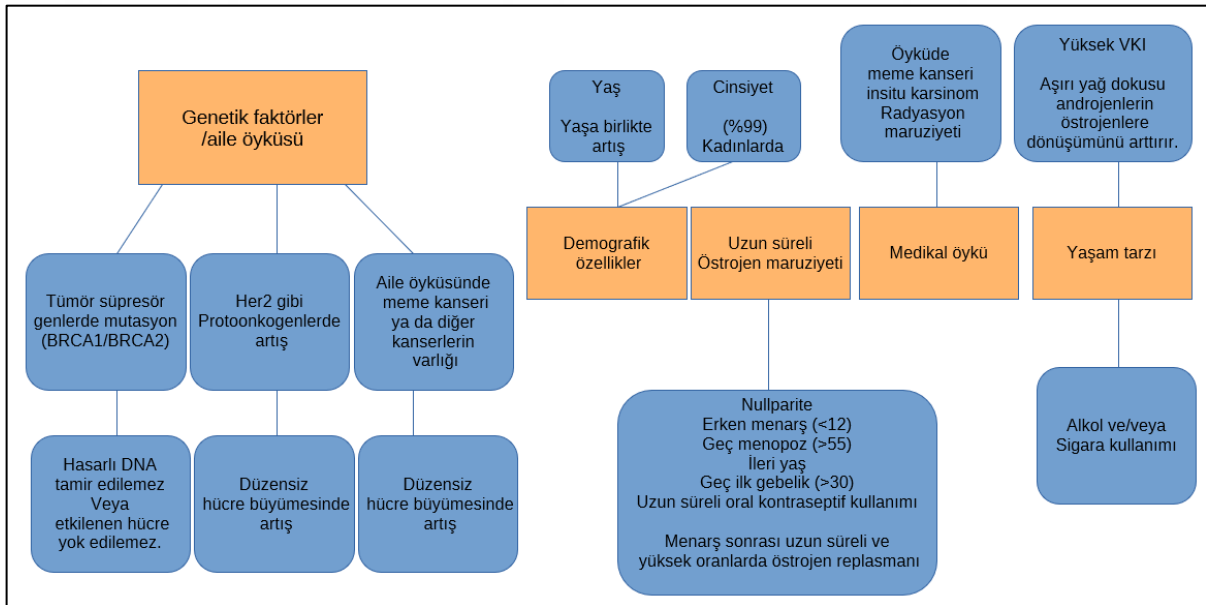


Şekil 2.3. Dünya genelinde her yaştan kadınlar için, 2020 yılı kanserden ölüm sayıları (8)

2.4. Meme Kanseri Etiyolojisi

Meme kanseri etiyojisi multifaktöriyeldir. Etiyolojik faktörler arasında hormonal risk faktörleri başı çekmektedir. Erken menarş, geç menopo, doğum yapmama, geç ilk doğum yaşı ve hormon replasman tedavisi meme kanseri riskini arttıran başlıca faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Emzirme, en az 3 doğum yapmak (Belli kanser türlerine karşı) ise meme kanseri riskini düşüren durumlar olarak belirtilmektedir. Obezite, alkol ve sigara kullanımı ve radyasyon da hormonal olmayan etiyojistik faktörlerdir (9).

Meme kanserlerinin sadece %10' undan azı kalıtsal bir genetik mutasyona bağlanmaktadır. Potansiyel olarak değıştirilebilen çevresel, üreme ve yaşam tarzı faktörleri ile daha sık ilişkilidir (10).



Şekil 2.4. Meme kanseri risk faktörleri (11)

2.4.1. Cinsiyet:

Kadın olmak meme kanseri için en güçlü risk faktörüdür (12). Tüm meme kanserlerinin %1'inden azı erkeklerde gözlenmektedir. Kadınlarda yüksek prevalansın esas nedeni yüksek östrojen ve progesteron stimülasyonu olarak gösterilmektedir. Ayrıca hem menopo öncesi hem de menopo sonrası kadınlar, erkeklere kıyasla yaşamları boyunca daha fazla seks hormonu seviyesi değışikliği yaşarlar ve bu meme kanseri riskini arttırmaktadır (13). Meme kanseri kadınlarda en sık erken premenapozal dönemde görölmesine karşı erkeklerde yaş ile sıklığı artmaktadır. Erkek meme kanserinin etiyojisi belirsizdir ancak hormon düzeylerinin hastalığın gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir. Risk faktörleri; ileri yaş, artan östrojen etkisi veya androjen/östrojen ilişkisindeki dengesizlikler, göğüs duvarı ışıın tedavisi, aile

öyküsü, BRCA1/2 gen mutasyonu, eksojen östrojen maruziyeti, karaciğer sirozu, hiperprolaktinemi ve Klinefelter sendromu olarak bildirilmiştir (14).

2.4.2. Yaş:

Yaş, meme kanseri için önemli risk faktörlerinden bir diğeridir. Meme kanseri erken yaşlarda ortaya çıkabilse de genel olarak bir yaşlanma hastalığıdır (15). İlerleyen yaşla birlikte artan meme kanseri insidansı, yaşa bağlı artan karsinogen maruziyetine ve zaman içinde biriken DNA hasarına bağlanmaktadır (16). Otuz yaşında bir kadının gelecek 10 yıl içinde meme kanserine yakalanma olasılığı 1/250 iken, bu oran 70 yaşındaki bir kadın için 10 kat artmakta ve 1/27'e yükselmektedir (17) Amerika kaynaklı daha yakın tarihli bir başka yayında da meme kanserinden ölüm sıklığının yaşa bağlı olarak arttığı bildirilmektedir (18).

2.4.3. Pozitif Aile Öyküsü:

Birinci derece aile yakınlarında meme kanseri öyküsü, meme kanseri riskini önemli ölçüde arttırmaktadır. Araştırma verileri birinci derece akrabasında meme kanseri öyküsü olan kadınlarda, meme kanseri riskinin iki kat arttığını göstermektedir (19). Etkilenen birinci derece akraba sayısı arttıkça risk artmaktadır (11).

Bireyin meme kanserine yakalanma riski ile aile öyküsü arasında ilişkiyi inceleyen bir meta analiz çalışmasında, bireyin herhangi bir akrabasında meme kanseri öyküsü bulunması riskin 1.9, birinci derece akrabasında 2.1, annesinde 2, kız kardeşinde 2.3, anne ve kız kardeşinde birlikte olma durumunda 3.6 kat arttığı gösterilmiştir (20).

2.4.4. Genetik Yatkınlık:

Pozitif aile öyküsü, meme kanseri riskini arttıran bir faktördür ve bu hasta kuşakların yeni gen anomalilerine sahip olması ve bunu bir sonraki nesle aktarması ile bağlantılıdır. DNA tamir yollarında görevli (BRCA1 (Meme kanseri 1), BRCA2 (Meme kanseri 2), p53 (Tümör protein 53), PTEN (Protein tirozin fosfotaz ve tensin homoloğu), APEX1 (APE1 endonükleaz), CDH1 (E-kaderin), ATM (Ataxia-telangiectasia mutated), PALB2 (Partner and Localizer of BRCA2), CHEK2 (Checkpoint kinaz 2), STK11 (Serin-treonin kinaz 11), XPD (Kseroderma pigmentosum grup D) genlerdeki bazı mutasyonlar çeşitli meme kanseri vakalarında rol oynamaktadır (21).

Kalıtsal meme kanseri ile ilişkili en iyi bilinen mutasyonlar, DNA tamir mekanizmasında görevli BRCA1 ve BRCA2 genlerinde bulunur (22). BRCA1 veya BRCA2

mutasyonu taşıyan kadınların yaşam boyu meme kanserine yakalanma riski %50-%85 arasında değişmektedir (23). Bu sebeple anne tarafından akrabalarında meme kanseri öyküsü olan kadınlarda gen taraması yapılması önerilmektedir (24).

2.4.5. Hormonal Değişimler, Üreme ve Emzirme Dönemleri:

Meme kanseri gelişiminde östrojen hormonu önemli bir rol oynar. Meme kanseri, yüksek endojen ve eksojen östrojen seviyeleri ile ilişkili hormona bağımlı bir malignensi olarak kabul edilir (25). Riski, endojen östrojene maruz kalma süresi, ilk âdet kanamasının yaşı, doğum yapıp yapmama, ilk gebeliğin yaşı, gebeliğin ve emzirmenin etkisi, menopoza başlangıç ve sonlanma yaşı gibi parametreler belirlemektedir (26).

Menstrüasyonun erken başlaması (12 yaş) ve geç menopoza (50 yaş), geç adet görmeye başlama (15 yaş) ve erken menopoza girme (40 yaş) durumlarına göre meme kanseri riski artmaktadır (27). Bir grup araştırmacı geç başlangıçlı menopoza meme kanseri riskinin, menopoza başlangıcına eklenen her yıl için 1,029 kat arttığını bildirmişlerdir (28).

Doğum yapmamış kadınlar ve 30 yaşından sonra ilk kez hamile kalanlarda meme kanseri riski 2-5 kat daha fazladır (29).

Birden fazla çalışmada hem doğum sayısının fazlalığının hem de emzirmenin meme kanserine karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir. ABD 'deki Black 22 S. S. Coughlin ve Y. Cypel Kadın Sağlığı Çalışmasında, daha yüksek parite (doğum sayısı), östrojen reseptörü (ER)/ progesteron reseptörü (PR) (+/+) meme kanseri riskinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (30). 30 ülkede 47 epidemiyolojik çalışmadan elde edilen verilere göre, meme kanserine yakalanan kadınların ortak özelliğinin görece az doğum sayısı ve kısa süreli emzirme öyküsü olduğu belirtilmiştir (31). Bu bulgular birbirini destekler niteliktedir.

Hamilelik sürecinin ve emzirmenin tam açıklanamayan bir sebeple meme dokusunda DNA tamirini daha aktif hale getirdiğini ve farklılaşma ile ilgili genlerin ekspresyon paternlerinde meydana gelen değişiklikler sayesinde meme kanseri riskinde azalma olduğu bildirilmiştir (32). Bu da bize tamamlanmış bir hamileliğin ve yeteri uzunlukta bir emzirme süresinin meme kanserinden korumadaki etkinliğini daha net göstermektedir.

Ekzojen östrojenin en önemli kaynağı oral kontraseptifler ve hormon replasman tedavisidir. Ekzojen östrojenin meme kanseri üzerindeki etkisi tartışmalı bir konudur ve çok sayıda çalışmaya konu olmaya devam etmektedir. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar, menopoza sonra hormon replasman tedavisinin (HRT) meme kanseri riskini artırdığını göstermektedir (33).

Ban ve Godellas çalışmalarında, HRT'nin meme kanseri riski üzerine etkisinin tedavinin süresi ile de ilişkili olduğunu belirtmiş ve 5 yıllık tedavide %15, 10 yıllık tedavide ise %34 oranında meme kanseri riskini artırdığını vurgulamışlardır. Riskin temel nedeni steroid reseptörlerinin ifadesi ile de ilişkilendirilmektedir (34). ABD, Kanada ve Avrupa ülkelerinde meme kanseri insidansı çalışmaları, 2002'den sonra hormon tedavisi kullanımındaki azalmanın ardından insidanda %5-10'luk bir düşüş olduğunu göstermiştir (35).

Oral kontraseptif kullanımı ile meme kanseri riski ilişkisini inceleyen Mørch ve ark.'nın prospektif bir kohort çalışmada oral kontraseptif kullanım süresi uzadıkça riskin arttığı ve ek olarak uzun süre (≥ 5 yıl) oral kontraseptif alan kadınlarda meme kanseri gelişme riskinin kullanımın bırakılmasından sonra hala yüksek olduğunu göstermiştir (36).

Epidemiyolojik çalışmaların sonuçları, kadınlarda yaşam boyu östrojen maruziyetinin özellikle ER+ meme kanserleri için önemli bir risk faktörü olduğuna işaret etmektedir (37).

2.4.6. İyonizan Radyasyon Tedavisi:

Meme kanseri gelişiminde bir diğer faktör, iyonizan radyasyona (IR), maruz kalmaktır. Genellikle doz artışıyla artan DNA hasarı, epigenetik değişikliklere ve meme kanserine yol açan mutasyonlara neden olur (38). 2007'de John ve ark. tarafından yapılan çalışmada kanser tedavisinin bir parçası olarak IR tedavisi görmüş kadınlarda meme kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir (39). Radyasyon tedavisinin neden olduğu kanser bireyin yaşıyla ve aldığı dozla ilişkilidir. Otuz yaşından önce radyasyon tedavisi alan hastalarda meme kanseri riski daha fazladır (40). İyonizan radyasyona maruziyet sayısı fazla olan hastalarda da meme kanseri gelişme riskinin yüksek olduğu belirtilmiştir (38).

2.4.7. Obezite:

Obezite, genel olarak meme kanseri riskini arttıran bir faktördür. Vücut kitle indeksinin (VKİ) yüksek olması öncelikle ER+ postmenopozal kadınlarda meme kanseri riskini arttırmaktadır (41). Ayrıca araştırmacılar, VKİ yüksek hastalarda lenf nodu metastazı yüzdesinin, tümör boyutunun daha yüksek olduğunu ve tümörün daha agresif biyolojik özellikler gösterdiğini bildirmişlerdir. Obezite, özellikle menopoz öncesi kadınlarda daha yüksek ölüm oranlarının ve daha yüksek kanser nüks olasılığının bir nedeni olabilir (42, 43)

2.4.8. Beslenme:

Beslenme ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda diyetle alınan yağ, kırmızı et, işlenmiş gıdalar, fitoöstrojen, beta-karoten ve diğer karotenoidler ile C, D ve E vitaminleri meme kanseriyle ilişkilendirilen beslenme risk faktörleri olarak öne çıkmaktadır.

Menopoz sonrası kadınlar üzerinde yapılan 20 yıllık randomize kontrollü bir çalışma, düşük yağlı bir diyetin meme kanserinde sağkalım oranını arttırdığını göstermiştir (44). Yağlar ile ilgili bir çalışmada da, Omega 3 PUFA'nın (Poly unsaturated fatty acid -Çoklu doymamış yağ asidi) (Balık, kuruyemiş ve yeşil yapraklı sebzelerde bulunur.) beslenmedeki oranının omega-6 PUFA'ya (Rafine bitkisel yağlarda ve doymuş yağlarda bulunur.) göre düşük olması ile meme kanseri riskinin arttığı rapor edilmiştir (45).

Et tüketimi ile meme kanseri riski tüketilen etin türü, pişme yöntemi ve derecesi ile ilişkilendirilmiştir. Etlerin pişirilmesi esnasında ortaya çıkan Heterosiklik aminler (HCA'lar) ve Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) gibi et kaynaklı mutajenlerin hayvan modellerinde meme bezi tümörlerinin gelişimini indüklediği gösterilmiştir (46).

İşlenmiş gıdalar sodyum, yağ ve şeker açısından zengindir ve bu da daha sonra meme kanseri riskinin başka bir faktörü olan obeziteye zemin hazırlar. Diyetle işlenmiş gıdaların %10 artışıyla meme kanseri riskinin %11 arttığı gözlemlenmiştir (47). Aksine, sebze, meyve, baklagiller, tam tahıllar ve yağsız protein açısından zengin bir beslenme, meme kanseri riskinin azalmasıyla ilişkilidir.

Birkaç prospektif kohort çalışmasının meta-analizi, yüksek diyet lifi alımının meme kanseri için koruyucu bir faktör olduğunu göstermiştir. Diyet lifi alımındaki her 10 gr/gün artış ile meme kanseri riskinde %7'lik bir azalma gözlenmiştir (48).

Fitoöstrojenler grubundan izoflavonlar soya ürünlerinde bulunur (49). Gözlemsel çalışmaların bir meta-analizi, izoflavon alımının meme kanseri riskinin azalmasıyla ilişkili olabileceğini bildirmiştir (50).

Yüksek serum 25-hidroksivitamin D düzeylerinin menopoz öncesi ve menopoz sonrası kadınlarda (51-53), yüksek beta-karotenin menopoz öncesi kadınlarda, yüksek E vitamininin menopoz sonrası kadınlarda meme kanser riskini azalttığı gösterilmiştir (54). (55). Ayrıca derlenen çalışmalardan elde edilen veriler E vitamini tüketiminin meme kanseri gelişimini azalttığını göstermiştir (56, 57)

C vitamininin meme kanseri riski ve mortalite ile ilişkisini inceleyen gözlemsel çalışmaların meta-analizinde yüksek C vitamini alımının, azalan meme kanseri insidansı ve mortalitesi ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmektedir (58). Menopoz sonrası kadınlarda

diyetle yüksek seviyede C vitamini alımı ile meme kanseri riskinin azalmasına karşın ilginç olarak yüksek C vitamini içeren diyetle ek olarak C vitamini takviyesi kullanan kadınlarda meme kanseri riskinin arttığını gösteren bir çalışma da bulunmaktadır (59).

2.4.9. Alkol Tüketimi:

Çalışmalar, alkol tüketimi ile meme kanseri riski arasında doğrusal bir doz-yanıt ilişkisi olduğunu göstermiştir. Olası biyolojik nedenlerinden ilki alkolün karaciğerdeki metabolizmasının bozulması ve androjenlerin östrojenlere dönüşümünü yoğunlaştırarak kandaki östrojen konsantrasyonunun artmasına katkıda bulunması, ikincisi bağışıklık sistemi ve DNA onarım süreçleri üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olması, sonuncusu alkol metabolitlerinin kanserojen bileşikler olmasıdır (60).

100'den fazla çalışmayı inceleyen bir meta-analizde, meme kanseri ile düşük alkol tüketimi (Haftada <3-4 içki) ve yüksek alkol tüketimi (Haftada > 20 içki) arasında hiç alkol tüketmemeye kıyasla pozitif bir ilişki olduğunu bildirilmiştir (61).

2.4.10. Sigara Kullanımı:

Sigara içmenin artmış meme kanseri riski ile ilişkili olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bir meta-analiz çalışmasına göre, meme kanseri riskinin sigara içme öyküsü olan kadınlarda daha yüksek olduğu saptanmıştır (62). 100.000'den fazla kadının katıldığı bir kohort çalışmada, özellikle sigaraya ergenlik çağında başlayan kadınlarda meme kanseri riskinde %5'lik bir artışa neden olduğu görülmüştür (63).

2.4.11. Çevresel Etmenler:

Kadınlar, çevre ve gıdalar yoluyla ekzojen endokrin etkiler oluşturabilen ksenobiyotiklere maruz kalmaktadır. Bu endokrin bozucular, östrojenler, androjenler ve tiroid hormonları gibi doğal hormonları taklit ederek endokrin sistem fonksiyonunun bozulmasına neden olur. Bisfenoller, ftalatlar, PCB (Poliklorlu bifenil), DDT (Diklorodifeniltrikloroetan), gibi östrojen benzeri etkiler gösteren bu endokrin bozucular, meme kanseri riskini etkileyebilir (64).

Bu maddelerden bisfenoller konserve ve gıda ambalajlarında ve plastik eşyalarda bulunur. Bisfenol grubu kimyasallar: Bisfenol-A (BPA), Bisfenol-AF (BPAF), Bisfenol-F (BPF) ve Bisfenol-S (BPS)' dir (64). Çalışmalar bisfenollerin, çeşitli yollar üzerinden ve direkt olarak östrojen reseptörlerine bağlanarak hücre proliferasyonunu ve meme kanseri ile ilişkili genlerin ekspresyonunu aktive ettiğini göstermektedir (64-67)

Fitalatlar tıbbi malzemeler, gıda kapları, kozmetikler ve oyuncaklarda bulunur. Aynı zamanda farmasötik kapsüllerde gecikmeli veya uzun süreli salınım özellikleri kazandırmak için de kullanılır (68). Fitalatlar diğer bileşenlere kovalent olarak bağlanmazlar ve üründen kolaylıkla sızarak insanlarda maruziyete yol açarlar (69). Dietil fitalat (DEP), di-izobütil fitalat (DBP), bütil benzil fitalat (BBP) ve dioktil fitalat (DOP), dietilheksil fitalat (DEHP) bu gruba üyedir. DBP maruziyeti östradiolü taklit eder ve meme kanserini teşvik edebilir (70). Bir çalışmada menopoza öncesi ve sonrası kadınlarda DBP maruziyetinin ER+ meme kanseri insidansını arttırdığı gözlenmiştir (71). Deneysel araştırmalar, DBP'nin ER'ye bağımlı MCF-7 meme kanseri hücre hattında proliferasyonu ve canlılığı arttırdığını göstermektedir (72-74)

Poliklorlu bifeniller, plastik, yalıtım malzemeleri, boyalar, kâğıt endüstrisi ve diğer ürünlerde yaygın olarak kullanılan geniş bir kimyasal gruptur. Bir meta-analiz çalışmasının sonuçlarına göre PCB maruziyetinin menopoza sonrası kadınlarda meme kanseri riskini arttırdığı bildirilmiştir (75)

Pestisitlerin bir türü olan DDT, birçok ülkede yasaklanana kadar dünya çapında böcek öldürücü olarak kullanılan organik bir kirleticidir (76). Bu kimyasala genç yaşlarda maruz kalmanın meme bezlerinin gelişimini bozduğu ve meme kanseri için bir risk faktörü olabileceği ileri sürülmektedir (77).

Polisiklik aromatik hidrokarbonlara, sentetik liflere, organik çözücülere, yağ buharına ve böcek öldürücülere artan maruz kalma durumunda da meme kanseri riski arasında potansiyel bir ilişki gözlemlenmiştir (78).

Son yıllarda geceleri mavi ışığa maruziyetin artması ile meme kanseri riskinin artışı ilişkilendirilmiştir. Muhtemel neden, bozulmuş diurnal ritim dolayısıyla vücutta melatonin dengesinin bozulması ve meydana gelen epigenetik değişiklikler olabilir (79)

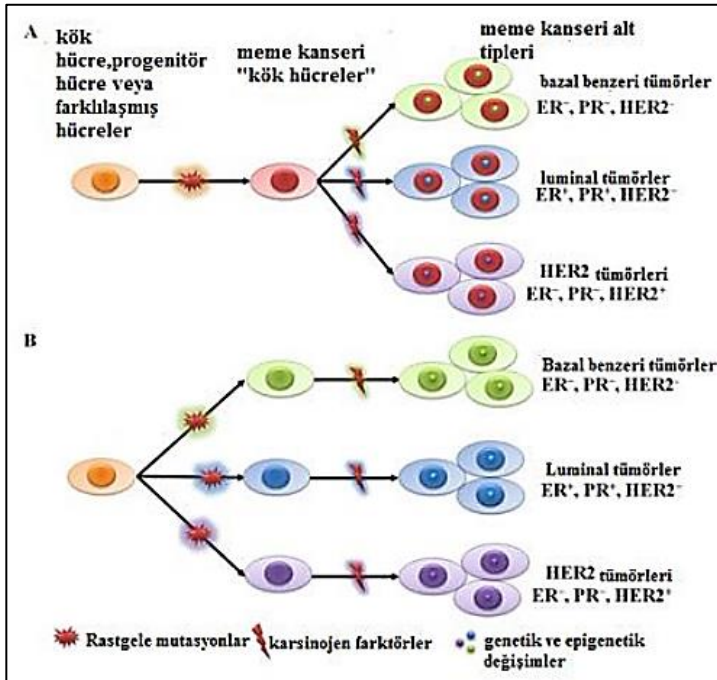
2.5. Meme Kanseri Gelişimi

Meme tümörleri genellikle duktus ya da lobüllerde hiperproliferasyon ile başlamakta ve daha sonra çeşitli kanserojen faktörlerle devamlı uyarılma sonucunda insitu, invaziv ve metastatik karsinomlara doğru ilerlemektedir. Tümör mikro çevresi de meme kanseri başlangıcında ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır (80). Tümör mikro çevresi, tümörün etkileşim içinde bulunduğu ortamdır. Bu ortam kanser hücrelerini, stromal dokuyu (Bağışıklık hücreleri, miyofibroblastlar, fibroblastlar, vasküler doku) ve hücre dışı matriksi (Ekstrasellüler matriks-ECM) içerir. Aynı zamanda içerisinde normal ECM’de bulunmayan çeşitli proteazlar gözlenir. Bu mikro çevre sayesinde tümör hücrelerine bağışıklık hücrelerinden kaçabileceği ve çoğalmayı teşvik edebilen bir ortam oluşmaktadır. (81).

Meme kanseri başlangıcı ve ilerlemesi için iki teori vardır: Bunlar kanser kök hücre teorisi ve stokastik teoridir:

Kanser kök hücre teorisi, tüm tümör alt tiplerinin aynı kök hücrelerden veya progenitör hücrelerden türediğini öne sürer. Kök hücrelerde veya progenitör hücrelerde kazanılmış genetik veya epigenetik mutasyonlar farklı tümör fenotiplerine yol açar.

Stokastik teoride ise, her bir tümör alt tipinin tek bir hücre tipinden (Kök hücre, progenitör hücre veya farklılaşmış hücreden) başladığı savunulur. Rastgele mutasyonlar, herhangi bir meme hücresinde aşamalı olarak birikebilir ve yeterli birikim tümör hücrelerine dönüşmelerine yol açar (82).(83)



Şekil 2.5. Meme kanserinin başlangıcı ve ilerlemesini açıklayan iki teori (83)

2.6. Meme Kanseri Sınıflaması

Meme kanseri kendine özgü klinik, histopatolojik ve moleküler özelliklere sahip bir grup hastalığın genel adıdır. Günümüzde meme kanserinin sınıflamasında çeşitli yaklaşımlar vardır. Bunlar TNM sınıflaması, histolojik ve yerleşim bölgesine göre sınıflama, moleküler tiplendirmedir.

2.6.1. TNM Sınıflaması:

Günümüzde evreleme sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanı AJCC (Amerikan Joint Committee on Cancer, Amerikan Kanser Komitesi) tarafından hazırlanmış TNM evreleme sistemidir. TNM (Tümör boyutu (T), lenf nodlarına yayılım (N) ve metastaz (M)) sınıflamasında tümör, tümörün boyutları, etrafındaki lenf nodlarına invaze olması ve metastaz yapmasına göre skorlanır. Daha önceden tanımlanmış kriterlere göre bu üç özellik belirlenip kombine edilerek, tümör için son TNM evresi hesaplanır. Tümör beş aşamadan (0, I, II, III ve IV) birine sınıflandırılır (84).

Tümör evresi meme kanserli hastalarda tedaviye yön veren önemli bir prognostik faktördür (85). AJCC tarafından yayınlanan en son baskıda (AJCC-TNM8), derece, ER, PR ve HER-2 (İnsan epidermal büyüme reseptörü-2) hakkındaki bilgiler de prognostik evrelemeyi oluşturmak üzere birleştirilmiştir. Bu prognostik evreleme, tek başına hastalığın anatomik yaygınlığının değerlendirilmesi sınırlamasını ortadan kaldırır (86).

Tablo 2.1. Primer tümör (T) (87)

T	T kriteri
Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümöre ait bulgu yok
Tis(DCIS)	Duktal karinoma in situ
Tis (Paget)	Meme başının, altta yatan meme dokusunun invaziv karsinomu ve/veya karsinoma in situ (DCIS) ile ilişkili olmayan Paget hastalığı. Paget hastalığı ile ilişkili meme parankim karsinomları sınıflandırılırken parankimal hastalığın karakteristik özelliği ve boyutu baz alınmalıdır. Paget hastalığının varlığı belirtilmelidir.
T1	Tümör en büyük boyutu ≤ 20 mm
T1mi	Tümör en büyük boyutu ≤ 1 mm (Mikroinvaziv karsinom)
T1a	Tümör en büyük boyutu > 1 mm fakat ≤ 5 mm
T1b	Tümör en büyük boyutu > 5 mm fakat ≤ 10 mm
T1c	Tümör en büyük boyutu > 10 mm fakat ≤ 20 mm
T2	Tümör en büyük boyutu > 20 mm fakat ≤ 50 mm
T3	Tümör en büyük boyutu > 50 mm

T4	Herhangi bir boyuttaki tümörün direkt göğüs duvarı ve /veya cilt tutulumu (Ülserasyon veya makroskopik nodüller) Tek başına dermis invazyonu T4 olarak nitelendirilmez
T4a	Göğüs duvarı tutulumu Göğüs duvarı invazyonu olmadan pektoral kasa invazyon veya adhezyon T4 olarak nitelendirilmez
T4b	İnflamatuvar karsinom için gerekli özellikleri karşılamayan, cilt ülserasyonu ve /veya ipsilateral makroskopik satellit nodülleri ve/veya ödemi
T4c	Hem T4a hem de T4b varlığı
T4d	İnflamatuvar karsinom

Tablo 2.2. Bölgesel lenf nodları klinik sınıflaması (cN) (87)

cN	cN kriteri
cNx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor (Önceden çıkarılmış, vs.)
cN0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
cN1	İpsilateral mobil seviye I, II aksiller lenf nod (lar)a metastaz
cN1mi*	Mikrometastaz (Yaklaşık 200 hücre, 0.2 mm'den büyük, fakat 2.0mm' den büyük değil)
cN2	İpsilateral klinik olarak fikse veya yığın yapmış seviye I, II aksiller lenf nodu metastazı veya aksiller lenf nodu metastazı olmadan ipsilateral internal mammarian nodlarına metastaz
cN2a	İpsilateral birbirine veya diğer yapılara fikse seviye I, II aksiller lenf nodlarına metastazı
cN2b	Aksiller lenf nodu metastazı olmadan ipsilateral internal mammarian nodlarına metastaz
cN3	Level I, II aksiller lenf nodu tutulumu olsun veya olmasın ipsilateral infraklaviküler (seviye III aksiller) lenf nod (lar)a metastaz veya seviye I, II aksiller lenf nodu metastazı ile ipsilateral internal mammarian lenf nod (lar)a metastaz veya aksiller veya internal mammarian lenf nodu tutulumu olsun veya olmasın ipsilateral supraklaviküler lenf nod(lar) a metastaz
cN3a	İpsilateral infraklaviküler lenf nod (lar)a metastaz
cN3b	İpsilateral internal mammarian lenf nod (lar)a ve aksiller lenf nod(lar) a metastaz
cN3c	İpsilateral supraklaviküler lenf nod (lar)a metastaz

Tablo 2.3. Uzak metastaz (M) (87)

M	M kriteri
cM0	Uzak metastaza ait klinik ya da radyolojik bulgu yok
cM0(i+)	Uzak metastaza ait klinik ya da radyolojik bulgu yok Uzak metastaza ait semptom veya bulgusu olmayan hastada kanda, kemik iliğinde veya bölgesel olmayan lenf nodlarında mikroskopik ya da moleküler tekniklerle saptanmış 0.2mm'den büyük olmayan tümör hücreleri veya depozitleri
cM1	Klinik ve radyolojik olarak saptanmış uzak metastaz

Tablo 2.4. Güncel TNM Sınıflandırması (87)

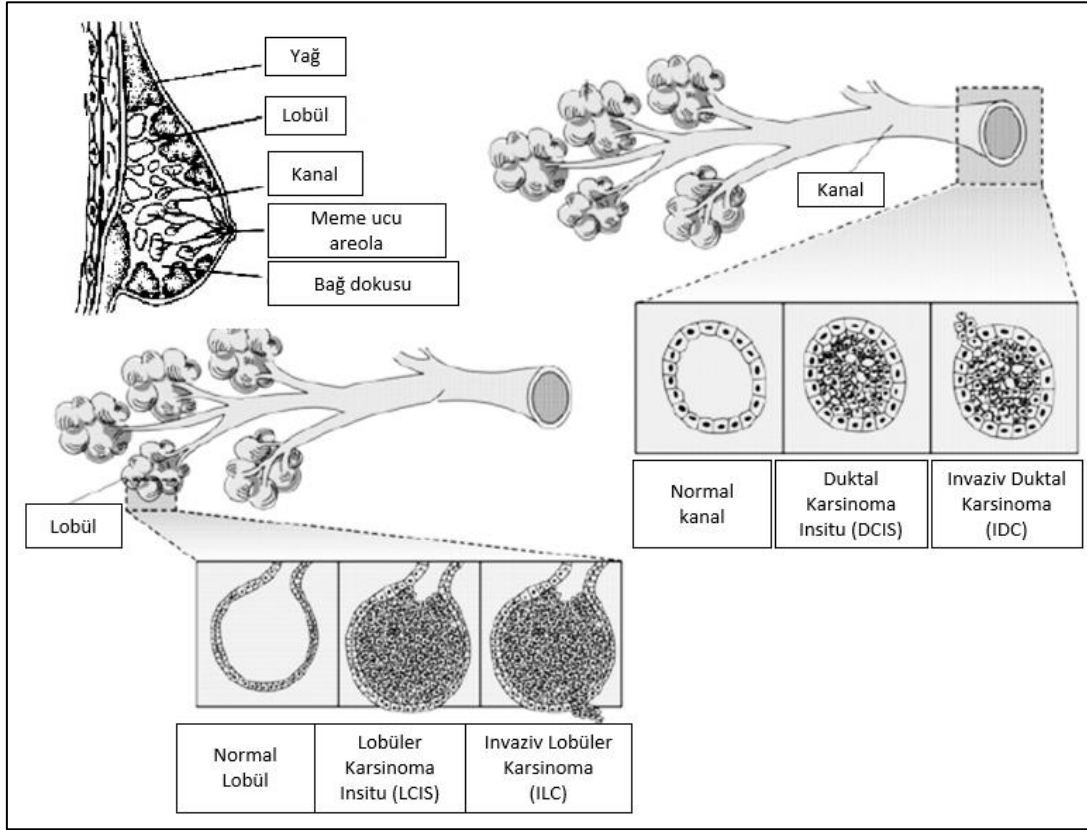
EVRE	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Herhangi T	N3	M0
IV	Herhangi T	Herhangi N	M1

2.6.2. Histolojik Sınıflama:

Meme kanserinin histolojik sınıflamasında ise tümör kitlesinin lokalizasyonu ve boyanma paterni dikkate alınır (Şekil 2.8). Kanser hücreleri süt kanallarında lokalize ise duktal, lobüllerde ise lobüller, medullada ise medullar meme kanseri ismini alır. Eğer tümör hücreleri oluştukları yerle sınırlı kalırlarsa insitu, çevre veya uzak dokulara yayılma eğilimi gösterirlerse invaziv meme kanseri olarak adlandırılırlar (7) (Şekil 2.6).

Histopatolojik değerlendirmede kullanılan bu kavramlar birlikte de kullanılarak tümörün yerleşim yeri ve kökeni hakkında bize daha detaylı bir kategorizasyon sağlayabilirler. Örneğin, Duktal karsinoma in situ (DCIS) tümörün duktal yerleşimli insitu evresinde olduğunu

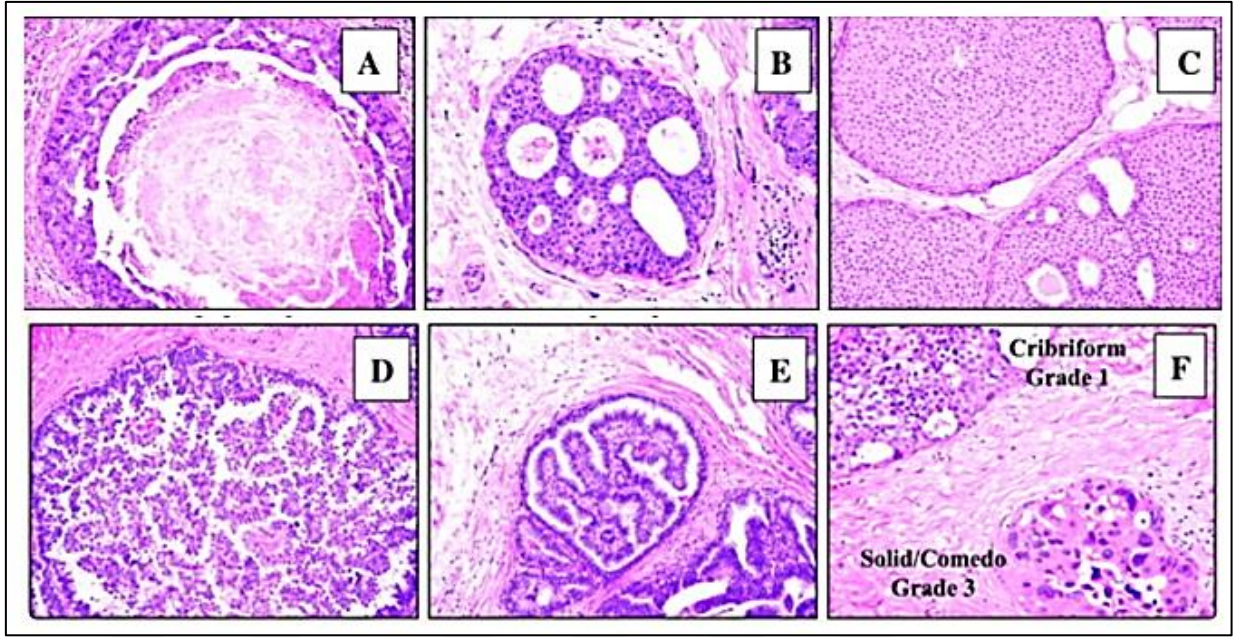
belirtir. Aynı şekilde lobüler karsinoma insitu (LCIS) lobüler yerleşimli insitu evrede bir tümörü ifade eder (88).



Şekil 2.6. DCIS, LCIS, IDC ve ILC' nin meme dokusundaki yerleşimi (89)

Duktal karsinoma insitu (DCIS), lobüler karsinoma insitu (LCIS) dan daha yaygın bir tümör tipidir. Henüz kanal dışına çıkmamış bu evre meme kanserinin en erken evresidir ve tümör hücreleri kanal dışında bulunmadığı için başka bir doku ya da organa yayılma söz konusu değildir (90).

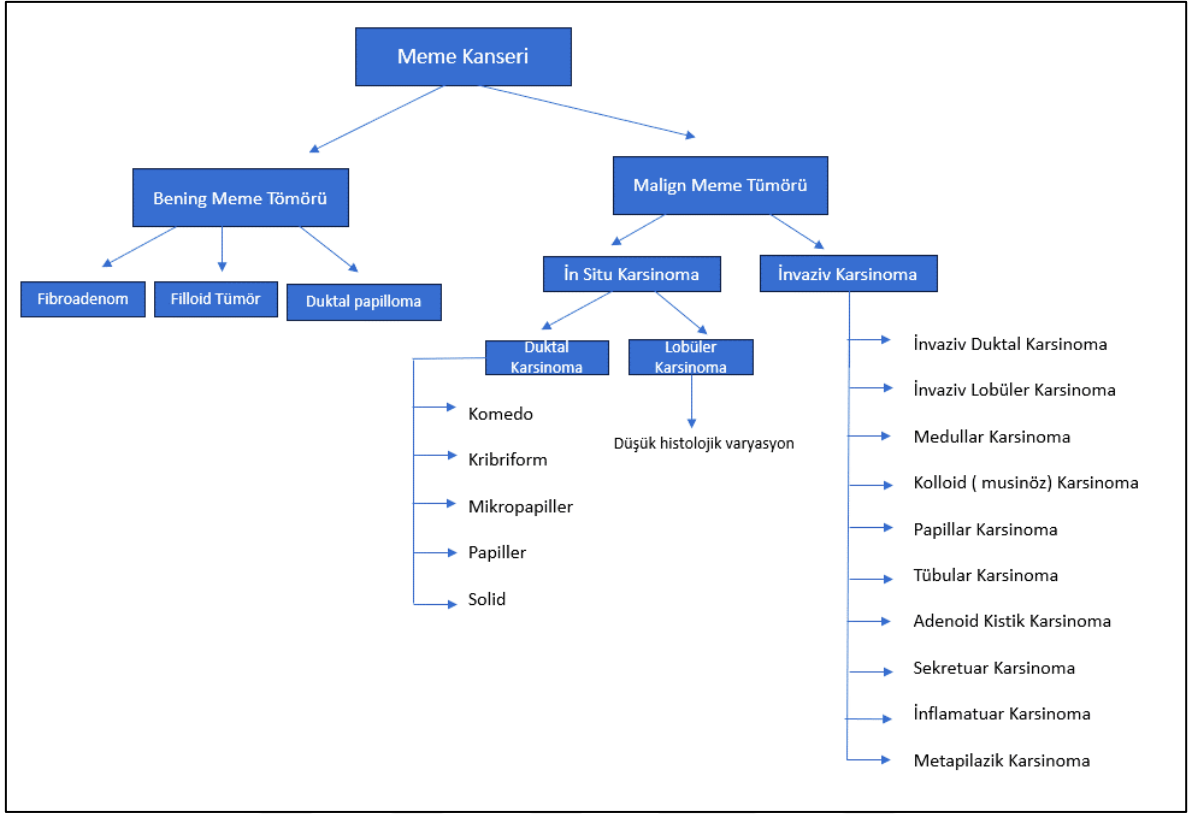
Duktal karsinoma insitu, geleneksel olarak tümörün histolojik boyanma özelliklerine dayalı olarak alt sınıflara ayrılmıştır: Komedo, Kribriform, Mikropapiller, Papiller ve Solid (Şekil 2.7). Bu sınıflandırma şeması değerli bir araç olsa da kanıtlanmış bir prognostik önemi olan daha yeni moleküler belirteçler kullanılmadan yalnızca histolojiye dayanmaktadır. LCIS' in DCIS kadar morfolojisi belli olan histolojik bir sınıflaması yapılmamıştır (91).



Şekil 2.7. In Situ duktal karsinomunun (DCIS) temsili morfolojik varyantları: Komedo (A), Kribriform (B), Solid (C), Mikropapiller (D) ve Papiller (E) alt tiplerini içerir. Bununla birlikte, DCIS' nin büyük bir kısmı, kategorize edilmesi zor olan karmaşık büyüme modelleri (F) karışımları gösterir (91).

İnvaziv meme kanserinin ise 10 ana histolojik alt tipi belirlenmiştir (Şekil 2.8). En sık görülen alt tip (%70-80), invaziv duktal karsinomdur (IDC). İkinci en yaygın histolojik alt tip, invaziv lobüler meme karsinomudur (ILC). Bu 2 alt tipin yanı sıra, örneğin müsinöz adenokarsinom ve memenin invaziv mikropapiller karsinomu gibi spesifik histolojik özelliklere sahip birkaç alt tip de mevcuttur (92).

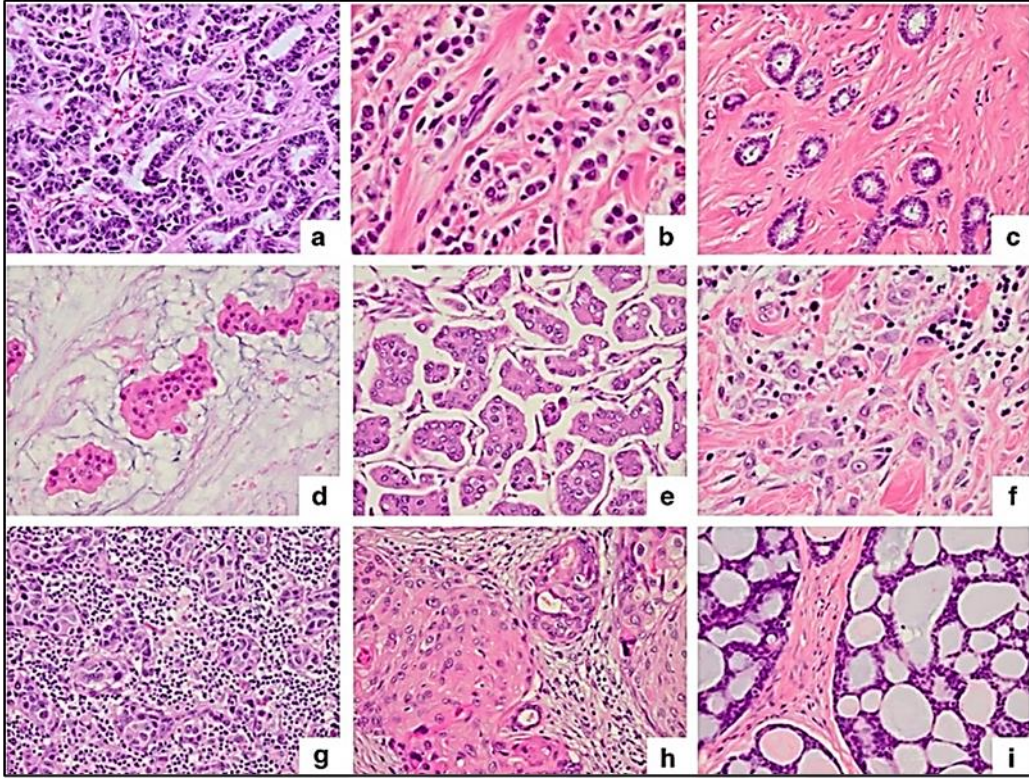
İnvaziv veya infiltratif karsinom, meme dokusunda bulunduğu lokalizasyondan komşu dokulara da yayılan neoplastik hücrelerin malign proliferasyonunu ifade eder (93). İnvaziv meme kanseri, tümör hücreleri normal göğüs lobül ve kanallarının etrafına yayılarak göğüs stromal dokusuna doğru büyüme gerçekleştirirler. Metastaz oluşturma eğilimindedirler.



Şekil 2.8. Meme kanseri histolojik sınıflandırılması (94)

İnvaziv meme kanserinin moleküler alt tipleri kanser hücrelerinin ifade ettiği ve hücrelerin nasıl davrandığını gösteren genlere dayanır. Meme kanserinde tedavi kararları ve prognoz hem evre (Tümör boyutu, tümörün yayılımı ve lenf nodu tutulumu) hem de moleküler alt tiple yakından ilişkilidir.

Dördüncü evre olarak da bilinen metastatik meme kanserleri diğer vücut bölgelerine yayılmış ileri evre kanserlerdir. Metastazlar karaciğer, koltuk altı lenf düğümleri, kemik, akciğer ve beyin gibi bölgelerde sıklıkla gözlenmektedir. Tümör çıkarılsa bile metastatik hücreler vücutta kalarak kanserin tekrarlamasına ve yayılmasına neden olabilmektedir. Meme kanserinin metastazında pek çok moleküler faktör sorumlu tutulmaktadır (95).



Şekil 2.9. İnvaziv meme karsinomunun temsili morfolojik varyantları:

(a) İnvaziv karsinom NST, (b) Klasik lobüler karsinom, (c) Tübüler karsinom, (d) Müsinöz karsinom, (e) İnvaziv mikropapiller karsinom (f) Pleomorfik lobüler karsinom, (g) Medüller karsinom, (h) Metaplastik karsinom, (i) Adenoid kistik karsinom (96)

2.6.3. Moleküler Sınıflama:

Histolojik sınıflama yöntemiyle meme kanserlerinin biyolojik farklılıkları tam olarak ayırt edilemediğinden sınıflamanın daha geniş çerçevede değerlendirmesi önemli bir gerekliliktir. Meme kanserinde “Moleküler Sınıflama” terminolojisi, ilk olarak 2000 yılında Perou ve Sorlie’ nin (97) gen ekspresyon farklılıklarını gösteren çalışmasında önerilmiştir.

Çalışmada 42 hastadan alınan 65 adet meme tümörü örneğinin cDNA mikroarray analizi ile 500’den fazla özgün gen ekspresyonu tanımlaması yapılmıştır. Fakat küçük değişikliklerin alt tiplerin sınıflamasında farklı sonuçlara neden olacağı gözlenmiştir. Yüzlerce gen kullanımı yerine, yalnızca ER ve HER-2 fenotipleri ile ilişkili genlerle üç temel alt tipin tanımlanması yapılmıştır. Bu subtipler; ER-/HER2- (Bazal benzeri), HER2+ ve ER+/HER2- (Luminal A ve B).

- **Luminal** (Sıklıkla iki ya da üç alt gruba farklılaşan; ER, ER düzenleyici genlerin ve normalde luminal epitelyal hücrelerden eksprese edilen genlerin ifadesinde değişiklik gözlenir.)
- **HER-2+** (ERBB2/ HER-2 gen ifadesinde artış ve gen amplifikasyonu gözlenir.)

- **Üçlü Negatif** (ER, PR ve HER-2 için negatif olan ve memenin bazal ve mioepitel hücreleri tarafından eksprese edilen genlerin ifadesinde değişiklik gözlenir.)

Bu çalışma ile meme kanserinin gen ifadesine dayalı olarak moleküler alt tipler halinde sınıflandırılabilceği açıklanmıştır. Bu yaklaşım günümüz sınıflandırmasının temelini oluşturmaktadır.

Bu üç alt tipe birçok tümör tipi dahil olduğu için daha fazla alt grup belirteci tanımlamak gerekmiştir. ER, PR, HER-2, Ki-67, Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ve bazal sitokeratinleri (CK14 ve CK5/6 gibi) içeren immünohistokimyasal belirteçler, luminal, HER2+ ve Triple negatif tümör alt tiplerini ayırt etmek için kullanılmaya başlanmıştır. Bazal benzeri tümörleri tanımlayan belirteçlerde fikir birliği yoktur, ancak EGFR ve CK5/6 kullanımının, bu alt tipi tanımlama ve prognoz tahmini sağlayacağı düşünülmektedir.

Günümüzde meme kanserinin moleküler tiplendirmesinde kullanılan temel belirteçler şunlardır: ER, PR, HER2, PDL-1(Programlı ölüm ligandı 1), Androjen reseptörü (AR), Ki-67, klauidin, sitokeratinler. Bu belirteçler rutin tanıda kullanılan başlıca moleküllerdir (98). Bu moleküler belirteçlere göre meme kanseri farklı alt gruplara ayrılmaktadır (99). Meme kanserinin moleküler tipleri ve hangi genlerin bu tiplerde eksprese edildiği aşağıdaki tabloda topluca verilmiştir. (Tablo 2.5.)

Östrojen reseptörü ve/veya PR eksprese eden tümörler, hormon reseptörü pozitif meme kanserleri olarak kabul edilirken, ER, PR veya HER2 eksprese etmeyen tümörler, Triple negatif meme kanseri (TNBC) olarak isimlendirilmektedir. Ayrıca Klauidin-düşük tümörler de triple-negatif fenotipi altında sınıflandırılmıştır (100).

Şu anda klinikte, histolojik ve moleküler özelliklere dayalı, gen ekspresyonu profillemeye çalışmaları temel alınarak meme kanserleri için alt tipi tanımlayan bir sınıflandırma kullanılır (101). Bu kapsamda, meme kanserinin moleküler alt tipleri, Luminal A, Luminal B, HER-2+ ve TNBC olarak tanımlanmıştır (Tablo 2.5). Bu sınıflandırma, meme kanserinin klinik yönetimini tümör yüküne dayalı olmaktan çıkarıp biyoloji merkezli yaklaşımlara kaydırmıştır.

2.6.3.1. Luminal-A:

En yaygın alt tiptir ve tüm meme kanserlerinin %50-60'ı bu tipe aittir. İmmünohistokimya ile ER+ ve/veya PR+, HER-2 negatif ve düşük Ki-67 indeksine (<%20) sahip tümörler olarak tanımlanır (102). Bu tümörler, klinik olarak düşük dereceli, yavaş gelişen ve en iyi prognoza sahip tümörlerdir. Aynı zamanda sağkalım oranı yüksek ve tekrarlama olasılığı düşüktür. Gözlenen histolojik tipleri tübüler, invaziv kribriform, müsinöz ve lobüler tiplerdir (Carey,

Winer et al. 2010). Hormon tedavisine (Tamoksifen ya da aromataz inhibitörleri) iyi yanıt verirler. (Yersal and Barutca 2014).

2.6.3.2. Luminal-B:

Meme kanserlerinin %15-20'si bu tipe aittir. Daha agresif bir fenotipe, daha yüksek histolojik dereceye, proliferatif indekse ve daha kötü bir prognoza sahiptir. Luminal-A' ya göre daha yüksek nüks oranı ve nüks sonrası daha düşük sağkalım oranlarına sahiptir. İmmünohistokimyasal açıdan ER+, PR +/- , HER2-negatif ve Ki-67 yüksek (>%30) tümörler olarak tanımlanır (103).

2.6.3.3. HER2-pozitif:

Meme kanseri alt tiplerinin yaklaşık %10-15' i bu alt tipe aittir. HER2 pozitifliği daha agresif biyolojik ve klinik davranış gösterir. HER2 geninin ve yerleşik olduğu lokustaki (17q12) bağlantılı diğer genlerin yüksek ifadesi ile karakterizedir. ER ve PR çoğunlukla negatiftir. Histolojik olarak 2 alt tipi gözlenir: Luminal HER2 (ER+, PR+, HER2+ ve Ki-67 skoru (%15-30)) ve HER2-zengin (HER2+, ER-, PR- ve Ki-67 skoru (>%30)). HER2 pozitif meme kanserlerinin yaklaşık yarısı ER için pozitifdir. Ancak genellikle ER ifade seviyeleri daha düşüktür (102). Yüzde 40'tan fazlasında p53 mutasyonları gözlenir. Bu tümörler HER2 hedefli tedavilere genellikle iyi yanıt verirler (104).

2.6.3.4. Triple Negatif Meme Kanseri:

Üçlü negatif meme kanserinde ER, PR ve HER2 gen ifadeleri gözlenmez. TNBC' deki bu gen ifade eksikliği, etkili terapötik hedefleri (PR, ER ve HER2) ortadan kaldırdığı için tanı ve tedavi üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Hedeflenebilecek bir molekülün olmaması TNBC' nin en agresif meme kanseri alt tipi olmasına, yüksek metastaz oranlarına ve genel olarak da sağkalım oranlarının düşmesine neden olur (105). Bu kanser türü için farklı sınıflama önerileri mevcuttur. Biz burada Lehmann (106) tarafından yapılan sınıflamayı temel aldık. Lehmann'ın sınıflamasına göre TNBC; Bazal benzeri (BL1 ve BL2), Mezenkimal (M), Mezenkimal kök benzeri (MES), Luminal androjen reseptörü (LAR) ve İmmünomodülatör tiptir (IM). İlk ikisi en sık görülenlerdir. Sırasıyla TNBC vakalarının %50-70'i ve %20-30'u bu alt tiplerde gözlenir. BRCA1 mutasyon taşıyıcılarında TNBC görülme sıklığı daha yüksektir (107).

TNBC'de tedaviyi yönlendiren çeşitli belirteçler vardır. Bunlar; klauadin, kaderin, sitokeratinler, EGFR, PDL-1, p53 gibi moleküllerdir (108).

Tablo 2.5. Meme kanserlerinin moleküler tiplendirmesi, genetik özellikleri ve ilerlemesi (109)

	ER	PR	HER2	Ki-67	Diğer Biyobelirteçler	İlerleme
Luminal A	+	+	-	Düşük	Luminal sitokeratin 8/18+ FOXA1+ ADH1B yüksek	İyi prognoz Düşük nüks skoru
Luminal B	+	+	+/-	Yüksek	Luminal sitokeratin 8/18+ Tp53-, FGFR1 e ZIC3 amp. ADH1B düşük	Orta prognoz Yüksek nüks skoru
Her2+	-	-	+	Yüksek	Tp53- GRB7 yüksek	Kötü prognoz
Triple Negatif	-	-	-	Yüksek	BRCA1- Tp53- Sitokeratin 5/6+/14+ /17+ CDKN2A yüksek RB1 düşük FGFR2 amp. EMT belirteçleri+ STAT1 yüksek SP110 yüksek GATA3 düzenleyici genler ve hücre-hücre adezyon genleri düşük Klaudin düşük CDH1 düşük PIK3CA- AKT- KRAS-	Kötü prognoz

2.7. MCF-7 Hücre Hattı

MCF-7 hücreleri ilk kez metastatik meme kanseri olan 69 yaşında bir hastanın plevral efüzyonundan Dr. Soule tarafından çoğaltılmıştır (110). Adını Michigan Cancer Foundation'dan (MCF-7) almaktadır. Dünyada en çok çalışılmış meme kanseri hücre hattı olma özelliğine sahiptir (111). Hücre hattı, östrojen reseptörü alfa'ya (ER- α) sahip olan nadir meme kanseri tiplerindendir. MCF-7 hücreleri agresif olmayan ve metastaz potansiyeli düşük bir yapıya sahiptirler. Luminal A tip meme kanseri grubunda sınıflandırılmıştır (112).

2.8. İyot

İyot elementi, insan vücudunda pek çok süreçte etkisi olan, tiroid hormonlarının yapımında kullanılan eser bir elementtir. Tiroid bezi ise iyodun vücutta işlenmesinden sorumlu, boyun bölgesinde yerleşik kelebek şeklinde olan ve sahip olduğumuz en büyük endokrin bezdir. Temel işlevi iyodu kullanarak tiroid hormonları tiroksin (T4) ve triiyodotironin (T3) üretmektir (113).

İyot, gebeliğin olduğu andan, bebek dünyaya gelinceye kadar ve daha sonra da tüm yaşam boyu çok önemli bir besin ögesidir (114). Normal tiroid fonksiyonlarının karşılanması için tavsiye edilen günlük iyot miktarı; bebeklerde 90 $\mu\text{g/gün}$, 6-12 yaş çocuklarda 120 $\mu\text{g/gün}$, yetişkinlerde 150 $\mu\text{g/gün}$, gebelik ve süt verme durumunda ise 250 $\mu\text{g/gündür}$. Gelişmiş ülkelerde sofraya iyot eklenmesi ile günlük alınan miktar 500 μg 'a kadar çıkmıştır (115).

İnsanlar günlük iyot ihtiyaçlarının yaklaşık %90' ını gıdalardan, geri kalanını ise sudan sağlamaktadır. İyodun besinsel kaynakları arasında iyotlu tuz, deniz ürünleri, süt ürünleri, yumurta, tahıllar, patates ve bazı ilaçlar (Amiodaron ve mineral tabletleri) sayılabilir. Deniz börülcesi gibi deniz kıyısı bitkileri de zengin iyot kaynaklarıdır. Bir deniz yosunu türü olan kelp en yüksek iyot miktarına sahip deniz ürünüdür (116). Üretim sırasında kalsiyum iyodat ve potasyum iyodat gibi katkı maddeleri eklenirse sofraya tuzu da önemli bir iyot kaynağı olmaktadır (117).

Yüksek iyot içeren besinler olduğu gibi, iyotun kullanımını engelleyen bazı besinler de bulunmaktadır. Lahana, karnabahar ve turp gibi bazı sebzeler, potansiyel guatrojenler olan glukozinolatlar (tiogluzitler) içerirler. Bu besinlerden çok fazla tüketilmesi iyot alınmasını engeller ve dolayısıyla guatr gelişimine yol açabilir (118).

İyot eksikliği fetal dönemden yetişkinliğe kadar her dönemde insan sağlığını olumsuz etkileyebilir. Fetal dönemdeki iyot eksikliği temelde annedeki iyot eksikliğinden kaynaklanıp plasenta dekolmanı, preeklamps, erken doğum yenidoğanda konjenital hipotiroidizm gibi komplikasyonlara neden olabilir. Konjenital hipotiroidizmin şiddetli bir formu kretinizme yol

açabilir. Kretenezmin klinik tablosu, ciddi zihinsel ve fiziksel gerilik, sağırılık, konuşamama ve motor spastisiteyi içerir (119).

Çocuklarda ve ergenlerde iyot eksikliği sıklıkla guatra yol açar. Guatrın görülme sıklığı ergenlikte pik yapar ve kızlarda erkeklere göre daha sık görülür. İyot eksikliği (İdrarla iyot atılımı 100 µg/gün' den az), çocuklukta potansiyel olarak önlenabilir zekâ geriliğinin ana nedeni olarak bilinmektedir (120). Şiddetli iyot eksikliğinden etkilenen bölgelerde yaşayan çocuklarda, iyot eksikliği olmayan bölgelerdeki yaşıtlarına göre zekâ katsayılarının (IQ) yaklaşık 13,5 puan daha düşük olabileceği bildirilmiştir. Bu zihinsel yetersizlik, çocuğun öğrenme kapasitesi, toplulukların yaşam kalitesi ve ekonomik üretkenlik üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir (121).

Yetersiz iyot alımı yetişkinlerde de guatr ve hipotiroidizme neden olabilir. Hipotiroidizm yetişkinlerde beyin üzerinde çocuklara nazaran daha az etkiye sahiptir. Ancak araştırmalar, hipotiroidizmin eğitilebilirlikte ve iş verimliliğinde düşmelere, sosyal ve ekonomik başarısızlıklara yol açtığını göstermektedir (122). Bu kadar ciddi bireysel ve toplumsal etkilere sahip iyot eksikliği, önlenmesi en kolay ve en ucuz hastalıklar arasındadır. İnsanların her gün tükettiği tuza, sabit miktarda iyot ilavesi yeterlidir.

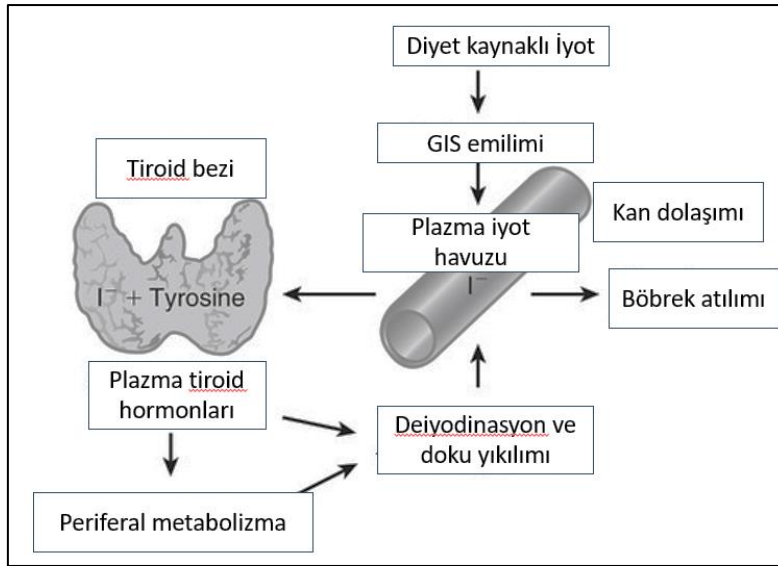
1994 yılında DSÖ, UNICEF (Birleşmiş Milletler Çocuklara Yardım Fonu) ve ICCIDD (Uluslararası İyot Eksikliği Bozukluklarının Kontrolü Konseyi) iş birliği içinde iyot eksikliği bozuklukları için ana stratejiyi, yani Evrensel Tuz İyotlandırmasını önermiştir (123). Polonya'da 1996'da yeni bir iyot profilaksisi modeli tanıtılmıştır; model ev tipi tuzlara, yeni doğan formül mamalarına zorunlu olarak iyot eklenmesini ve hamile ve emziren annelere ek iyot takviyesi verilmesini içermektedir. Bu model, okul çağındaki çocuklarda endemik guatrın, dağlık alanlarda kretenezmin ortadan kaldırılmasına yardımcı olmuştur (124).

2.9. İyot Metabolizması

Yetişkinlerde normal tiroid işlevlerinin sürdürülmesi için diyetle günlük en az 150 µg iyot alınmalıdır. Ana iyot kaynaklarından biri olan sofratuzunun iyotlanması için kullanılan iyodat tuzları (IO_3^-) emilmeden önce bağırsakta iyodüre (I^-) indirgenir. İyodürün biyoyararlanımı %90'dan fazladır (125) (126). Diyetle alınan günlük yaklaşık 500 µg iyotun emilimi gastorintestinal (Mide ve duodenum) sistemde gerçekleşir (127). Bağırsak emilimine ek olarak, tiroid bezi ve periferel dokularda (Toplam iyotun yaklaşık %20-30'u) tiroit hormonlarının (T_4 ve T_3) deiyodasyonu ile açığa çıkan iyot da kan dolaşımında mevcut olan iyodür seviyesine katkıda bulunmaktadır (128). İnsan vücudunda iyot, I^- , I_2 , triiyodür (I_3), IO^- hipoiyodöz asit

(HIO), iyot anyonu (HI_2O^-), ve iyot bağlayan tiroid hormonları ve iyodolipidler gibi formlarda bulunur (129)

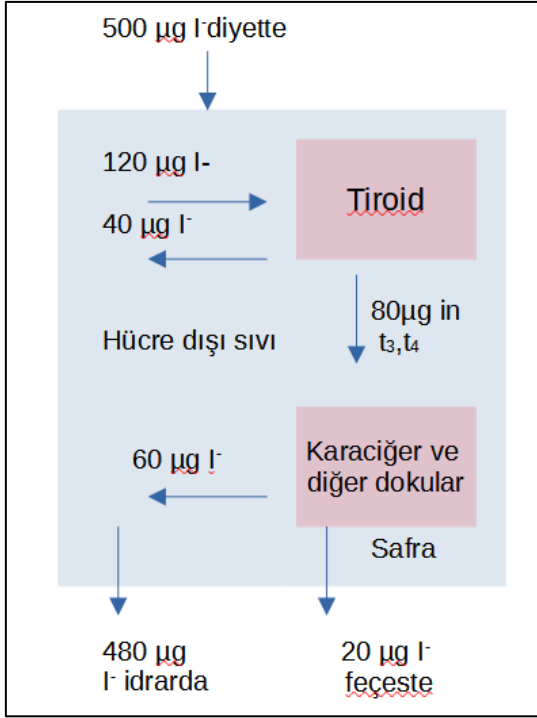
Emilen iyot inorganik iyodür tuzu formundadır. Hemen hemen tamamen (>%90) emilim gerçekleşir ve bir saatte tamamlanır (127). Daha sonra kan damarları yoluyla plazma inorganik iyot havuzuna gönderilir. Plazma iyodunun yarılanma ömrü 8-10 saattir (130). Plazma inorganik iyot miktarı 0,8-6 $\mu\text{g/L}$ 'dir. İdrardaki iyot miktarı da plazma ile uyumludur. Diyetle alınan iyotun %90'ından fazlası 24-48 saat içinde idrarla atıldığından bir popülasyondaki iyot yetersizliği durumunun belirlenmesi gerekiyorsa, idrar iyot düzeyleri (spot veya 24 saatlik) eksikliğin saptanması için uygun ve kolay bir yöntemdir (131).



Şekil 2.11. Vücutta iyodun işlenmesi (132)

Plazma iyodu, başlıca tiroid hormonu (Triiyodotironin (T3) ve tiroksin (T4)), yapımında kullanmak amacıyla tiroid bezi tarafından tutulmaktadır. 6-12 mg'a kadar olabilen total vücut iyodunun % 90 kadarını tiroit içindeki iyot oluşturur (133).

Dolaşımdaki iyodürün 4/5'i böbrekler tarafından hızla atılırken, 1/5'i ise tiroid hormonlarının yapımında kullanılır. Tiroid hormonlarının normal hızda yapımı ve salgılanması için tiroide her gün yaklaşık 120 μg iyot girer. Tiroid 80 μg iyodu hormon yapımında kullanır, 40 μg iyot dolaşıma geri dönmektedir. Dolaşımdaki T3 ve T4 karaciğer ve diğer dokularda metabolize edilir, bu yolla günde 60 μg iyot geri kazanılır. Ayrıca idrarla atımından sonra bir kısım iyot da böbrekler tarafından sisteme geri döndürülür. Bazı tiroid hormon türevleri safrada atılır ve içlerindeki bir miktar geri emilse de dışkı ile 20 μg iyot kaybı olur. Hücre dışı sıvılara katılan toplam iyot miktarının (600 μg) %20'si tiroide girerken %80'i idrarla atılır (4).



Şekil 2.12. İyodun vücudumuzda günlük hareketi (4)

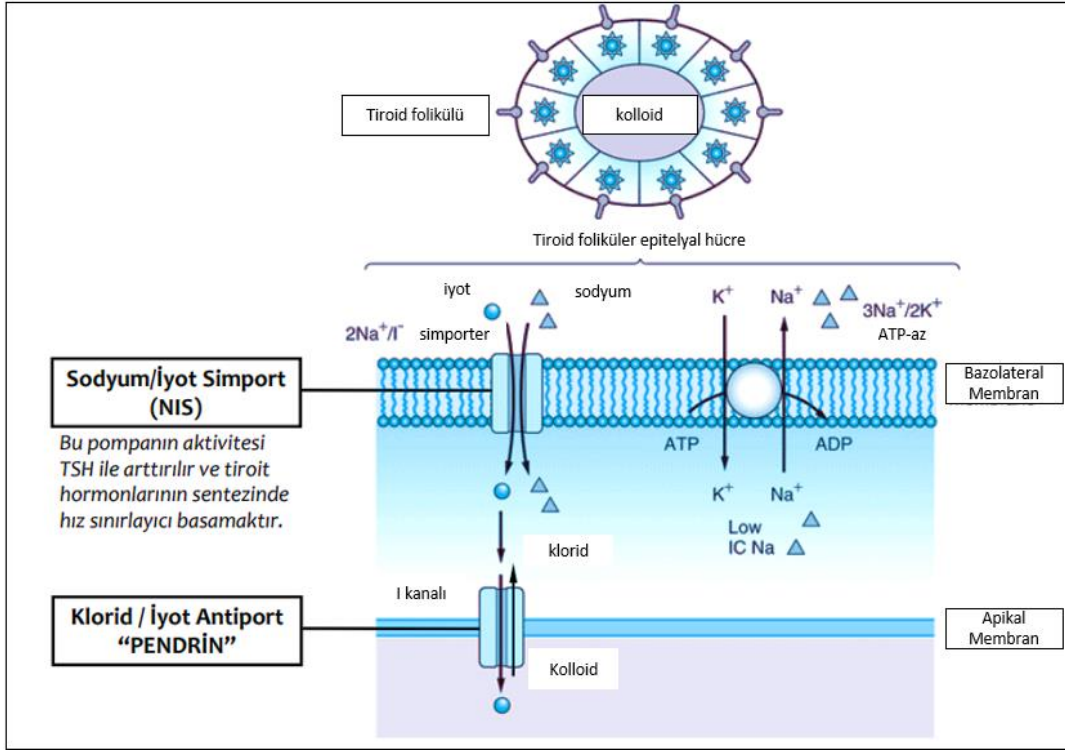
Kan damarları yoluyla tiroide gelen iyot, tiroid hormon sentezinde kullanılmak ve kolloid sıvıda depolanmak üzere önce hücre içine sonra da folikül lümenine taşınmaktadır. Taşınma NIS (/SLC5A5) ve anyon değiştirici pendrin ((PDS)/SLC26A4) molekülleri sayesinde iki adımlı transport sistemi ile sağlanır.

1. Plazmadan folikül hücrelerine iyodür geçmesini sağlayan foliküler epitel hücrelerinin bazolateral membranında bulunan NIS taşıma sistemi

İyodürün NIS tarafından zar boyunca taşınması, Na^+/K^+ ATPaz tarafından gerçekleştirilen, hücre dışından hücre içine bir elektrokimyasal sodyum gradyanı gerektirir. Bu aktif taşıma mekanizmasına “iyodür pompası” denir. NIS aktivasyonu tiroid stimulan hormon (TSH) ile arttırılır ve tiroit hormonlarının sentezinde hız sınırlayıcı basamaktır.

2. İyodürün folikül lümenine geçmesini sağlayan Klorür/İyodür Antiporter sistemi

Epitel hücrelerine alınan iyodun tiroid foliküler hücrelerinin apikal membranını geçerek kolloide girmesini sağlayan pasif taşıma sistemidir. Bu taşıma işlemi Pendrin olarak isimlendirilen bir " Cl^-/I^- " değiştirici bir protein aracılığı ile gerçekleşir (134).

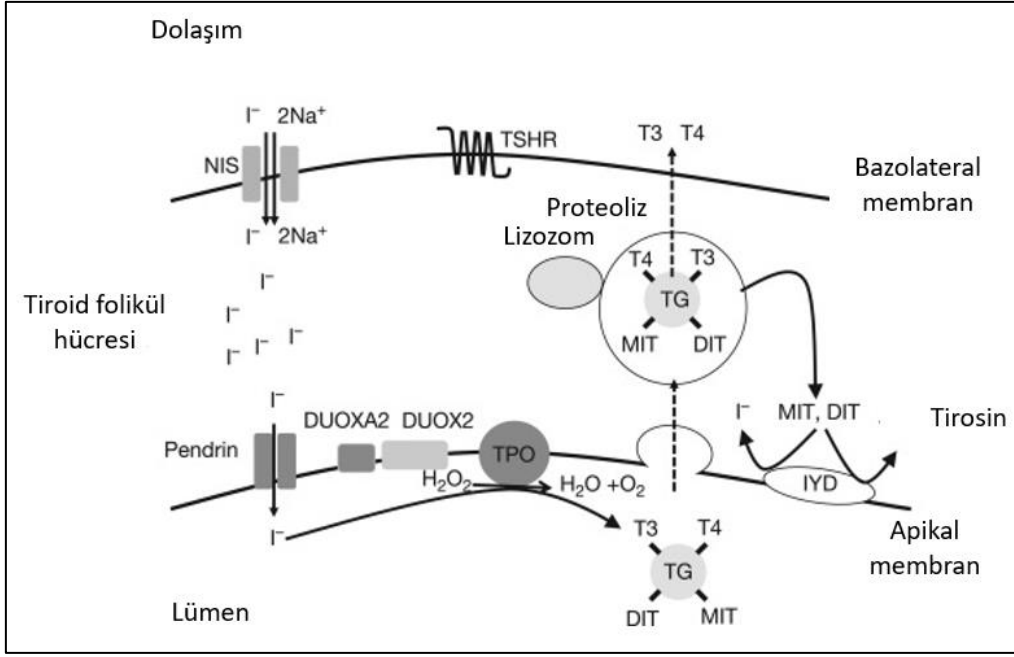


Şekil 2.13. Sodyum /İyodür Simporter ve Klorür /İyodür Antiporter sistemi (135)

2.9.1. Tiroit Hormon Sentezinde İyot

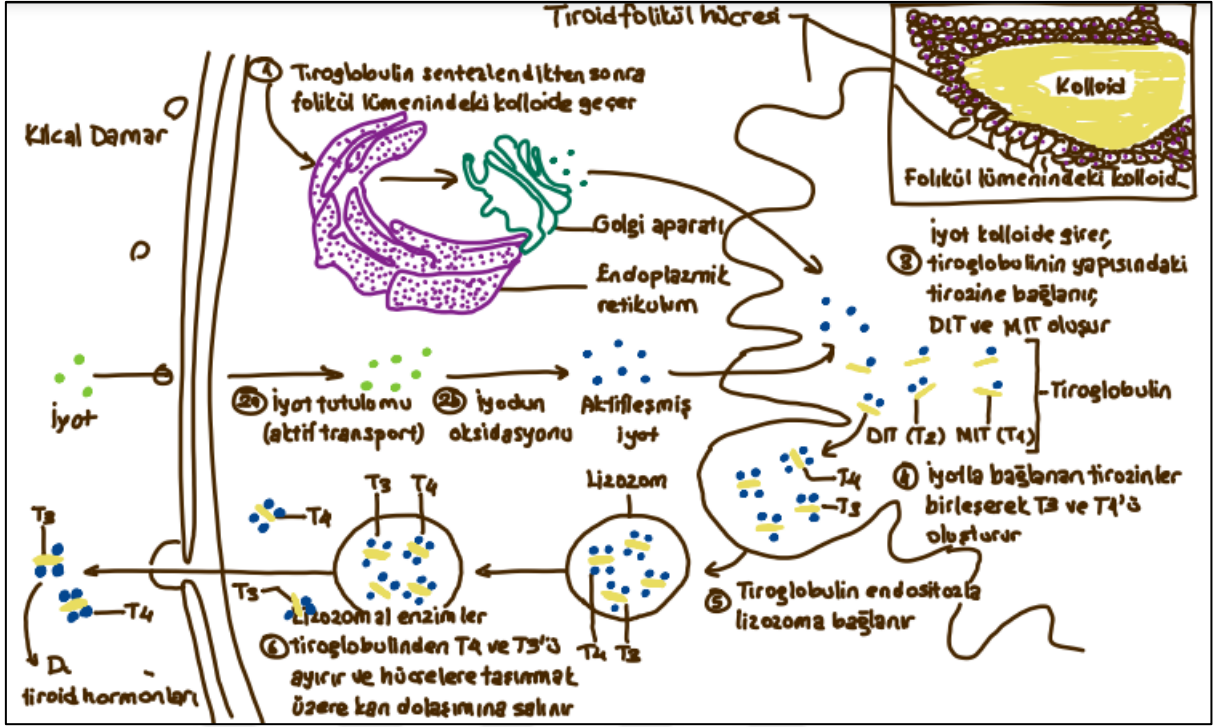
$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPaz}$ tarafından oluşturulan sodyum gradyanı, NIS'in iki sodyum iyonunu bir iyodürle birlikte tiroid foliküler hücrelerine aktif olarak taşımasına olanak tanır. Hücrelerin içinde sıkışan iyodür, Pendrin tarafından tiroid folikülünün kolloidine taşınır. Tiroglobulin (TG), tiroid hücrelerinde üretilir ve endoplazmik retikulum granüllerinin ekzositozu ile kolloide aktarılır. Tirositin apikal yüzeyinde, tiroid peroksidaz (TPO), ikili oksidaz 2 (DUOX2) tarafından üretilen hidrojen peroksit (H_2O_2) ile aktif hale gelir ve iyodürü (I^-) oksitler (Şekil 1.13.) ve onu tiroid hormon üretimi için matriks glikoproteini olan TG üzerindeki tirozin kalıntılarına bağlar.

İyodürün TG yüzeyindeki mono ve di-iyodotirozin kalıntılarına (MIT, DIT) dahil edilmesini ve bunların tiroid hormonları T3 ve T4'ü oluşturmak üzere birleşmesini içeren bu bağlanma reaksiyonlarına TG'in "organifikasyonu" adı verilir (133). Bağlanma reaksiyonlarından elde edilen ilk ürün monoiyodotirozindir (MIT). MIT daha sonra karbon 5 pozisyonundan iyotlanarak diiyodotirozin (DIT) oluşturur. T3, bir DIT ve bir MIT' in birleşmesi ile T4 ise iki DIT molekülünün ile birleştirilmesiyle üretilir (136). İyodotirozin dehalojenaz (IYD), deiyodinasyonla tirozin kalıntılarına bağlı kullanılmayan iyodür parçalarını geri dönüştürür (137).



Şekil 2.14. Tiroid hormon sentezinde görevli enzimlerin şematik gösterimi (138)

Tiroid hormonları ve TG, makro ve mikropinositoz yoluyla tiroid foliküler hücreleri tarafından endositozla alınana ve lizozomlarda sindirilene kadar kolloidde depolanır. İhtiyaç halinde tiroisitlerin bazolateral yüzeylerinde bulunan tiroid stimulan hormon reseptörü (TSHR) aracılığıyla hipofizden TSH salgısı uyarılır (139). Lizozomal enzimler TG'den T4 ve T3'ü ayırır ve hücrelere taşımak üzere kan dolaşımına salınır (140). Tiroid hormonları kan dolaşımına monokarboksilat taşıyıcı 8 (MCT8) tarafından verilir. Bu hormonlar dolaşımında büyük oranda TG, albümin, transtiretin ve lipoproteinlere bağlanarak taşınırlar (139).



Şekil 2.15. Tiroid hormonu sentezi, iyodür alımından kan dolaşımına serbest tiroid hormonlarının salınmasına kadar şematik gösterimi (141) makaleden uyarlanmıştır.

T3 ve T4 hormonları Tiroglobulin tarafından 2-3 ay yetecek kadar folikülde depo edebilir. Bu nedenle hormon sentezi durduğu zaman, yetersizlik belirtileri ilk birkaç ay gözlenmez (142) İnsan tiroidi günde 80 µg T4, 4 µg T3 ve 2 µg RT3 (Reverse T3) salgılar (143).

2.10. Meme Dokusu ve İyot İlişkisi

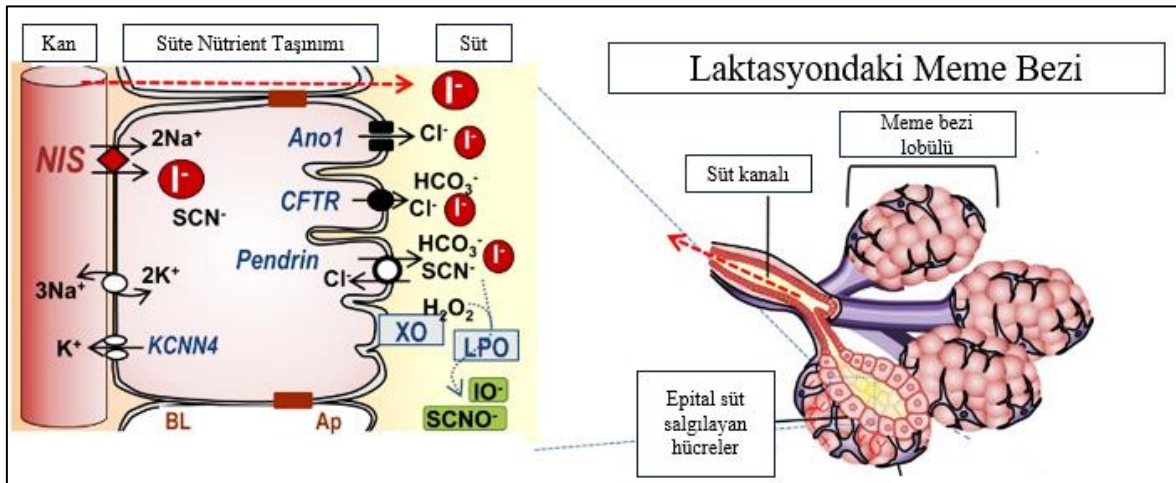
Tiroit dışında laktasyondaki meme bezleri, mide mukozası, serviks, tükürük bezleri, koroid plexus, sinir sistemi, gözün silier tabakası, gözyaşı bezleri, timus, deri, plasenta, over, uterus, prostat ve pankreas gibi iyodu kullanan ve konsantre eden dokular da bulunur (142).

İyot birikimi, emziren meme bezinde tiroide kıyasla çok daha hızlıdır. 2000 yılında Tazebay ve ark. tarafından bu iyodür birikiminin emziren meme bezinde eksprese edilen NIS proteini ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (144).

Normal meme dokusunda NIS gen ifadesi, tiroid bezindeki devamlı NIS gen ifadesinin aksine, yalnızca gebeliğin sonlarında ve emzirme döneminde gözlenir. Memede iyot birikimi, emzirme döneminde ve neonatal gelişimde önemli rol oynamaktadır. De la Vieja' nın derleme çalışması rehberliğinde, bu konu ile ilgili diğer yayınlar gözden geçirildiğinde meme dokusunun epitel hücrelerinde de tıpkı tiroid epitel hücreleri gibi iyot biriktiği görülmektedir. Laktasyondaki meme dokusunda kandan hücre içine ve süt salgısına iyot transferi NIS ve Pendrine ek olarak anoktamin 1 (ANO1), kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyici

(CFTR) ve sodyum multivitamin taşıyıcı (SMVT) proteinlerin doğrudan katılımı ile gerçekleşmektedir (145) (146).

Süte taşınan iyot (I^-), laktoperoksidaz (LPO) adı verilen spesifik bir peroksidaz aracılığıyla alınır; bu peroksidaz sayesinde oksitlenir ve serbest iyotla birlikte süte salgılanan laktoprotein kazeine bağlanır (144). Ek olarak, LPO, ksantin oksidaz (XO) tarafından üretilen H_2O_2 'yi kullanarak meme ve bebek enfeksiyonlarını önlemek için hipoiyodit (IO^-) ve hipotiyosiyanit ($OSCN^-$) üretir (147).



Şekil 2.16. Emziren meme bezinde I^- metabolizmasına şematik genel bakış (148)

2.11. İyot ve Meme Hastalıklarının İlişkisi

İyot ve meme dokusu arasında ilişki olabileceği fikri ilk olarak, Asya kökenli kadınların diğer toplumlara nazaran daha az meme kanserine yakalanmasıyla öne sürülmüş, diyetlerinin yüksek miktarda deniz ürünü içermesinin buna etken olabileceği düşünceleri yoğunlaşmıştır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda iyotça zengin (Batı'dakinden 25 kat daha fazla) beslenen toplumlarda görece düşük meme kanseri görüldüğü teorisi daha da kuvvet kazanmıştır (149). ABD'ye gelen Japon göçmenlerde, ardışık nesillerde görülen meme kanseri insidansındaki kademeli yükselmenin, ABD'deki beyaz kadınlarınkine benzerlik göstermesi diyet bağlantısına dair kanıtları kuvvetlendirmiştir (150).

İyot içeriği yüksek Gim (Porphyrasp) ve Miyeok (Undaria pinnatifida) (Koreliler tarafından en çok tüketilen deniz yosunları) tüketiminin de meme kanseri riskinde azalmaya neden olduğu bir vaka kontrol çalışmasıyla gösterilmiştir (151). Bu toplumların zaman içinde göç etmesi ve batı diyetini benimsemesi ile ileri kuşaklarda meme kanseri oranlarında yükselme gözlenmiştir (152). Bu veriler meme kanserine yakalanmada iyot zengin beslenmenin koruyucu bir etkisi olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

İyodun normal meme bezinin bütünlüğüne, büyümesi ve gelişmesine katkıda bulunan bir molekül olduğu bilinmektedir. Örneğin meme bezi embriyogenik olarak ilkel iyodür konsantre ektodermden köken almıştır (153). Ayrıca emziren kadınların meme dokusunda iyodun taşınmasından sorumlu NIS ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (154-156) Ayrıca patolojik olarak, meme kanseri olan hastaların meme dokusunda, emzirmeyen sağlıklı bireylerin meme dokusuna kıyasla NIS ekspresyonunun arttığı belirtilmiştir (144, 157)

Deney hayvanlarında yapılan çalışmalardan birinde ratlarda diyet veya farmakolojik olarak iyot eksikliğinin meme dokusunda atipi ve displaziye neden olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca erken dönem iyot tedavisi ile de iyot eksikliğinden kaynaklanan displazinin tersine çevrilebildiği saptanmıştır (158).

Çeşitli hayvan çalışmalarında da, kimyasal olarak indüklenen meme tümörlerinde ve meme kanseri hücre hatlarında iyot ve iyot içeren çeşitli bileşiklerin antineoplastik etkiler gösterdiği, proliferasyon hızını azalttığı ve invazyon belirteçlerinin seviyelerinde azalmalara neden olduğu, apoptozu indüklediği gösterilmiştir (159) (160) (161).

İyodun meme dokusundaki antiproliferatif etkisine ek olarak lipoperoksidasyonda da önemli bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. İyot, tiroide iyodolakton adı verilen iyodolipidlere bağlanır. Bu moleküller meme bezinin proliferatif kontrolünde rol oynamaktadırlar (162).

Bu veriler, son yıllarda özellikle daha sağlıklı bir yaşamı hedefleyen insanların odak noktasındaki homeopatik tedavi uygulamalarında iyot kullanımının öne çıkması ile iyodun insan meme kanseri hücreleri üzerinde indükleyici ya da baskılayıcı etkisini araştırmak için bir çıkış noktası olmuştur.

2.12. Ki-67 ve Meme Kanseri İlişkisi

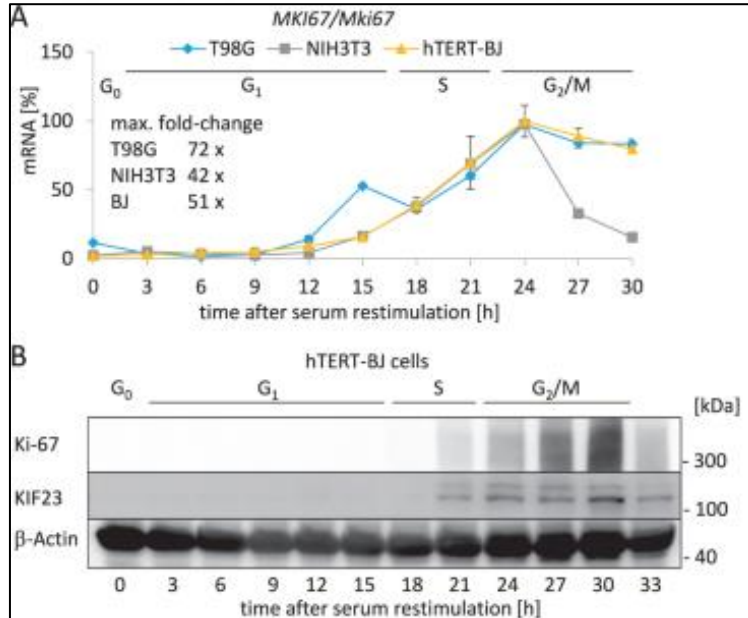
Ki-67, patolojide, pek çok tümörün tanısında varlığı ve düzeyi proliferasyon belirteci olarak incelenen bir proteindir. Sadece çoğalan hücrelerde bulunan bu protein, nükleer bir protein olup ilk olarak 1983 yılında Gerdes tarafından Hodgkin lenfoma hücre çekirdeklerinde tanımlanmıştır (163).

İnsanlarda MKI67 geni tarafından kodlanan Ki-67 proteininin 320 ve 359 kDa ağırlığında iki izoformu vardır (164). Gen bölgesinin varyantları MKI67-201 (11417 bp, 2896 aa) ve MKI67-202'dir (12716 bp, 3256 aa) (165)

K-67 hücre döngüsünün G₀ fazı hariç, her fazında (G₁, S, G₂ ve M) değişen miktarlarda ifade edilmektedir. G₀'da ifade edilmeyen Ki-67'nin, hücre interfaza girdiğinde G₁ fazının ilk

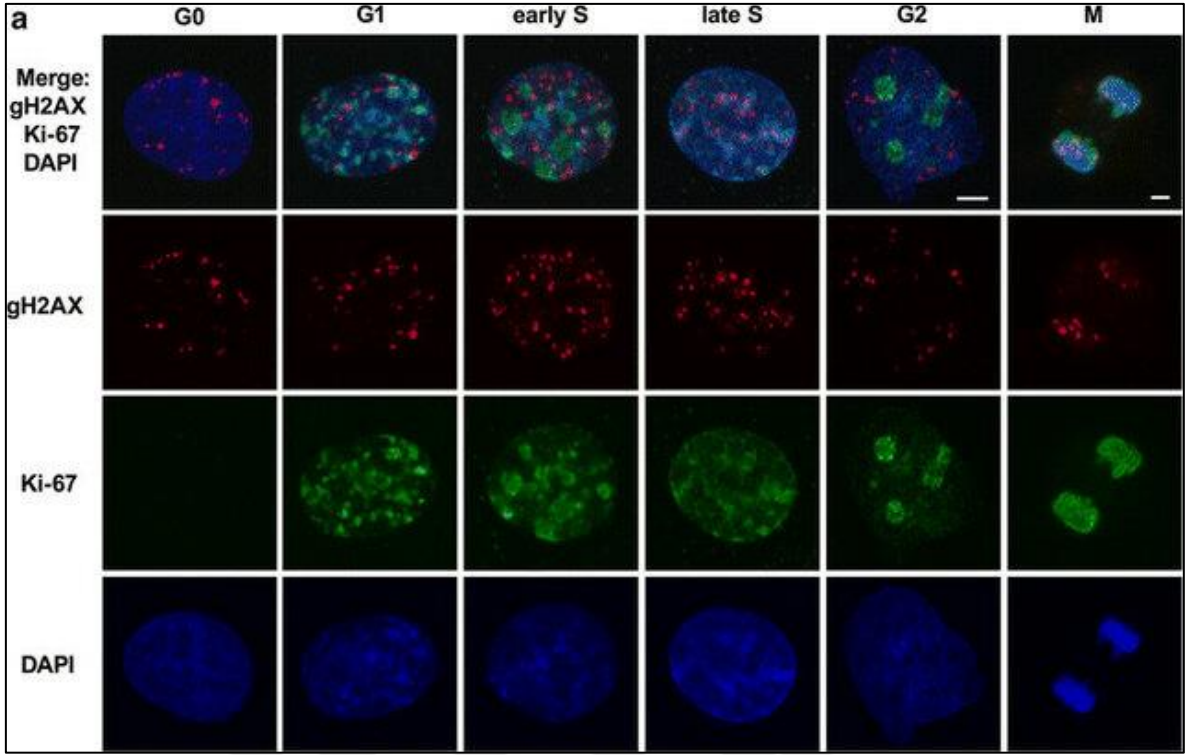
dönemlerinde minimal düzeyde ifade edildiği, G1'in sonlarına doğru önce mRNA düzeyinde ardından protein düzeyinde ifadenin hızlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (Şekil 2.17.) (166)

Ki-67, hücrelerin bölünme sürecinde gözlenen bir protein olsa da son genetik çalışmalar Ki-67 kaybının hücre proliferasyonu üzerinde çok az veya hiç etkisi olmadığını savunmaktadır. Bu çalışmaların bulgularına göre, Ki-67' nin fonksiyonları hücre bölünmesinde kromatin yapının sağlam bir şekilde bölünme evresine uygun davranmasını organize etmek (167), kromozomların mitotik iğe bağlanması ve bireysel kromozom hareketleri, nükleer zarfın parçalanmasından sonra mitotik kromozomları birbirinden ayrı tutan yüzey aktif (Surfaktan) bir madde gibi davranmak, protein fosfataz 1'e bağlanarak perikromozomal protein bölmesinin oluşumu (166) ve ribozomal biyogenezdır (168, 169).

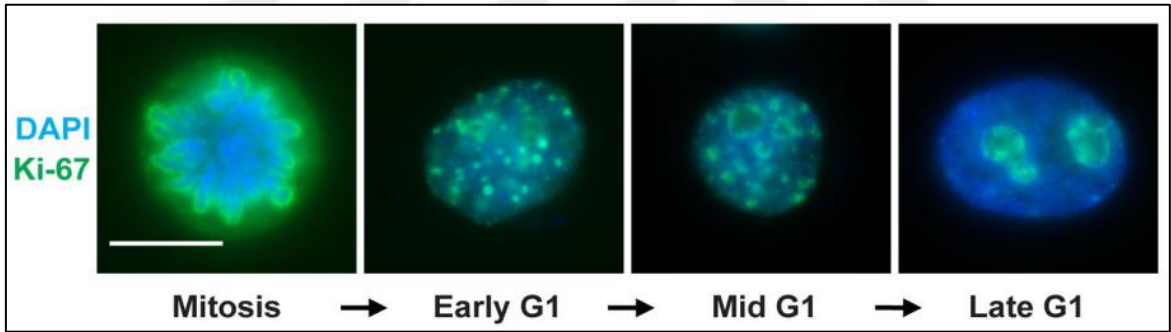


Şekil 2.17. Ki-67'nin hücre döngüsünde mRNA ve protein ifadesi (170)

Hücre döngüsü boyunca takip edildiğinde, Ki-67 hücre çekirdeğinde hücrenin olduğu faza göre farklı kümelenme paternleri göstermektedir. Mitozda proteinin çoğu kromozomların yüzeyine taşınmakta ve anafaz ve telofaz sırasında önemli ölçüde azalmaktadır (171, 172) Proteinin yarı ömrü 90 dakikadır (173). O yüzden protein sentezinin 60 dk. süreyle baskılanması Ki-67 seviyelerinde anlamlı bir düşmeye neden olur (174).

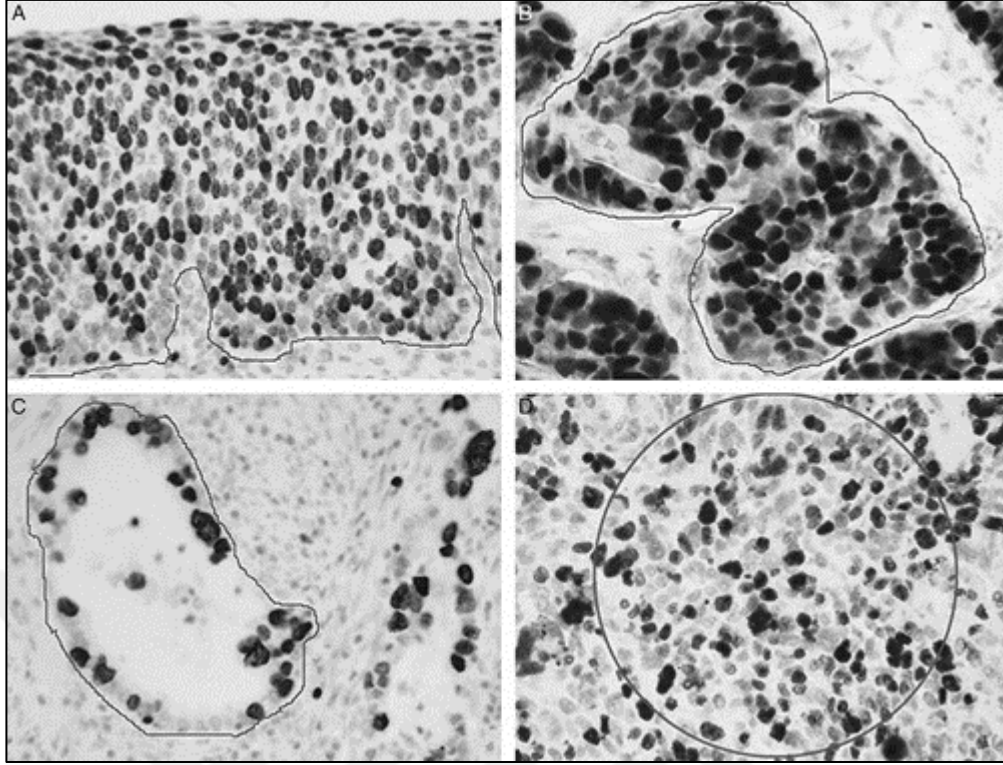


Şekil 2.18. Ki-67 proteinin hücre döngüsünün farklı evrelerinde görünümü (175)



Şekil 2.19. Ki-67 proteinin hücre döngüsünün G1 ve M evrelerinde görünümü (176)

Rutin laboratuvarlarda immünohistokimyasal yöntemlerle boyanarak skorlanan Ki-67'nin, tümör hücre popülasyonu içindeki oranı değerlendirilerek tümör tanı ve takibinde kullanılır (Şekil 2.20). Ki-67 analizi için geliştirilen alternatif görsel ve otomatize metotların çoğunun temelinde Ki-67 pozitif hücrelerin tümör kitlesi (Hot spot) içindeki oranı dikkate alınır. IKWG'nin (International Ki-67 in Breast Cancer Working Group) önerisine göre klinik anlamlılık olarak da %5'in altı ve %30'un üzerindeki değerler klinik karar verilirken anlamlı kabul edilir (177). Aşağıda Ki-67 pozitif hücrelerin bir skorlama örneği görülmektedir.



Şekil 2.20. Çeşitli tümör dokularında Ki-67(IHC) skorlarının yorumlanması.

(A) Servikal CIN III (Ki-67 pozitif oranı %90', (B), Mozaik tipte bir doku örneği (İnfiltratif duktal meme karsinomu)(Östrojen reseptörü pozitif oranı %90, (C) Gastrik tübüler adenokarsinom (Ki-67 pozitif oranı %70), (D) Mezenkimal bir doku (Farklılaşmamış sarkom) (Ki67 pozitif oranı %70) (178)

2.13. Ki-67'nin Meme Kanseri Kliniğindeki Önemi

Ki-67'nin genel olarak meme kanseri tanı ve takibinde nasıl kullanılabileceği, tekniğin sınırlamaları ve testin değerlendirilmesi IKWG tarafından şöyle değerlendirilmiştir:

- 1) Daha fazla adjuvan kemoterapinin gerekli olup olmadığına ilişkin erken evre hastalıkta prognozu tahmin etmek,
- 2) Kemoterapinin aktif olup olmayacağını tahmin etmek,
- 3) Neoadjuvan endokrin veya kemoterapi sırasında veya sonrasında hastaları izlemek ve seçilen rejimin işe yarayıp yaramadığını veya bir alternatifin düşünülmesi gerekip gerekmediğini belirlemek (177)

Ki-67 seviyelerinin önemsendiği diğer konular da rekürrens ve sağkalım süresidir. Yapılan bir korelasyon çalışmasında, Ki-67 seviyelerinin %15'ten yüksek olduğu vakalarda hastaların %30-40'ında nüks gözlemlendiği, Ki-67, %15'in altında olan hastalarda sağkalım süresinin uzadığı bildirilmiştir (179).

Bir diğer çalışmada Luminal A tipi tümörlerin ortalama Ki-67 indeksi %17, luminal B tipi tümörlerin ortalama değeri ise %29 bulunmuştur. HER2 tümörlerinin Ki-67 indeksi %40,

üçlü negatif tümörlerinki ise %50 olarak bildirilmiştir. Daha yüksek Ki-67 indeksi, daha yüksek bir malignite derecesi ile ilişkilendirilmiştir. Ki-67 indeksi daha yüksek olan hastalarda hastalıksız sağkalım (DFS) ve genel sağkalım oranları ise anlamlı derecede düşük tespit edilmiştir. Üstelik rekürrens süresinde de önemli bir fark olduğu bildirilmiştir (180).

Ki-67 indeksinin tümörün boyutu ve lenf nodu metastazı ile ilişkilendirildiği dolayısıyla prognozun gidişatını değerlendiren bir çalışmada da pozitif bir korelasyon bulunmuştur (181).

Çalışmamızda kullanılan MCF-7 hücre hattında Ki-67 pozitifliği %90 civarında bildirilmiştir (182).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hücre Kültürü

Bu çalışmada meme kanseri modeli olarak, ticari satışı yapılan MCF-7 (ATCC Kat No.HTB-22) hücre hattı kullanıldı. Tıbbi Biyoloji A.D. stoklarında, sıvı azotta (-196°C) depolanan MCF-7 hücreleri hızla 37°C 'de çözündürülerek önceden ısıtılmış tam medyum (Dulbecco'nun Modifiye Eagle's Medyumu (DMEM) + %10 fetal sığır serumu (FBS) + %1 Penisilin–streptomisin) çözeltisine alındı. Hücreler %5 karbondioksitli (CO_2) inkübatörde, 37°C 'de 4 saat inkübe edildi. Süre sonunda flastaki DMSO (Dimetil sülfoksit) içeren medyum uzaklaştırılıp yerine taze ısıtılmış medyum eklenerek, hücreler çoğalmak üzere inkübatöre geri konuldu. MCF-7 hücreleri hücre kültürü ile çoğaltılarak, ardışık pasajları deneylerde kullanıldı.

Hücreler düzenli olarak belli aralıklarla invert mikroskopta (Olympus, Tokyo, Japonya) çoğalma ve kontaminasyon için takip edildi. Hücrelerin canlılık ve çoğalma durumuna bakılarak ortalama 2 günlük aralıklarla medyum değişimi ve haftada 1 kez pasaj yapıldı.

Hücrelerin T75 flastın dibinden kaldırılması için %0,25'lik Tripsin-EDTA solüsyonundan 3 ml eklendi ve 8-10 dakika kadar 37°C 'de inkübatörde bekletildi. Mikroskopta hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları ve hücre kümelerinin dağıldığı gözlemlendiğinde taze ısıtılmış tam medyum (1 ml tripsin için en az 5 ml medyum) eklenip, tripsinin etkisi inhibe edildi. Hücre çözeltisi yeni flastlara porsiyonlanıp, üzerlerine son hacim 10-12 ml olacak şekilde taze medyum eklendi. Hücreler mikroskop ile kontrol edildi. Kültür flastları üzerine hücre tipi, pasaj sayısı ve tarih yazılarak, 37°C 'ye CO_2 'li inkübatöre kaldırıldı.

3.2. Çalışma Grupları

Çalışmada iyot uygulama grupları ile birlikte 8 grup belirlenmiş ve aşağıda verilmiştir:

Grup 1: Kontrol grubu

Grup 2: Alkol grubu (Final konsantrasyonu % 1,2)

Grup 3: 1 mM I_2 grubu

Grup 4: 2 mM I_2 grubu

Grup 5: 3 mM I_2 grubu

Grup 6: 1 mM I₂+KI grubu

Grup 7: 2 mM I₂+KI grubu

Grup 8: 3 mM I₂+KI grubu

3.3. İyot Uygulamaları

Proje teklifi verildiğinde iyodun iki formunun kullanılacağı bildirilmiştir. İyodür (I₂) ve I₂+Potasyum İyodür (KI) karışımı.

Proje teklifinde verilen iyot dozları 10-20 mmol/L= 10-20 mM dir.

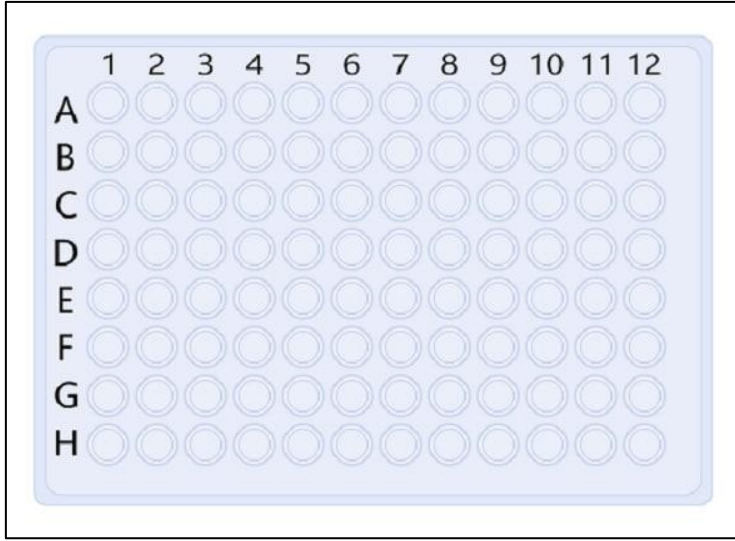
İlk MTT denemelerinde yukarıdaki iyot dozları uygulanmış ancak çok yüksek oranda hücre ölümüne sebep olduğu için daha düşük dozlarla MTT deneyleri tekrar edilmiştir.

- İyodun kütle numarası 126,90477 g/mol, moleküler ağırlığı (I₂) ise 253,81 dir.
- I₂ stok çözeltisi 250 mM olarak etanolde çözülerek hazırlandı.
- Potasyum İyodür (KI) moleküler ağırlığı 166,00 dir.
- KI stok çözeltisi 250 mM olarak distile suda hazırlandı.

Çalışmamızda I₂+KI uygulanacak kuyucuklara yukarıda verilen iyot ve potasyum iyodür çözeltilerinden eşit miktarlarda konularak hedeflenen konsantrasyon elde edilmeye çalışıldı.

3.4. MTT

MTT deneyi, MTT (3-(4,5-dimetil tiazol-2-yl)-difeniltetrazolyum bromid) bileşiğinin tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi özelliğine dayanır. MTT canlı hücreler tarafından absorbe edilir ve mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Bu reaksiyon yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde gerçekleşir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilir ve oluşan renk spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda ölçülerek yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir. MTT deneyi için kullanılan 96 kuyucuklu kültür plağının numaralandırılması (Şekil 3.1) aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.1. MTT deneyinde kullanılan 96 kuyucuklu kültür plağının numaralandırılması

Deneyde kullanılan çözeltiler

1. MTT (PBS (Phosphate buffered saline) içinde 5 mg/ml) Final Kons.0,5 mg/ml
 2. DMSO
 3. Glisin Tamponu
NaCl molekül ağırlığı 58,443 g/mol
Glisin molekül ağırlığı 75,07 g/mol
- NaCl ve Glisin final kons.100 mM olarak distile suda çözüldü.
pH:10,5 olacak şekilde NaOH eklenerek final hacmi 10 ml ye tamamlandı.

Çalışmada iyot uygulaması biten hücre kültür plaklarında her kuyucuğa 110 µL MTT (10 µL MTT + 100 µL Tam Medyum) çözeltisi (Sigma-Aldrich M2128, ABD), eklenerek 2 saat süreyle CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda MTT çözeltisi kuyucuklardan aspire edilerek yerine 200 µL DMSO ve 25 µL glisin tampon çözeltisi eklendi. Kuyucukların optik dansisiteri (OD) mikroparka okuyucuda (Thermo MultiskanGo, ABD) 570 nm dalga boyunda okutuldu. Hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

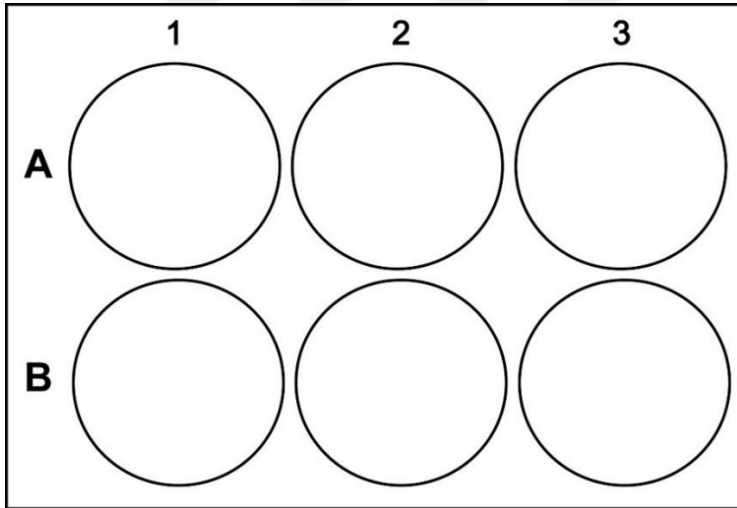
$$\text{Hücre Proliferasyonu} = \frac{\text{OD test} - \text{OD Blank}}{\text{OD Kontrol} - \text{OD Blank}} \times 100$$

3.5. Migrasyon Deneyi

İyot ve I_2+KI 'ın hücre migrasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için wound healing (yara iyileşme) deneyi kullanıldı. Bu amaçla, MCF-7 hücreleri, 6 kuyucuklu kültür plaklarına ekildi ve kuyucukların %90-95'lik doluluk oranına ulaşması beklendi. Daha sonra kuyucuklardan medyumlar aspire edilerek steril 200 μ L'lik bir pipet ucu ile kuyucuklar dikey olarak çizildi. Hücre artıklarını uzaklaştırmak amacıyla kuyucuklar steril ve ısıtılmış PBS ile yıkandı. Kontrol grubu için normal tam medyum, diğer kuyucuklar için de 1, 2 ve 3 mM iyot çözeltileri içeren medyum ilave edilerek, kuyucukların 0.saat mikroskop görüntüleri alındı. Hücreler 24 saat boyunca iyot çözeltilerine maruz bırakıldı. 24. saat görüntüleri alınırken iyot gruplarında yüksek oranda hücre kaybı gözlemlendiğinden deney 24. saatte sonlandırıldı ve 24. saat görüntüleri alındı. Çizim alanlarında ImageJ.1.47 görüntüleme programı ile ölçüm yapılarak sonuçlar kaydedildi.

3.6 Koloni Formasyon Deneyi

Koloni formasyon deneyi için kullanılan 6 kuyucuklu plakanın numaralandırılması aşağıda verilmiştir. (Şekil 3.2)



Şekil 3.2. 6 kuyucuklu deney plakası

Kristal Viyole çözeltisi (%0,5'lik)

1. Kristal viyole 0,5 g. (Sigma Aldrich)
2. Metil alkol (% 96) 20 mL.
3. Distile su 80 mL.

Her deney grubu için 6 kuyucuklu kültür plaklarına, her kuyuya yaklaşık 50 hücre/ml olacak şekilde hücre ekildikten sonra 1 gece süre ile hücrelerin yapışması beklendi. Süre sonunda 1, 2

ve 3 mM I₂ ve I₂+KI uygulamaları yapıldı. Hücreler 48 saat süre ile 37°C de inkübe edildi. 48 saat sonunda iyotlu medyumlar aspire edilerek kuyucuklara taze medyum eklendi. 14 gün boyunca hücrelerin 3 günde bir besiyerleri değiştirilerek inkübe edildi. On dört günün sonunda kontrol kuyucuklarındaki koloniler değerlendirilebilir hacme ulaşınca tüm kültürler sonlandırıldı. Kolonilerin boyanması için kuyucuklar 1x PBS ile 3 kez yıkandı. Devamında fiksasyon için hücreler -20°C’de soğutulmuş 1:3 oranında asetik asit-metanol çözeltisi ile 20 dakika muamele edildi. Fiksasyon uygulaması bittikten sonra kuyucuklara 1 ml %0,5’lik kristal viyole çözeltisi eklendi. 15 dakika boyunca karışımında tutulan hücreler, su ile yavaşça yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Minimum elli hücreden oluşan gruplar koloni olarak kabul edildi ve mikroskopta sayımları gerçekleştirildi.

3.7. 3D Sferoid Kültürü

3D kültürün ilk denemesinde 24 saatlik drop kültür yapıldı. Proje teklifinde verilen ilk iyot dozları (10 mmol/L ve 20 mmol/L) kullanıldı. Deney sonucunda hücre agregasyonu yeterli bulunmadığından agaroz kaplama yapılarak 96 kuyucuklu kültür plaklarında deneyin tekrar gerçekleştirilmesine karar verildi. Her iki dozda da MTT sonuçları ile uyumlu ve hücre ölümüne bağlı olarak sferoid oluşumunun bozulduğu gözlemlendi.

Sonraki aşamada MTT sonucunda karar verilen 1, 2 ve 3 mM dozlara geçildi. Bu deneyde 96 kuyucuklu plaklarda her kuyucuk %0,75 agaroz ile (Kuyu başına 50 µL) kaplandıktan sonra yarım saat süre ile UV ışık altında steril edildi. Süre sonunda kuyucuklara belirlenen dozlarda iyot eklenmiş medyumlar içinde hücre süspansiyonları eklendi. Kültür plakları CO₂’li inkübatöre kaldırıldı. 48. saat sonunda her kuyucuktan görüntü alındı ve görüntülerde sferoidin kapladığı alan ve yoğunluğu Zen yazılımı yardımıyla hesaplanarak kaydedildi.

3.8. Ki-67 İmmün floresan Boyama

İmmün floresan boyada kullanılan çözeltiler:

1. %2'lik PFA (Parafolmaldehit) çözeltisi

1gr PFA 50 ml 1xPBS de çözülerek hazırlandı. (Çözeltide tortu kalmaması için ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 65-70°C' de çözünmesi sağlandı.)

2. Permeabilizasyon çözeltisi

%1 BSA (Bovine serum albumin), %0,5 Triton-X 100 içerecek şekilde, 1xPBS ile çözülerek hazırlandı.

3. Bloklama çözeltisi

%5 BSA içerecek şekilde, 1xPBS ile çözülerek hazırlandı.

4. Ki-67 Antikor Alexa Fluor®488, sc-23900AF488 (Santa Cruz)

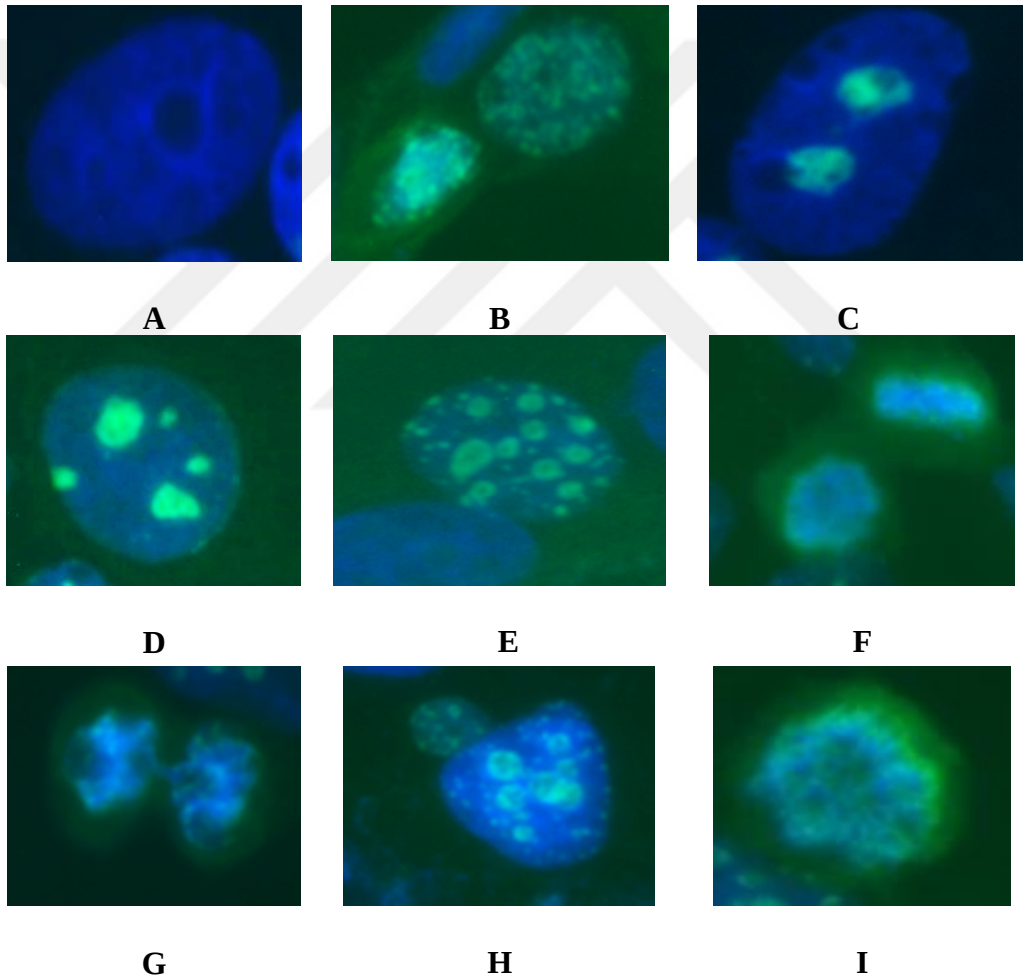
%5 BSA içerisinde 1:100 oranında hazırlanarak kullanıldı. (Optimizasyon deneyleri sonucunda bu orana karar verilmiştir)

Her deney grubu için 6 kuyucuklu kültür plaklarının her bir kuyucuğuna steril lamel yerleştirilip Lameller %1 poli-L-lizin ile muamele edildi. Lizin uygulamasından sonra plakalar UV ışık altında tekrar steril edildi. Her kuyucuğa hücre ekimleri yapıldıktan sonra hücreler çoğalmak üzere inkübatöre geri konuldu. Kuyucuklarda %60-70 doluluğa ulaşıldıktan sonra kuyucuklara belirlenen dozlarda iyot çözeltileri eklenmiş medyumlar konuldu. Kültürlere 24 saat iyot muamelesi yapıldı. 24.saat sonunda aşağıdaki prosedüre göre immün floresan boyama basamakları gerçekleştirildi:

1. Tüm kuyucuklardan medyumlar uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklar 1xPBS ile 3 kez yıkandı, PBS bekletilmeden hemen aspire edildi.
2. Hücreler %2'lik PFA ile 20 dk oda ısısında muamele edildi.
3. Ardından kuyucuklar PBS ile yıkandı (3 x5 dk).
4. Sonrasında hücreler 10 dk permeabilizasyon çözeltisinde oda ısısında bekletildi.
5. Karışım aspire edildi ve kalıntılardan arındırmak amacıyla kuyucuklar (3x5 dk) PBS ile yıkandı.
6. Bloklama için kuyucuklara %5 BSA eklendi ve 30 dk süre ile oda ısısında bekletildi.
7. Bloklama bitince kuyucuk başına 100 µL dilüe edilen antikor eklendi. 3 saat süre ile karanlık odada kapalı bir kutu içinde bekletildi.

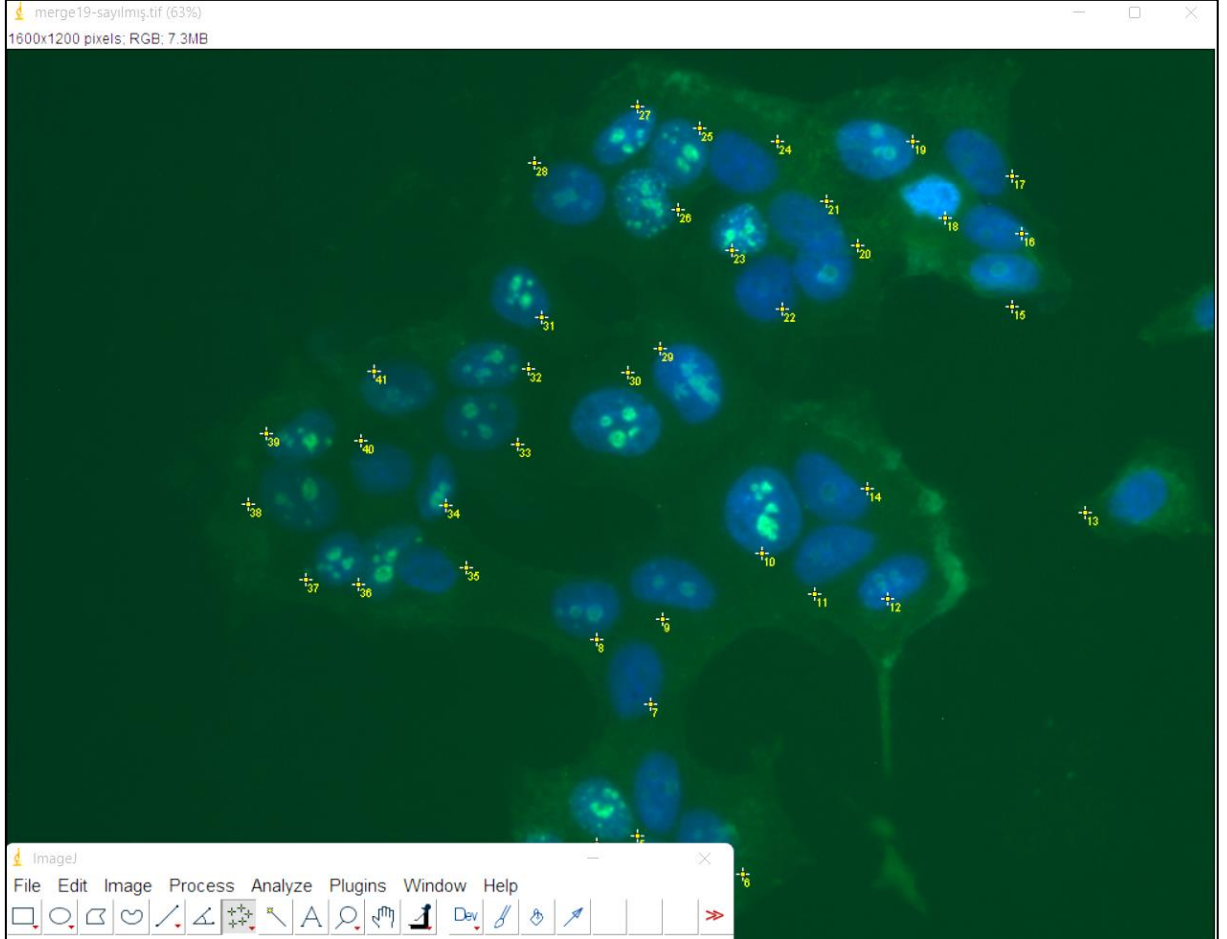
8. Süre sonunda kuyucuklar 1xPBS ile 2 kez yıkandı ve bekletilmeden aspire edildi.
9. Lameller kurumadan 1 damla (Yaklaşık 20 μ L) DAPI damlatılan lamin üzerine kuyucuklarda bulunan ve üzerinde hücrelerin yapışık olduğu lameller ters çevirilerek tırnak cılası ile kenarları kapatıldı.
10. Karanlık odada floresan mikroskopta örneklerin görüntüleri kamera yardımı ile alınarak kaydedildi ve örnek başına en az 100-500 hücre değerlendirildi.

İmmün floresan skorlamada hiçbir şekilde boyanmayan (A) hücre çekirdekleri Ki-67 negatif, çeşitli kompozisyonlarda floresan boyanan (B, C, D, E, F, G, H, I) hücre çekirdekleri Ki-67 pozitif olarak değerlendirildi. Aşağıda örnek görseller verilmiştir.



Şekil 3.2. IF skortlama

Sonuçlar iki tekrarın aritmetik ortalamaları alınarak verilmiştir. Ayrıca hücre sayımlarında hata olasılığını en aza indirgenmek için ImageJ programında (Şekil 3.3) hücreler tek tek sayılarak hücre sayıları belirlenmiştir.



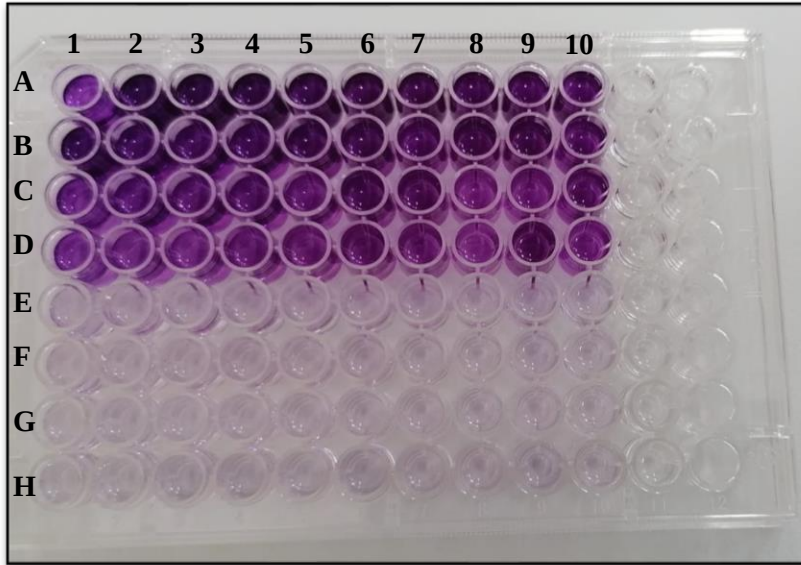
Şekil 3.3. Image J programında hücre sayımı

4. BULGULAR

4.1. MTT

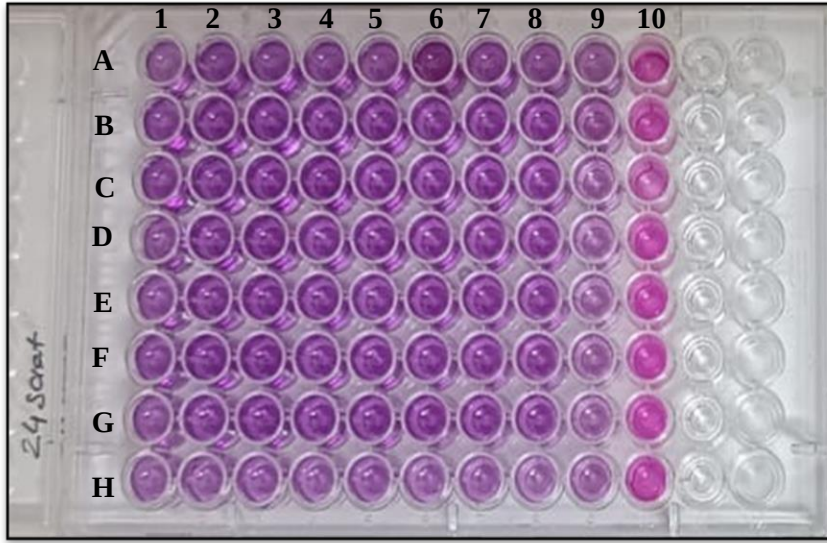
1.tur MTT

MCF-7 hücreleri 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekilerek gece boyunca hücrelerin yapışması için beklendi. Kültür plakları 24 saat ve 48 saat olarak etiketlendi. Projede verilen 10 mmol/L ve 20 mmol/L denemeleri yapıldı. Her iki dozda da hücre ölümü yüksek oranda gözlemlendi. Deney görseli (Şekil 4.1) aşağıda verilmiştir.

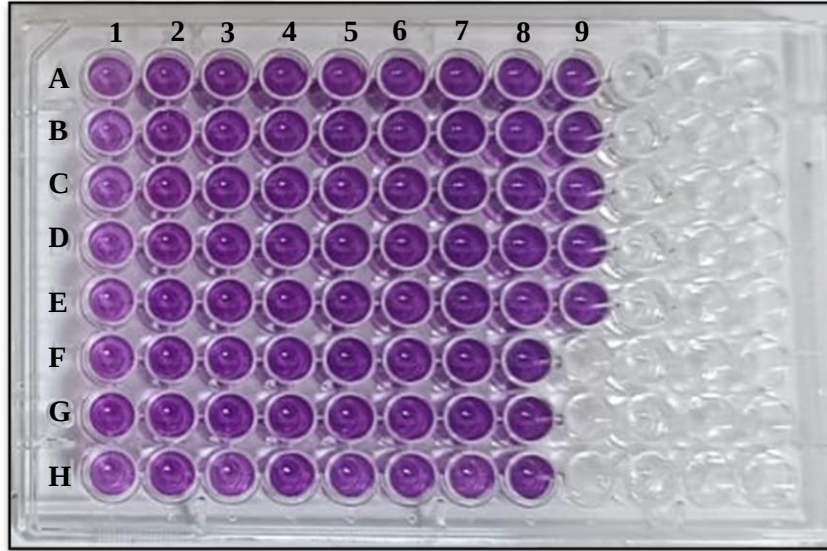


Şekil 4.1. MTT 10 mmol/L ve 20 mmol/L deneme (24 saat) Yukarıdan Aşağı (A. Kontrol, B. Alkol (%2), C. 10 mmol/L KI, D. 20 mmol/L KI, E.10 mmol/L I₂, F. 20 mmol/L I₂, G. 10 mmol/L I₂+KI, H. 20 mmol/L I₂+KI)

İlk deneyde yüksek oranda hücre ölümü gözlemlendiğinden deneyler 100, 200 ve 400 μ M dozlar ile 24 ve 48 saat olmak üzere tekrar yapıldı. Deney görseli aşağıda verilmiştir. (Şekil 4.2)



A. 24. Saate ait MTT deneyi uygulama plakası

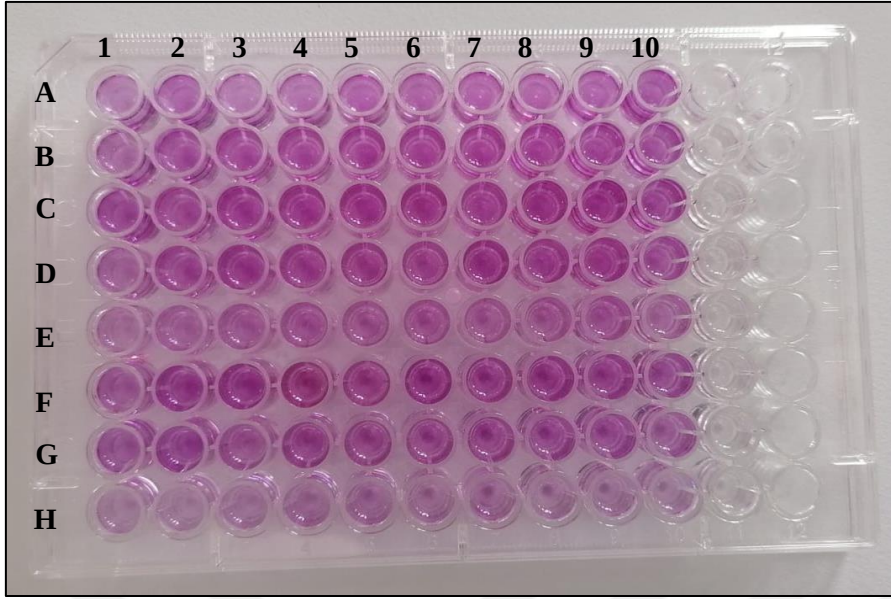


B. 48.saate ait MTT deneyi uygulama plakası

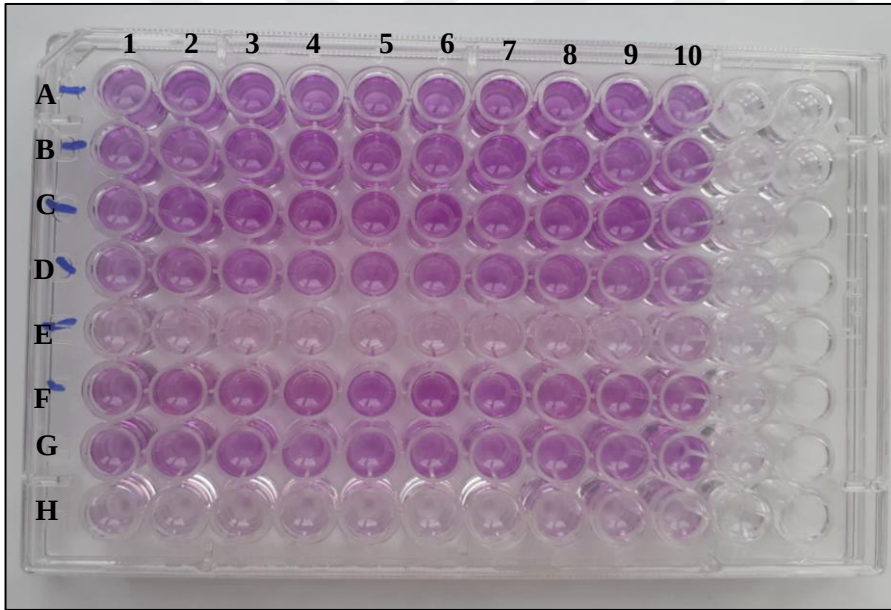
Şekil 4.2. MTT 24 (A) ve 48 saat (B) Soldan sağa 1.Kontrol, 2. Alkol (%0,8), 3. 100 μ M I₂, 4. 200 μ M I₂ 5. 400 μ M I₂ 6. 100 μ M I₂+KI 7. 200 μ M I₂+KI 8. 400 μ M I₂+KI

Bu deney sonucunda da iyot uygulanan kuyucuklarda hücre sayısında herhangi bir azalma gözlenmemesi sebebiyle bu dozların hücre proliferasyonunu inhibe edici etkisinin olmadığına karar verildi.

Bir sonraki adımda 1, 2 ve 3 mM dozların denenmesine geçildi. MCF-7 hücrelerine final konsantrasyonu 1, 2 ve 3 mM olan I₂ ve I₂+KI içeren medyum eklenip, plaklar 24 saat ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. Deney görselleri aşağıda verilmiştir. (Şekil 4.3)



A. 24. Saate ait MTT deneyi uygulama plakası



B. 48.saate ait MTT deneyi uygulama plakası

Şekil 4.3. MTT 24 (A) ve 48 saat (B) Yukarıdan aşağıya 1.Kontrol, 2. Alkol (%0,8), 3. 1mM I₂, 4. 2 mM I₂, 5. 3 mM I₂, 6.1mM I₂+KI, 7. 2mM I₂+KI,8. 3mM I₂+KI

Elisa cihazında 570 nm’de okutulan kültür plaklarından elde edilen ölçüm sonuçları SPSS programında Levene testi ile normal dağılıma uyup uymadığı analiz edilmiş verilerin normal dağılıma uyduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$). Gruplar arasında fark olup olmadığı One Way ANOVA testi ile test edilmiş ve POST-HOC analizleri aşağıda tablo olarak verilmiştir. (Tablo 3.2)

Tablo 4.1. MTT deneyi 24. ve 48.saat POST-HOC analizleri

24 saat sonuçları		
Deney Grubu	Karşılaştırma Grubu	P
Kontrol	Alkol	,976
	1mM I ₂	,383
	2mM I ₂	1,000
	3 mM I ₂	,001
	1 mM I ₂ +KI	,996
	2 mM I ₂ +KI	,515
	3 mM I ₂ +KI	,000
Alkol	1mM I ₂	1,000
	2mM I ₂	1,000
	3 mM I ₂	,000
	1 mM I ₂ +KI	1,000
	2 mM I ₂ +KI	,011
	3 mM I ₂ +KI	,000
1mM I₂	2mM I ₂	,750
	3 mM I ₂	,000
	1 mM I ₂ +KI	1,000
	2 mM I ₂ +KI	,000
	3 mM I ₂ +KI	,000
2mM I₂	3 mM I ₂	,000
	1 mM I ₂ +KI	1,000
	2 mM I ₂ +KI	,172
	3 mM I ₂ +KI	,000
3 mM I₂	1 mM I ₂ +KI	,000
	2 mM I ₂ +KI	,000
	3 mM I ₂ +KI	,002
1 mM I₂+KI	2 mM I ₂ +KI	,023
	3 mM I ₂ +KI	,000
2 mM I₂+KI	3 mM I ₂ +KI	,000

48 saat sonuçları		
Deney Grubu	Karşılaştırma Grubu	P
Kontrol	Alkol	1,000
	1mM I ₂	1,000
	2mM I ₂	,175
	3 mM I ₂	,000
	1 mM I ₂ +KI	1,000
	2 mM I ₂ +KI	,005
	3 mM I ₂ +KI	,000
Alkol	1mM I ₂	,694
	2mM I ₂	,607
	3 mM I ₂	,000
	1 mM I ₂ +KI	1,000
	2 mM I ₂ +KI	,023
	3 mM I ₂ +KI	,000
1mM I₂	2mM I ₂	,000
	3 mM I ₂	,000
	1 mM I ₂ +KI	1,000
	2 mM I ₂ +KI	,000
	3 mM I ₂ +KI	,000
2mM I₂	3 mM I ₂	,000
	1 mM I ₂ +KI	,016
	2 mM I ₂ +KI	1,000
	3 mM I ₂ +KI	,000
3 mM I₂	1 mM I ₂ +KI	,000
	2 mM I ₂ +KI	,000
	3 mM I ₂ +KI	1,000
1 mM I₂+KI	2 mM I ₂ +KI	,000
	3 mM I ₂ +KI	,000
2 mM I₂+KI	3 mM I ₂ +KI	,000

24. saat sonrası değerlendirme

Kontrol grubu ile 3 mM I₂ ve 3 mM I₂+KI grupları arasında anlamlı derecede bir fark bulunmuştur. (p<0.05)

Alkol grubu ile 3 mM I₂ ve 2,3 mM I₂+KI grupları arasında anlamlı derecede bir fark bulunmuştur. (p<0.05)

1 mM I₂ grubu ile 3 mM I₂ ve 2,3 mM I₂+KI grupları arasında anlamlı derecede bir fark bulunmuştur. (p<0.05)

2 mM I₂ grubu ile 3 mM I₂ ve 3 mM I₂+KI grupları arasında anlamlı derecede bir fark bulunmuştur. (p<0.05)

3 mM I₂ ile diğer tüm gruplar arasında anlamlı derecede bir fark bulunmuştur. (p<0.05)

1 mM I₂+KI grubu ile 3 mM I₂ ve 2,3 mM I₂+KI grupları arasında anlamlı derecede bir fark bulunmuştur. (p<0.05)

2 mM I₂+KI grubu ile alkol, 1,3 mM I₂ ve 1,3 mM I₂+KI grupları arasında anlamlı derecede bir fark bulunmuştur. (p<0.05)

3 mM I₂+KI ile diğer tüm gruplar arasında anlamlı derecede bir fark bulunmuştur. (p<0.05)

48. saat sonrası değerlendirme

Kontrol grubu ile 3 mM I₂ ve 2,3 mM I₂+KI grupları arasında anlamlı derecede bir fark bulunmuştur. (p<0.05)

Alkol grubu ile 3 mM I₂, 2 mM I₂+KI ve 3 mM I₂+KI grupları arasında anlamlı derecede bir fark bulunmuştur. (p<0.05)

1 mM I₂ grubu ile 2,3 mM I₂ ve 2,3 mM I₂+KI grubu arasında anlamlı derecede bir fark bulunmuştur. (p<0.05)

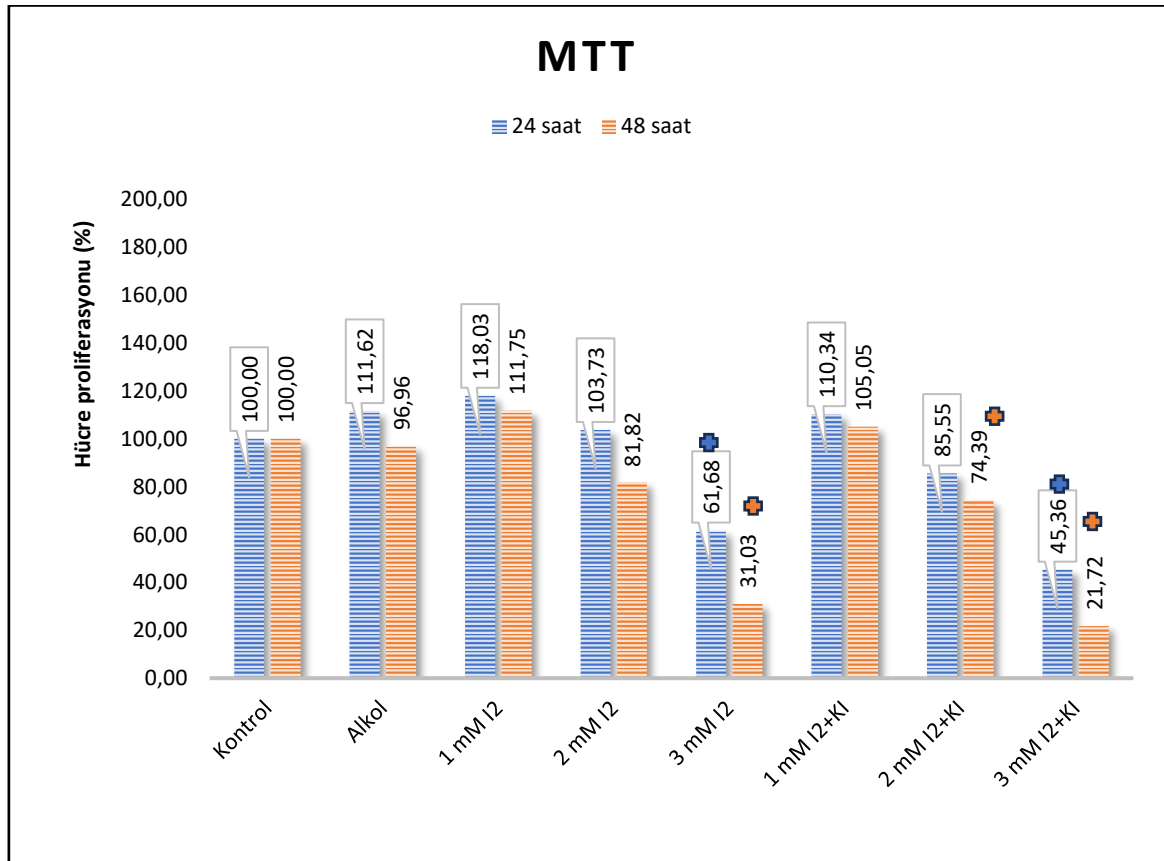
2 mM I₂ grubu ile 1,3 mM I₂ ve 1,3 mM I₂+KI grupları arasında anlamlı derecede bir fark bulunmuştur. (p<0.05)

3 mM I₂ ile diğer tüm gruplar arasında anlamlı derecede bir fark bulunmuştur. (p<0.05)

1 mM I₂+KI grubu ile 2,3 mM I₂ ve 2,3 mM I₂+KI grupları arasında anlamlı derecede bir fark bulunmuştur. (p<0.05)

2 mM I₂+KI grubu ile 2 mM I₂ dışındaki tüm gruplar ile arasında anlamlı derecede bir fark bulunmuştur. (p<0.05)

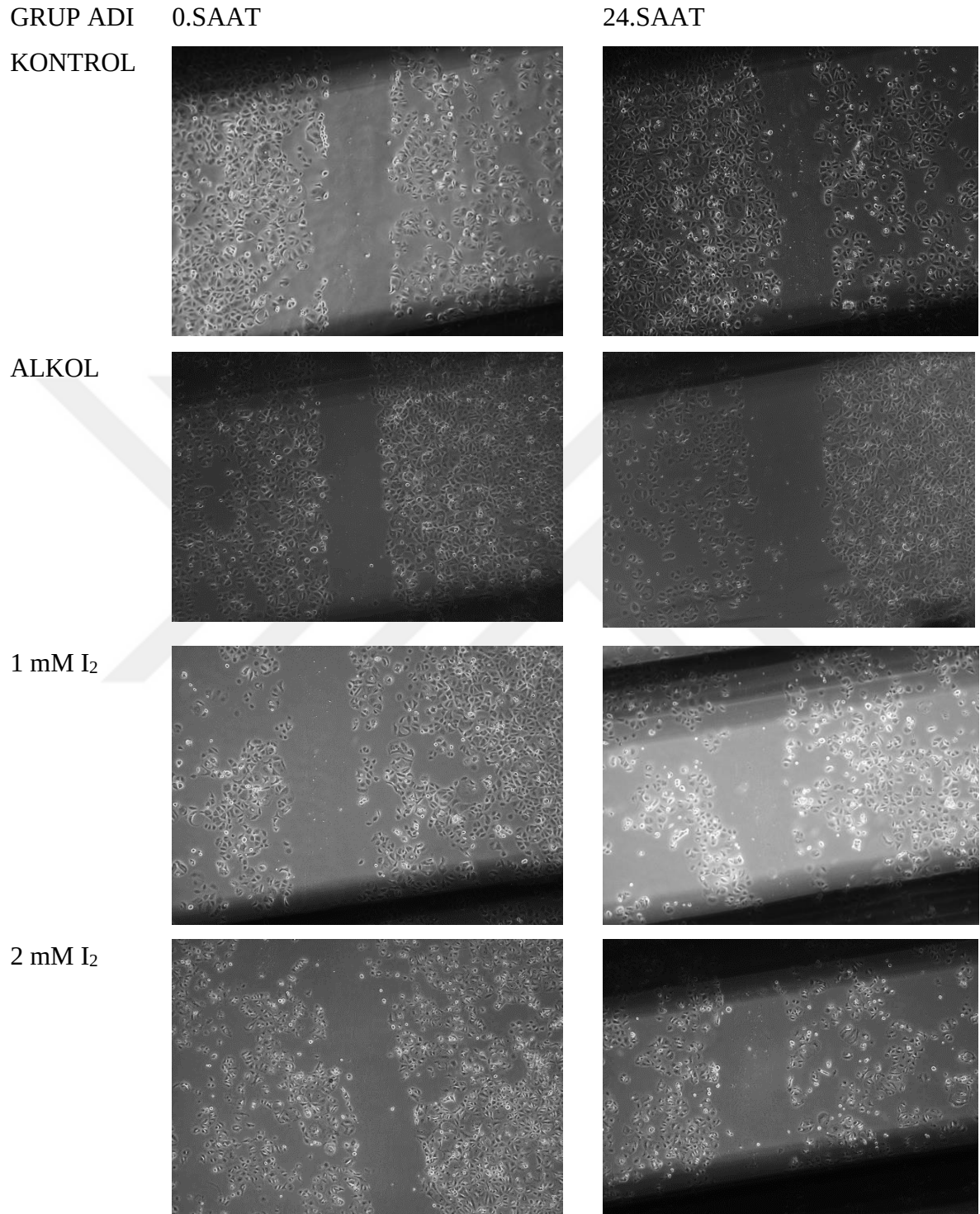
3 mM I₂+KI grubu ile 3 mM I₂ dışında diğer tüm gruplar arasında anlamlı derecede bir fark bulunmuştur. (p<0.05)



Şekil 4.4. MTT deney sonuçlarına göre hücre canlılığı (%) oranları

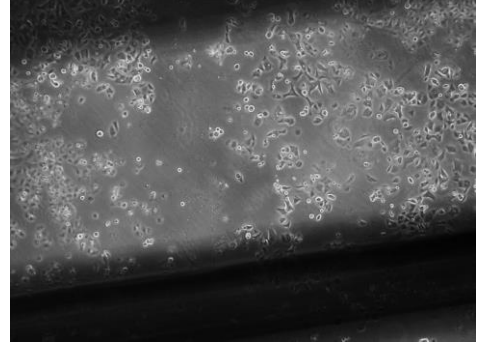
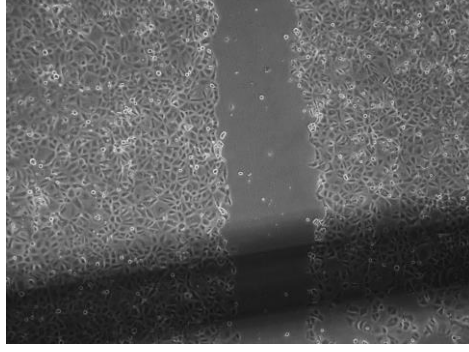
MTT analizlerinden elde edilen bulgulardan yola çıkılarak, kontrol grubundaki hücrelerin canlılık oranları %100 kabul edildiği bir durumda (24 ve 48 saatler ayrı ayrı değerlendirilmiştir), farklı dozlarda iyot (I₂ ve I₂+KI) uygulanan hücrelerin verileri kontrol grubu verileri ile kıyaslanarak elde edilen her bir doza karşılık % hücre canlılık oranları Şekil 4.4'te sunulmuştur.

4.2.Migrasyon Deneyi

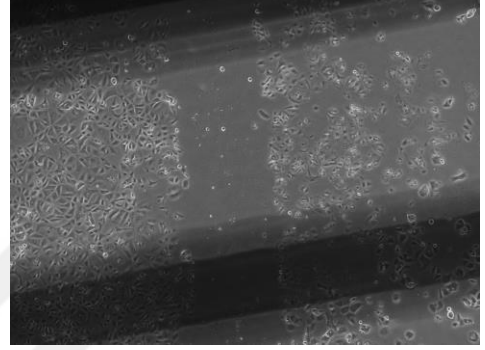
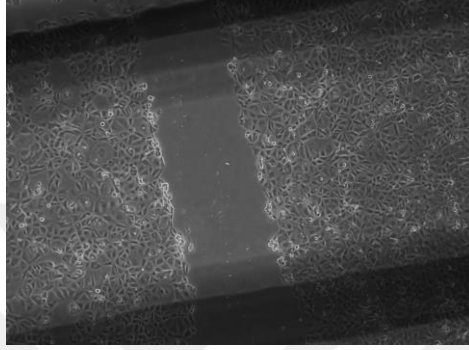


Şekil.4.5. 0.saat ve 24.saatte Migrasyon deney plakalarına ait invert mikroskop görüntüleri

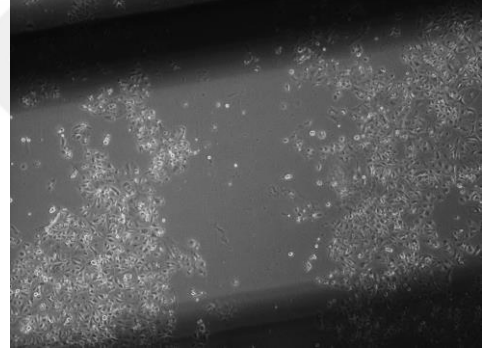
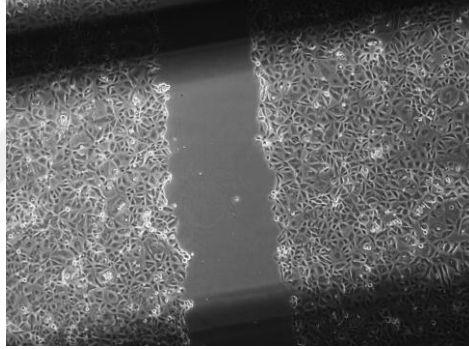
3 mM I₂



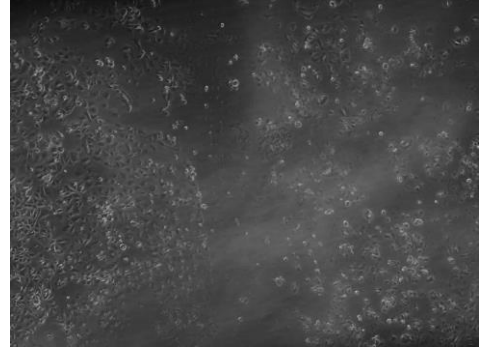
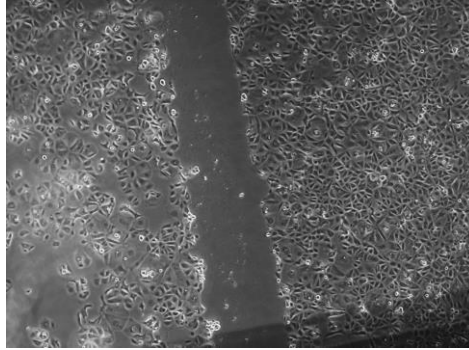
1 mM I₂+KI



2 mM I₂+KI



3 mM I₂+KI



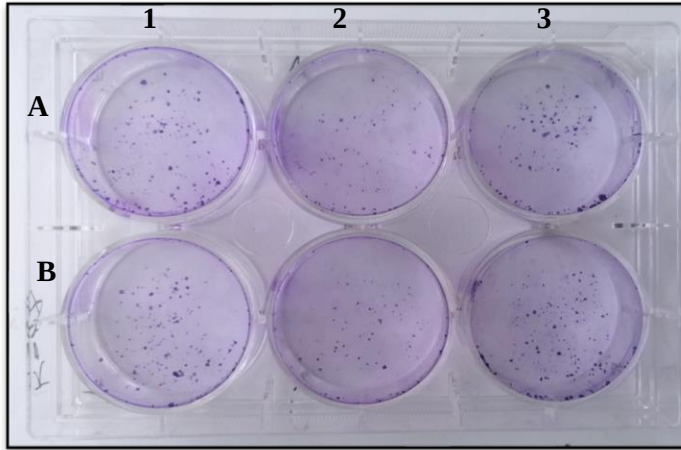
Şekil.4.5. (Devam) 0.saat ve 24.saatte Migrasyon deney plakalarına ait invert mikroskop görüntüleri

Deney görselleri üzerinde Image J programı kullanılarak çeşitli noktalardan 0.saatte iki nokta arası mesafe ölçümü yapılmıştır. Aynı noktalardan 24.saatte de ölçümler yapılmış ancak yüksek iyot dozlarında aşırı düzeyde hücre kaybı meydana geldiğinden çizim alanlarında, kenarlarda yoğun d zensizle meler gözlenmiştir. Her noktada eşit olmayan bu hücre kayıpları bu analizin sağlıklı değerlendirilmesini olanaksız hale getirmiştir. Ancak bu bulgu iyot uygulamasının hücre çoğalmasını engelleyerek değil de hücreleri  l me sürükleyerek sayısal bir azalmaya neden olduğu yönündeki fikrimizi güçlendirmiştir.

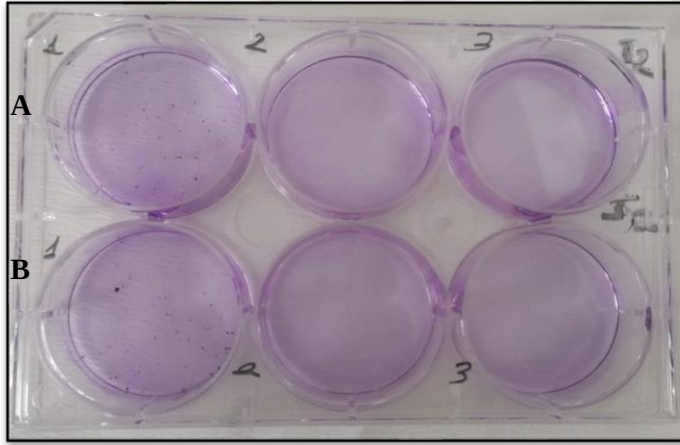
Denedi imiz mineralin toksik bir mineral olması ve hücre ölümü gerçekleştirmesi nedeniyle migrasyon deneyinin bu hücreler için pratikte kullanmaya uygun bir yöntem olmadığına karar verdik.



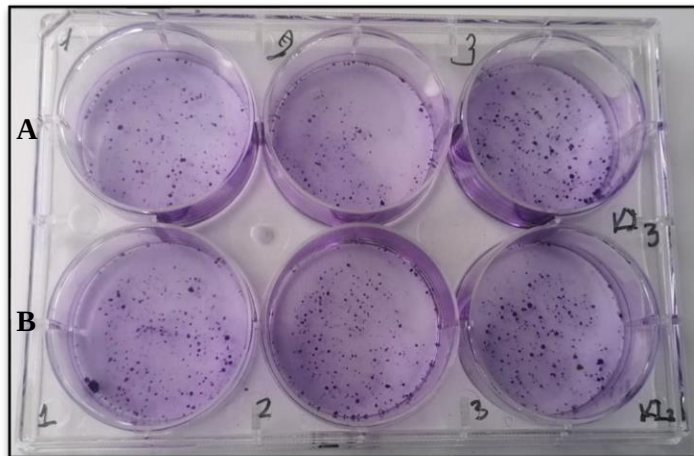
4.3.Koloni Formasyon Deneyi



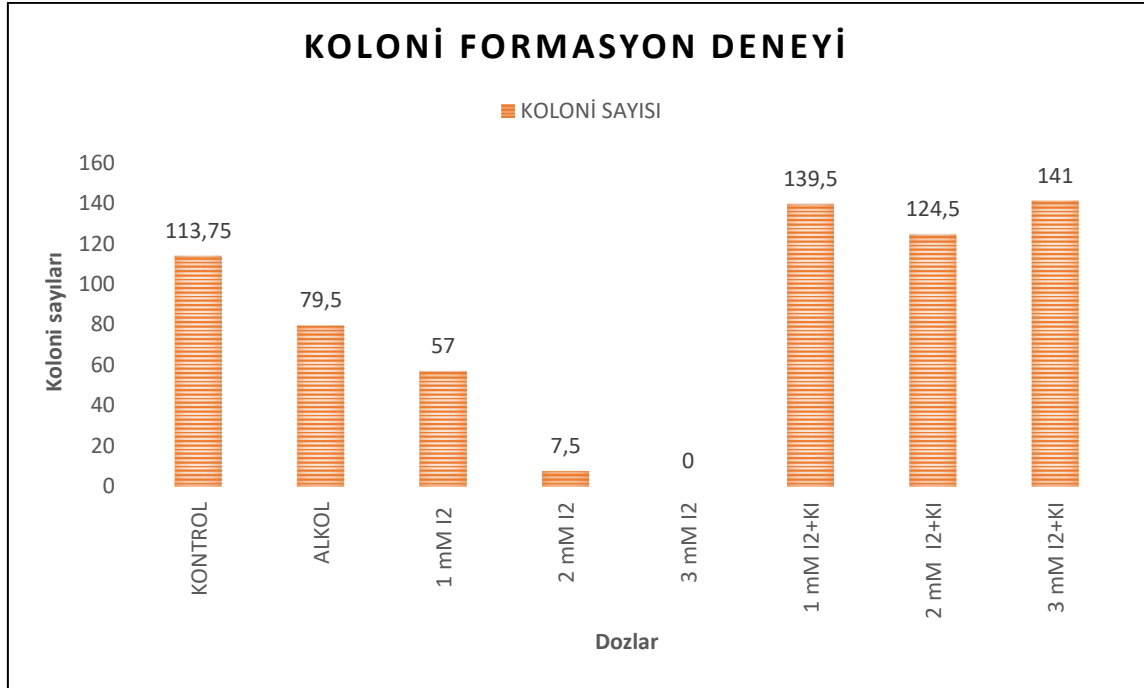
Şekil.4.6. A1, B1, A3 ve B3 kuyucukları kontrol grubuna, A2 ve B2 kuyucuğu alkol grubuna aittir.



Şekil 4.7. A1ve B1 kuyucukları 1mM I₂, A2 ve B2 kuyucukları 2mM I₂, A3 ve B3 kuyucukları 3mM I₂ grubuna aittir.



Şekil 4.8. A1ve B1 kuyucukları 1mM I₂+KI, A2 ve B2 kuyucukları 2mM I₂+KI, A3 ve B3 kuyucukları 3mM I₂+KI grubuna aittir.



Şekil 4.9. Koloni formasyon deneyinin sonuçları

Koloni formasyon deneylerinin sonucunda kontrol grubunda (n=3) ortalama 113 koloni sayılırken, iyot uygulamalarında (n=2) doza bağımlı bir düşüş gözlenmiştir. Ancak 3 mM I₂'de canlı kalan hücreler gözlense de koloni oluşumu saptanmamıştır. I₂+KI deney gruplarında (n=2) ise hücrelerin her üç dozda da kontrol grubuna oranla daha çok koloni oluşturduğu gözlenmiştir. Bu durum potasyum iyodür ile birlikte kullanılan iyodun koloni formasyonda inhibe edici etkisinin ortadan kaybolduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

4.4. 3D Sferoid Kùltürler

Üç boyutlu sferoid kùltürler (3D) kanser araştırmalarında 3 boyutlu tümör gelişimini daha iyi yansıttığı için sıklıkla tercih edilen bir analiz yöntemidir. Çünkü kanser hücreleri tümörü oluştururken üç eksen de çoğalma gösterirler. Bizim çalışmamızda da meme tümörlerinin üç boyutlu çoğalmasını taklit etmek amacıyla MCF-7 hücrelerinin de 3D kùltürleri yapılmıştır. 48 saat iyotlu çözelti içinde inkübe edilen hücrelerin sferoid oluşturma kabiliyetleri, mikroskop görüntülerinde sferoidlerin alan ve yoğunlukları ölçülerek değerlendirilmiştir.

Elde edilen ölçüm sonuçları SPSS programında normal dağılıma uygunluk açısından Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testi ile analiz edilmiştir. Her iki testte de verilerin genellikle normal dağılıma uygun olduğu ancak Kolmogorov-Smirnov testinde sadece yoğunluk ölçümlerinde Kontrol grubunun verilerinde normal dağılım gözlenmediği tespit edilmiştir. ($p=0,008$) Shapiro-Wilk testinde alan ölçümlerinde 1 mM I_2 ($p=0,043$) ve yoğunluk ölçümlerinde Kontrol grubunun ($p=0,007$) verilerinin normal dağılıma uymadığı tespit edilmiştir.

Grup karşılaştırmaları için bağımsız örneklerde Kruskal-Wallis testi yapılmıştır. Sonuçlar aşağıda sırasıyla verilmiştir.

Alan ölçümleri sonucunda;

Kontrol ile 2 mM I_2 grupları arasında anlamlı derecede fark vardır. ($p<0.05$)

Kontrol ile 3 mM I_2 grupları arasında anlamlı derecede fark vardır. ($p<0.05$)

Kontrol ile 3 mM I_2 +KI grupları arasında anlamlı derecede fark vardır. ($p<0.05$)

Alkol grubu ile 2 mM I_2 grubu arasında anlamlı derecede fark vardır. ($p<0.05$)

Alkol grubu ile 3 mM I_2 grubu arasında anlamlı derecede fark vardır. ($p<0.05$)

Alkol grubu ile 3 mM I_2 +KI grubu arasında anlamlı derecede fark vardır. ($p<0.05$)

1 mM I_2 +KI ile 2 mM I_2 grupları arasında anlamlı derecede fark vardır. ($p<0.05$)

1 mM I_2 +KI ile 3 mM I_2 grupları arasında anlamlı derecede fark vardır. ($p<0.05$)

1 mM I_2 +KI ile 2 mM I_2 +KI grupları arasında anlamlı derecede fark vardır. ($p<0.05$)

1 mM I_2 +KI ile 3 mM I_2 +KI grupları arasında anlamlı derecede fark vardır. ($p<0.05$)

Alan ölçümleri için yapılan istatistik test sonuçlarına göre moleküler iyot ve I₂+KI uygulamalarının 2 mM ve 3 mM dozlarda kontrol grubuna göre sferoid alanında anlamlı değişikliğe yol açtığı gözlenmiştir. Sferoid alanındaki artışın iyot etkisiyle ana tümör kitlesinden kopan hücrelerin etrafa yayılmasıyla gerçekleştiği düşünülmüştür.

Çözücü olarak kullanılan alkolün de kontrol grubuna benzer kıyaslama sonuçları verdiği ve böylece alkolün bu deneyde sıra dışı bir moleküler bir etkisinin olmadığı kanaatine varılmıştır.

Yoğunluk ölçümleri için grup karşılaştırmaları bağımsız örneklerde Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır. Sonuçlar aşağıda sırasıyla verilmiştir.

Yoğunluk ölçümleri sonucunda;

Kontrol grubu ile 2 mM I₂ grubu arasında anlamlı derecede fark vardır. (p<0.05)

Kontrol grubu ile 3 mM I₂ grubu arasında anlamlı derecede fark vardır. (p<0.05)

Kontrol grubu ile 1 mM I₂+KI grubu arasında anlamlı derecede fark vardır. (p<0.05)

Alkol grubu ile 2 mM I₂ grubu arasında anlamlı derecede fark vardır. (p<0.05)

Alkol grubu ile 3 mM I₂ grubu arasında anlamlı derecede fark vardır. (p<0.05)

Alkol grubu ile 1 mM I₂+KI grubu arasında anlamlı derecede fark vardır. (p<0.05)

Alkol grubu ile 3 mM I₂+KI grubu arasında anlamlı derecede fark vardır. (p<0.05)

2 mM I₂+KI ile 2 mM I₂ grubu arasında anlamlı derecede fark vardır. (p<0.05)

2 mM I₂+KI ile 3 mM I₂ grubu arasında anlamlı derecede fark vardır. (p<0.05)

2 mM I₂+KI ile 1 mM I₂+KI grubu arasında anlamlı derecede fark vardır. (p<0.05)

Yoğunluk ölçümleri için yapılan istatistik test sonuçlarına göre I₂ uygulamalarının 2 mM ve 3 mM dozlarda ve I₂+KI uygulamalarının 1 mM dozunda kontrol grubuna göre sferoid yoğunluğunda değişikliğe yol açtığı gözlenmiştir.

Çözücü olarak kullanılan alkolün de kontrol grubuna benzer kıyaslama sonuçları verdiği ve böylece alkolün bu deneyde sıra dışı bir moleküler etkisinin olmadığı kanaatine varılmıştır.

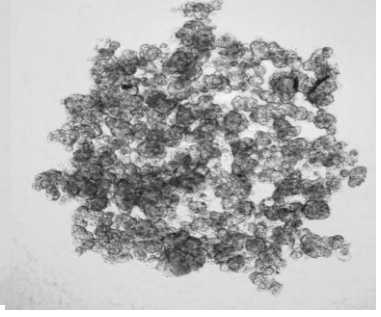
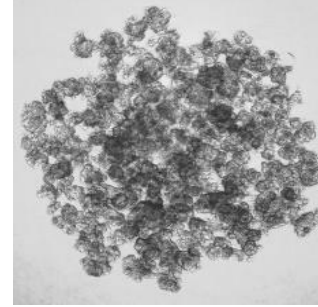
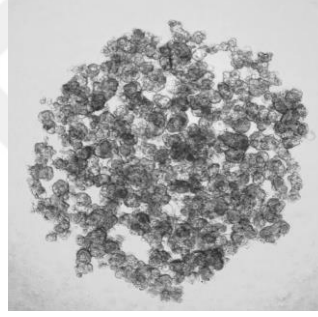
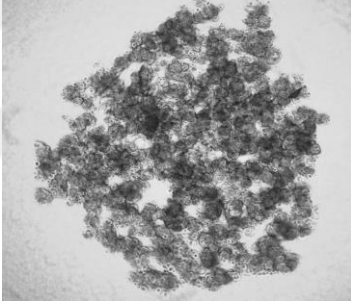
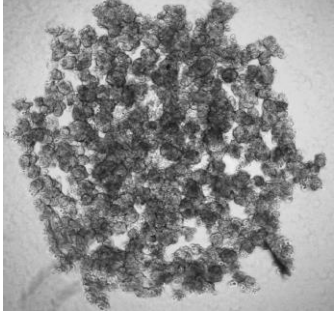
Sferoid görüntüleri kantitatif olarak değerlendirildikten sonra ayrıca morfolojik olarak da incelenmiştir. Her iki iyot uygulamasında da doz arttıkça sferoid yüzeyinden hücresel kopmalar olduğu gözlenmiştir. Bu kopmaların hücreler arası bağlantıların zayıflaması nedeniyle meydana geldiği düşünülmüştür.

Tablo 4.2. 3D sferoid kültürlerde alan ve yoğunluk ölçüm analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunan gruplar

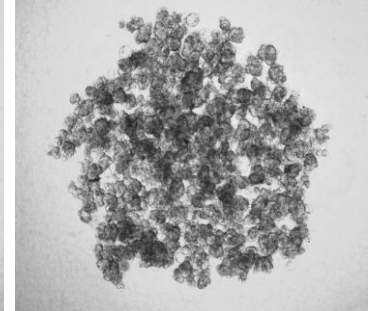
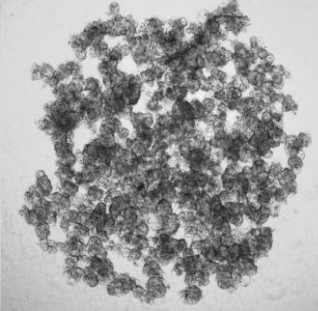
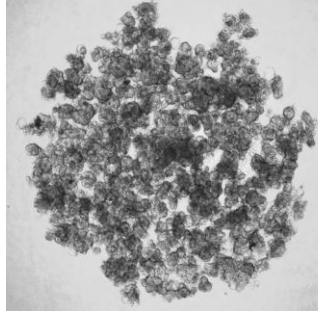
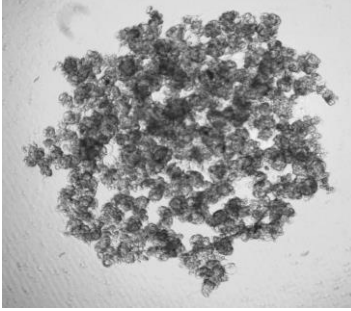
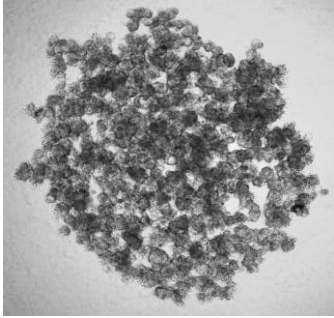
Alan Ölçüm Sonuçları		
Deney Grubu	Karşılaştırma Grubu	P
Kontrol	2mM I ₂	,000
	3 mM I ₂	,000
	3 mM I ₂ +KI	,000
Alkol	2mM I ₂	,000
	3 mM I ₂	,000
	3 mM I ₂ +KI	,000
1mM I₂	3 mM I ₂ +KI	,000
1 mM I₂+KI	2 mM I ₂	,000
	3 mM I ₂	,000
	2 mM I ₂ +KI	,001
	3 mM I ₂ +KI	,000

Yoğunluk Ölçüm Sonuçları		
Deney Grubu	Karşılaştırma Grubu	P
Kontrol	2 mM I ₂	,000
	3 mM I ₂	,000
	1 mM I ₂ +KI	,000
Alkol	2mM I ₂	,000
	3 mM I ₂	,000
	1 mM I ₂ +KI	,000
	3 mM I ₂ +KI	,001
2 mM I₂+KI	2 mM I ₂	,000
	3 mM I ₂	,000
	1 mM I ₂ +KI	,000

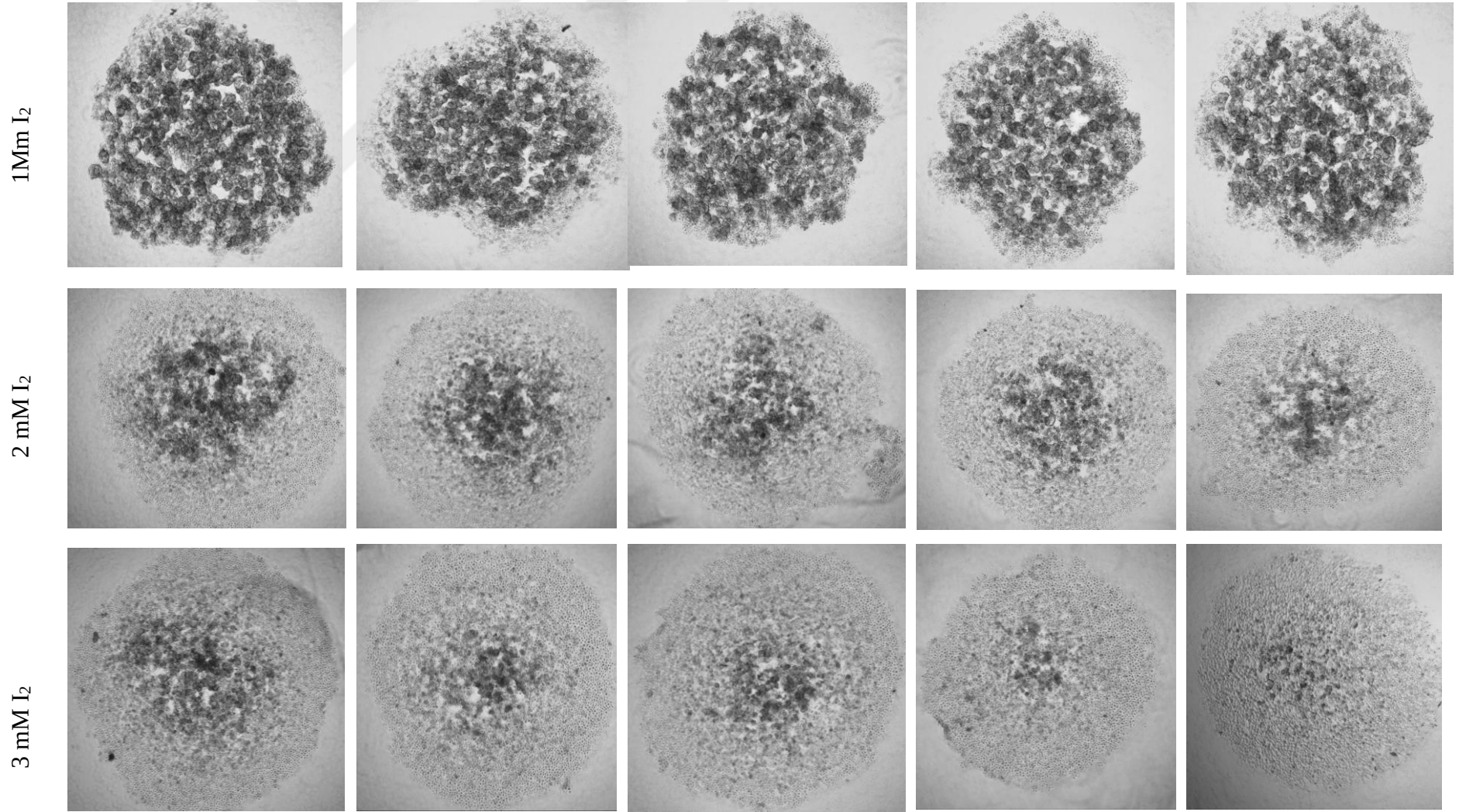
KONTROL



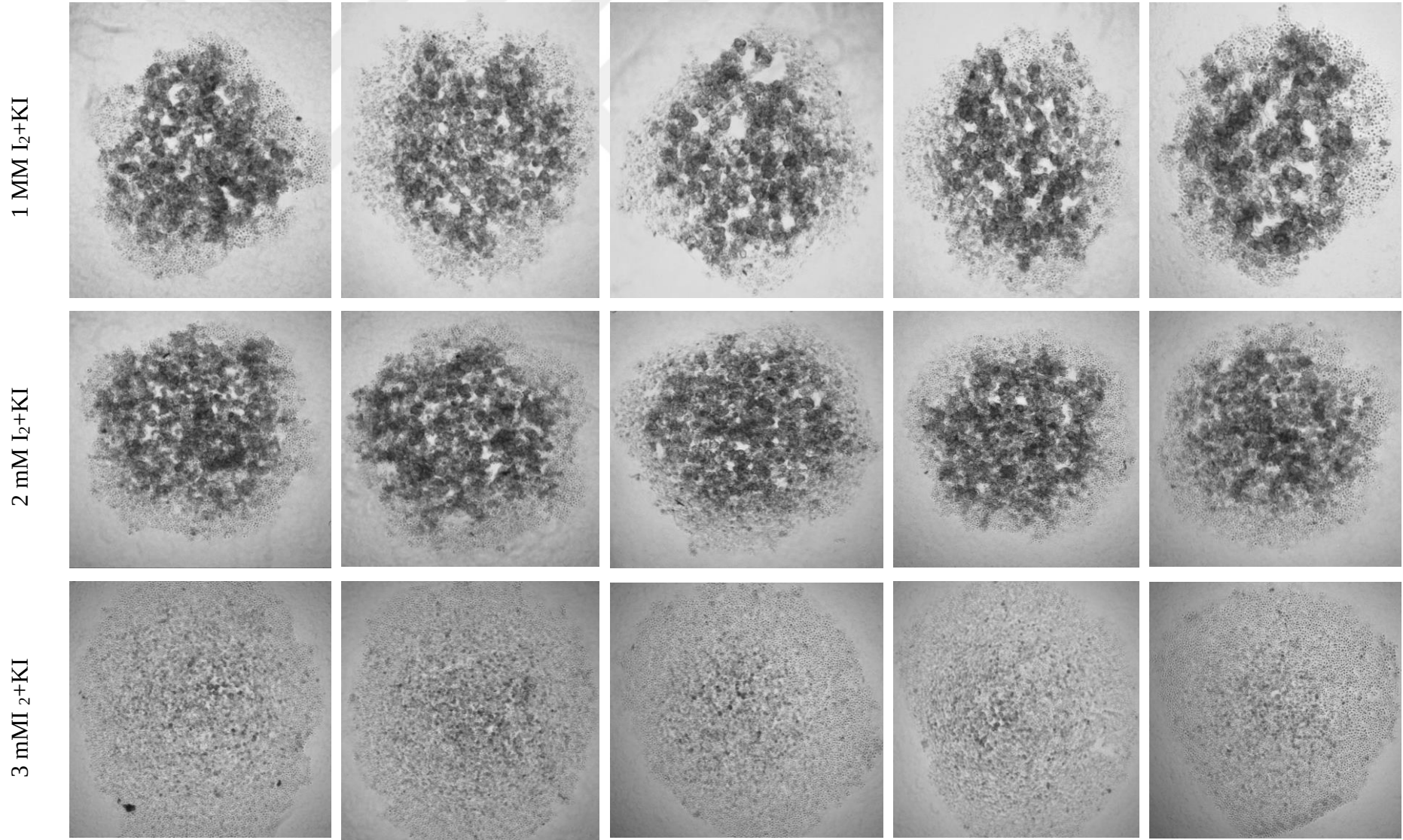
ALKOL



Şekil 4.10. İyot uygulamalarının 3D Sferoid mikroskop görüntüleri (48 saat)

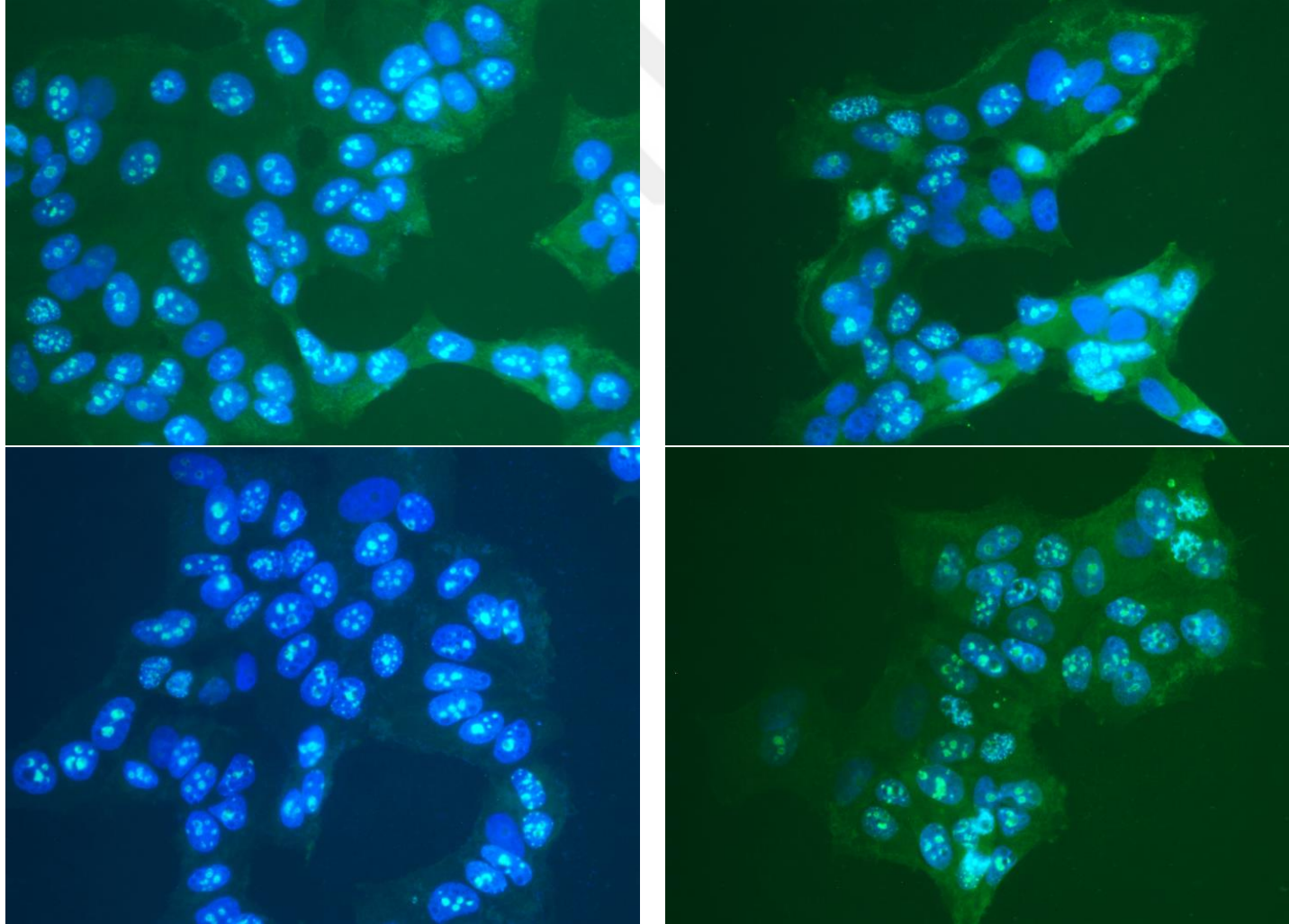


Şekil 4.10. (Devam) İyot uygulamalarının 3D Sferoid mikroskop görüntüleri (48 saat)

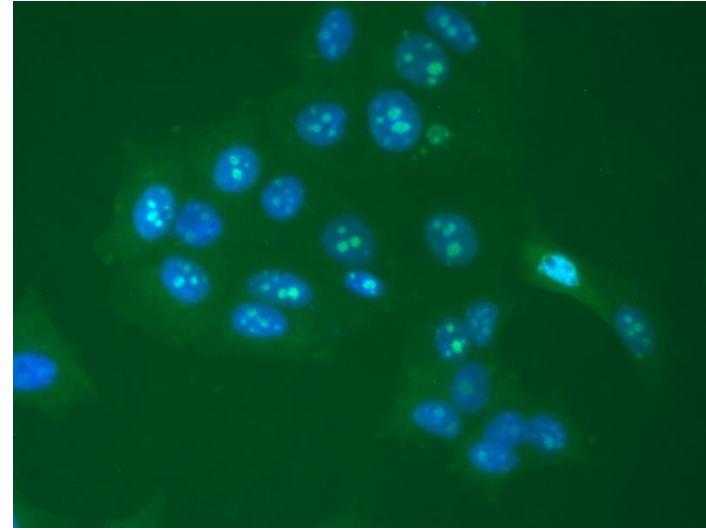
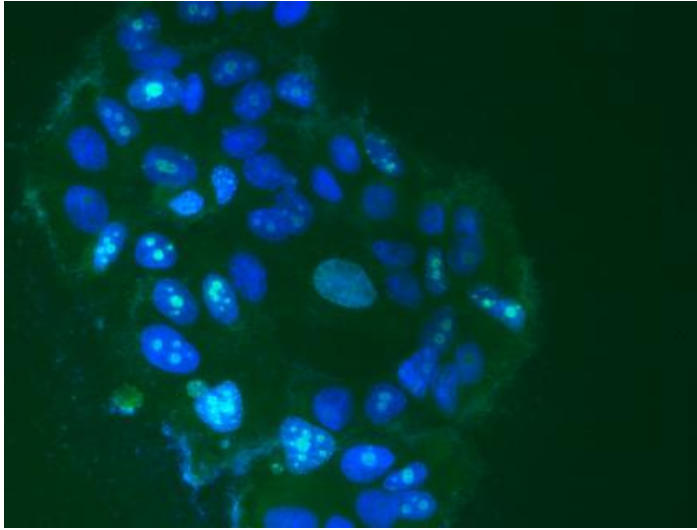
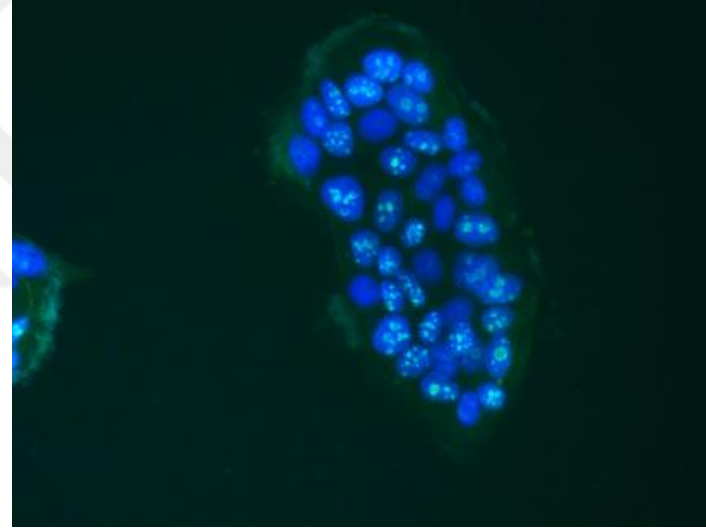
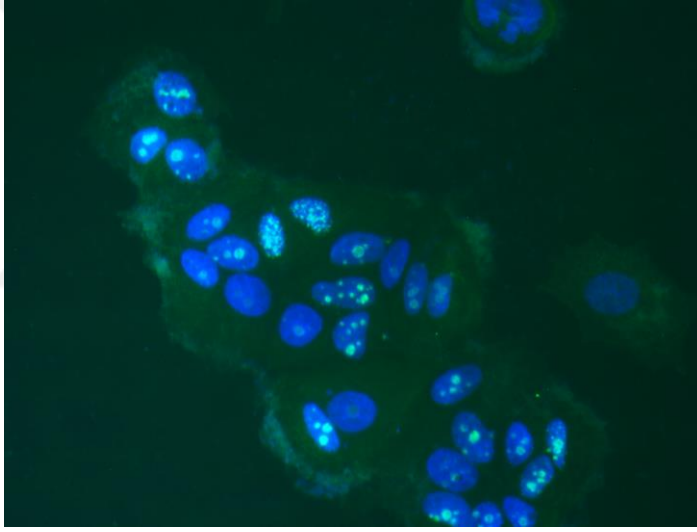


Şekil 4.10. (Devam) İyot uygulamalarının 3D Sferoid mikroskop görüntüleri (48 saat)

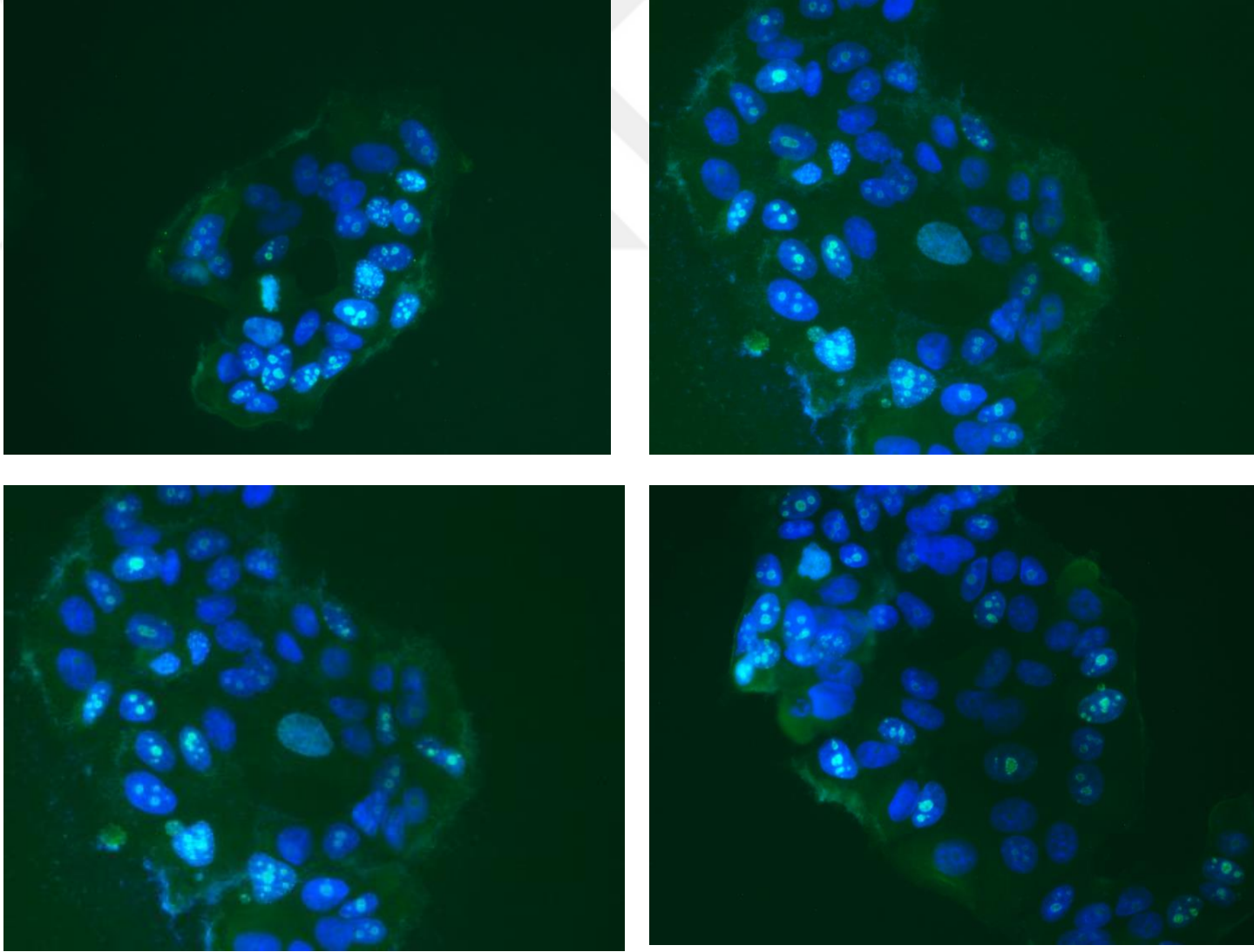
4.5.İmmün floresan Boyama



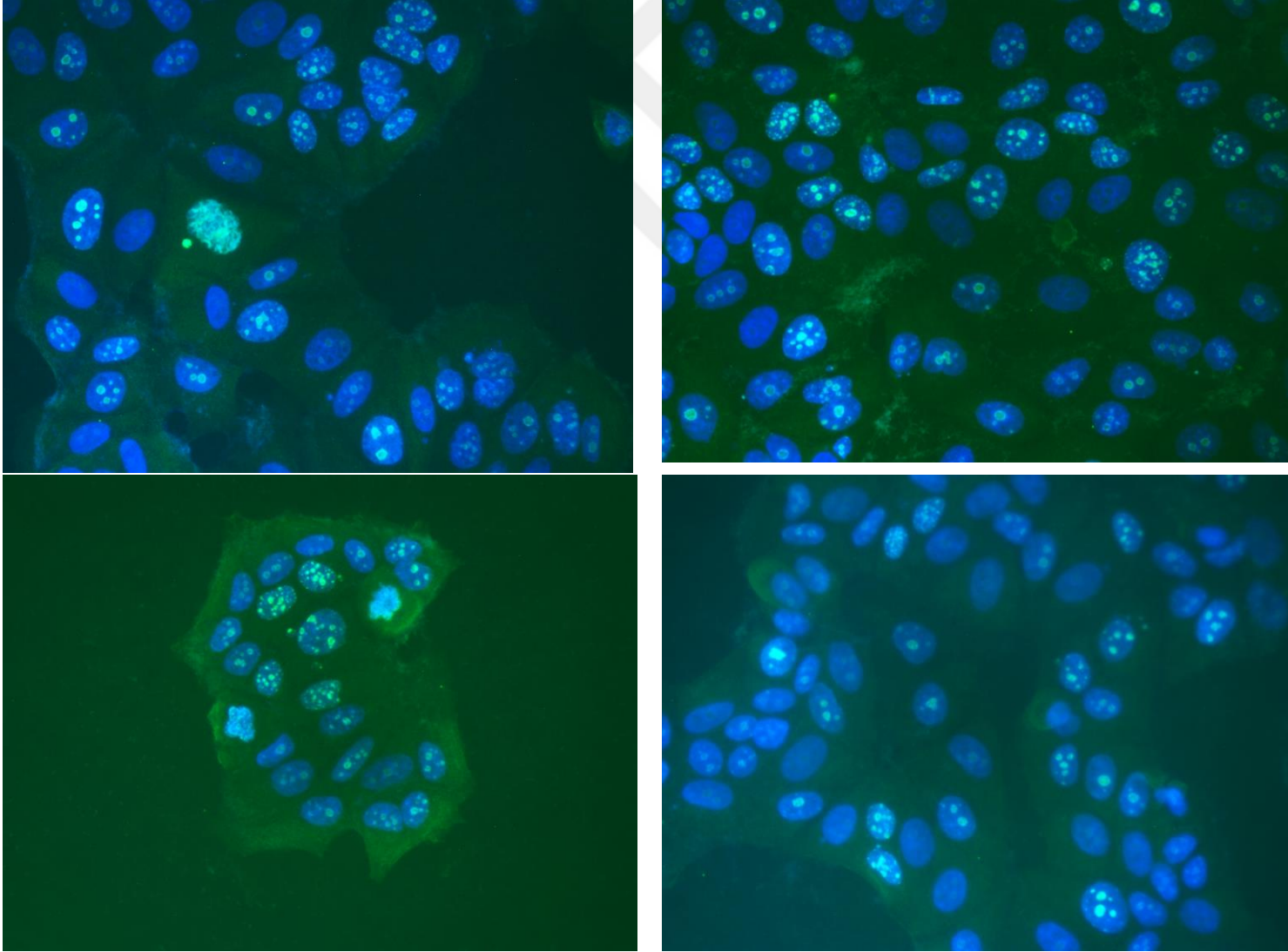
Şekil 4.11.Kontrol grubuna ait immün floresan boyama görseli



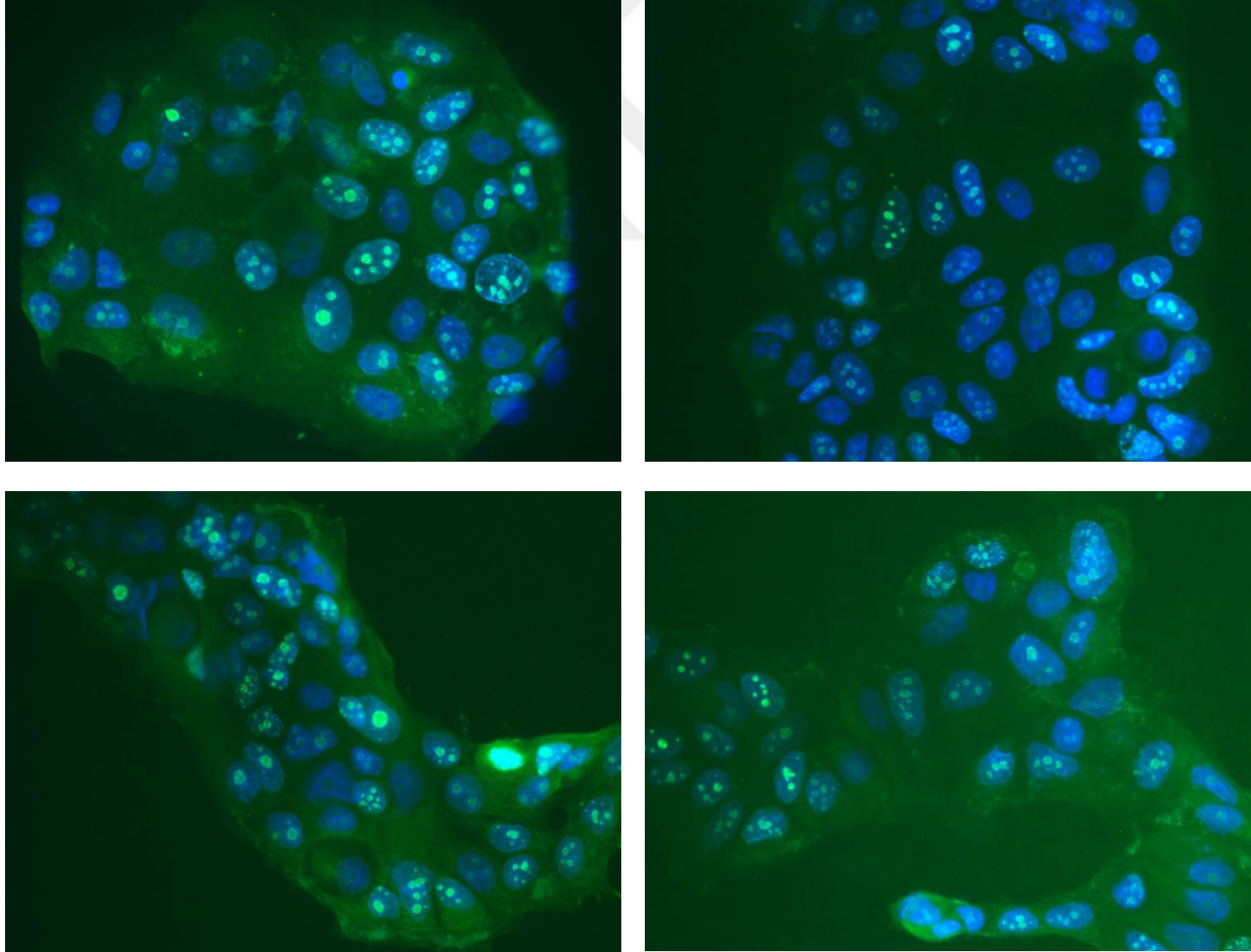
Şekil 4.12. Alkol grubuna ait immün floresan boyama görselleri



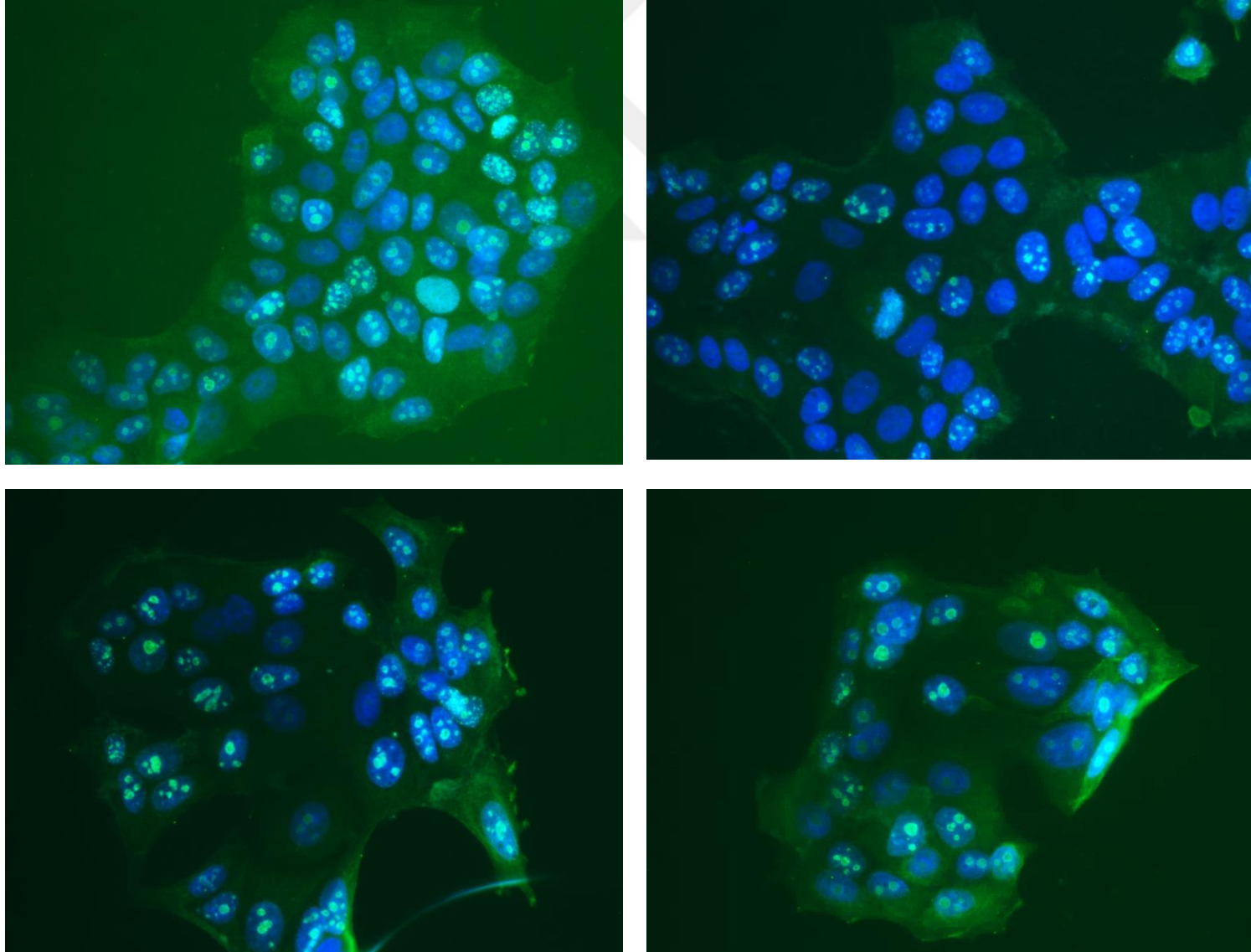
Şekil 4.13. 1 mM I₂ grubuna ait immün floresan boyama görselleri



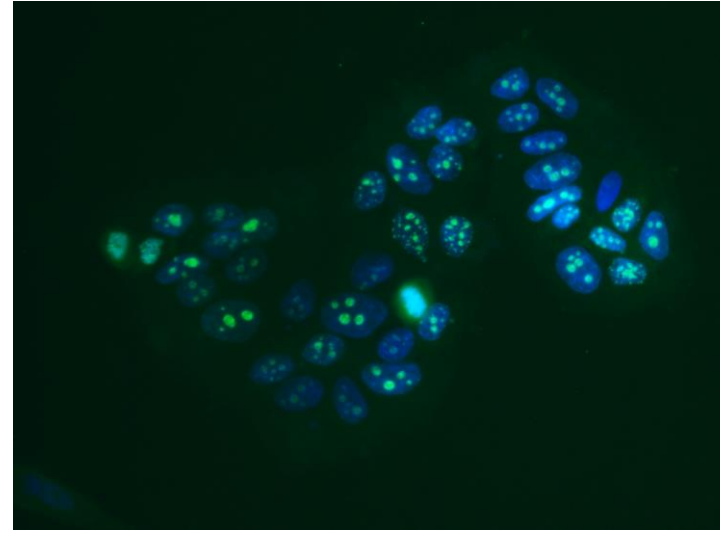
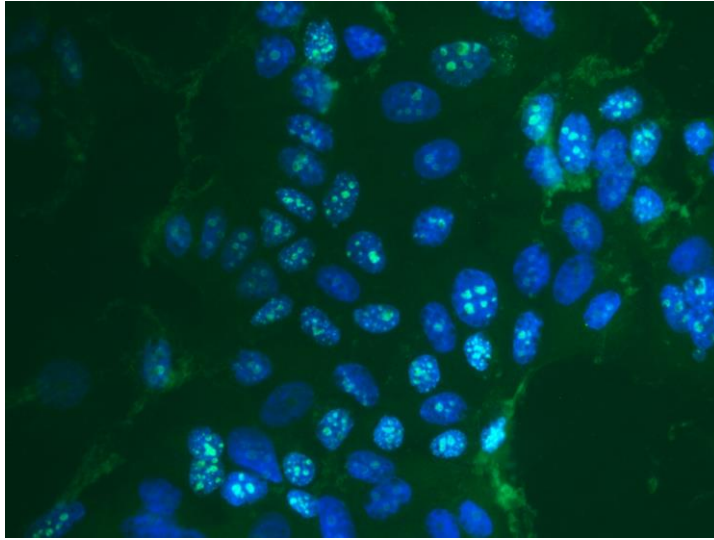
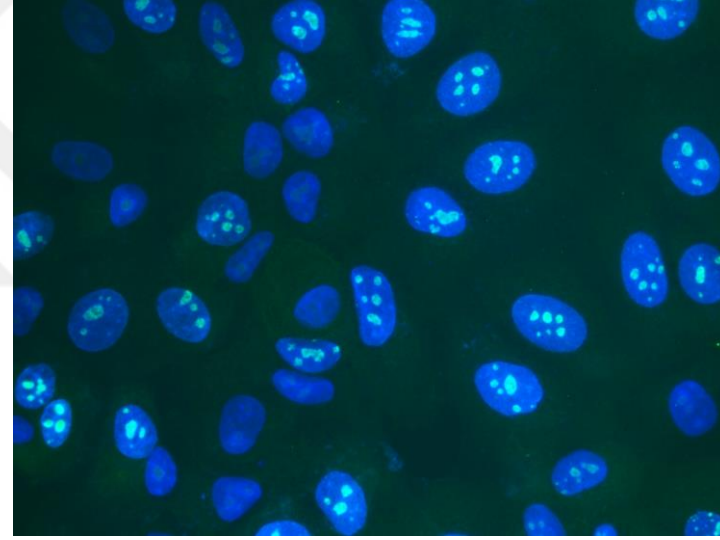
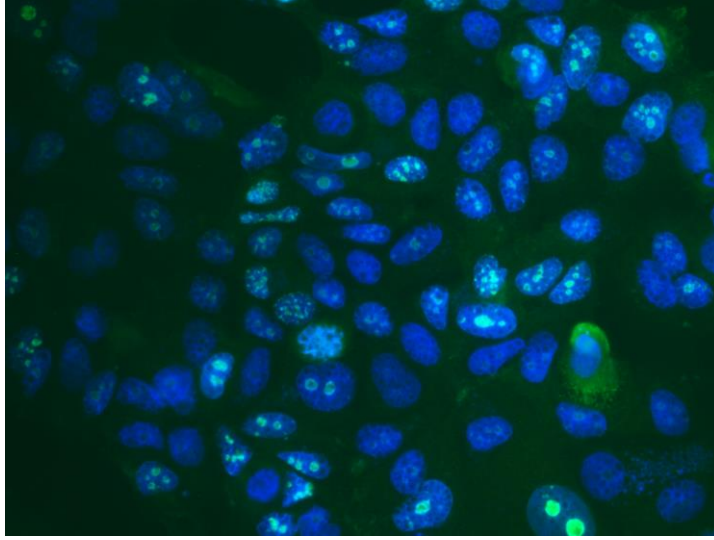
Şekil 4.14. 2 mM I_2 grubuna ait immün floresan boyama görselleri



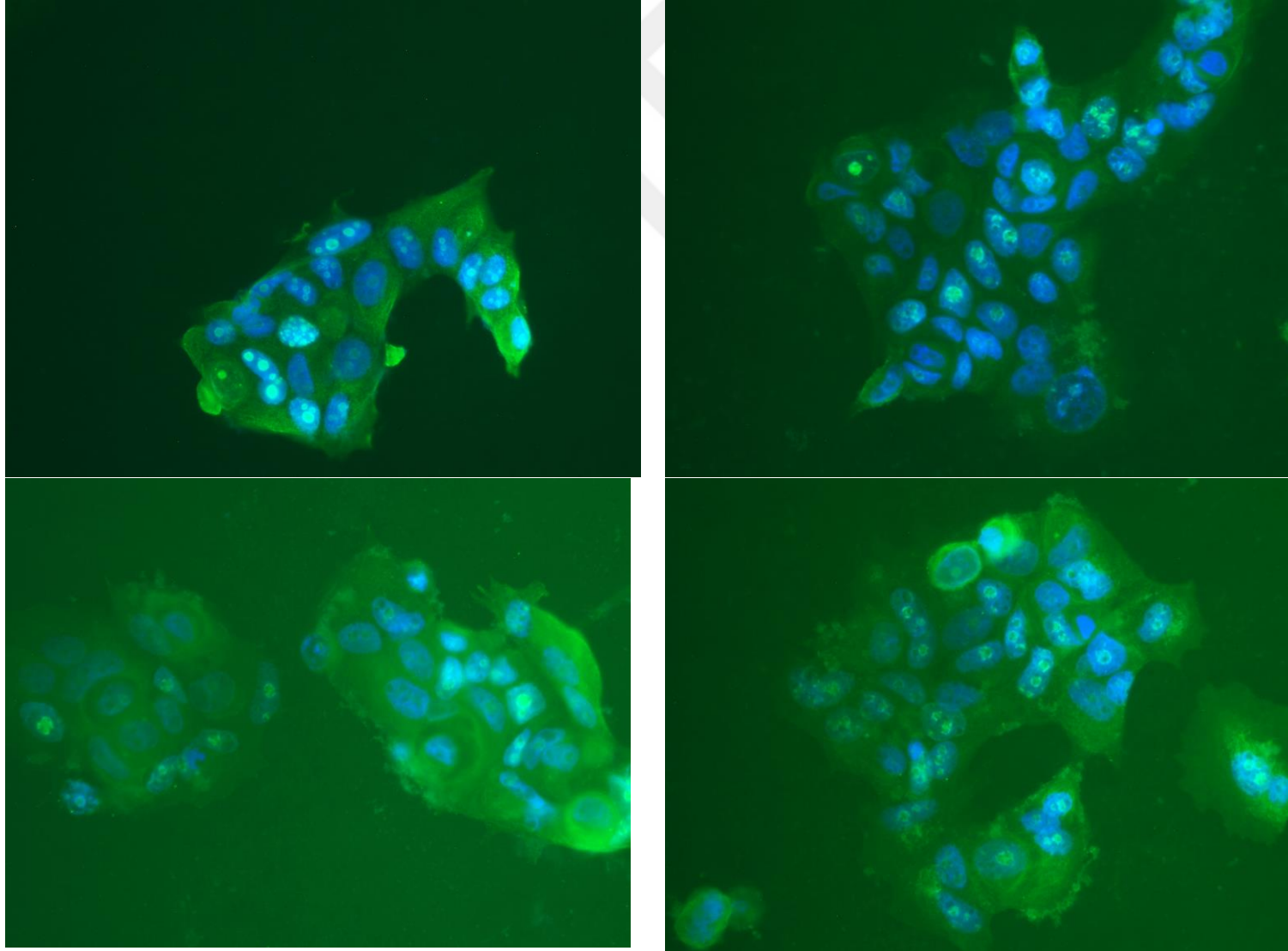
Şekil 4.15. 3 mM I₂ grubuna ait immün floresan boyama görselleri



Şekil 4.16. 1 mM I₂+KI grubuna ait immün floresan boyama görselleri



Şekil 4.17. 2 mM I₂+KI grubuna ait immün floresan boyama görselleri



Şekil 4.18. 3 mM I₂+KI grubuna ait immün floresan boyama görseli

Yukarıda immün floresan Ki-67 (Alexa Fluor®488) probu ile boyanan hücrelerin görüntüleri verilmiştir.

Tablo 4.2. İmmün floresan boyama skarlama

Grup	Sayılan Toplam Hücre	Ki-67 Pozitif Hücre	Pozitif Hücre (Yüzde)	Ki-67 Negatif Hücre	Negatif Hücre (Yüzde)
Kontrol	1082	924	85,39	158	14,60
Alkol	767	671	87,48	96	12,51
1 mM I₂	974	784	80,49	190	19,50
2 mM I₂	1278	1062	83,09	216	16,90
3 mM I₂	1417	1122	79,18	295	20,81
1 mM I₂+KI	1170	970	82,90	200	17,09
2 mM I₂+KI	1563	1293	82,75	270	17,27
3 mM I₂+KI	776	458	59,02	318	40,97

Yapılan skarlama sonucu Ki-67 pozitif boyanan hücrelerin sadece 3 mM I₂+KI uygulamasında diğerlerinden yaklaşık %28,5-%8,3 oranında daha düşük pozitiflik gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak bu grupta skarlatabilen hücreler diğer testlerde gördüğümüz üzere iyot uygulamasına rağmen sağ kalmayı başarabilen hücrelerdir. Daha geniş tekrar sayısı ve hücrelerin hangi fazda olduğunu verebilecek bir analizle değerlendirmek gerektiğinden bu sonuçlarla iyot uygulamasının hücre çoğalmasını inhibe edici etkisini değerlendirmek mümkün olmamıştır.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, kadın sağlığının en önemli problemlerinden biridir. Dünya genelinde kadınlarda en yaygın görülen kanser türü olmakla birlikte DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) verilerine göre, bölgeden bölgeye meme kanseri görülme sıklığı değişmektedir. Yine aynı verilere göre sanayileşmiş toplumlarda meme kanseri görülme sıklığı sanayileşmemiş toplumlara göre daha yüksek görülmektedir. Meme kanserine bağlı kadın ölümleri kanser sebebiyle ölümler arasında birincidir (8). Yüksek teknolojiyle geliştirilen tanı ve tedavi metotlarına rağmen hala alternatif ya da yardımcı tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyan bir hastalık grubudur.

Flavonoidler, mineraller ve vitaminler gibi pek çok mikro besin molekülünün meme kanseri üzerinde etkisi incelenmiştir ve incelenmeye devam etmektedir (183). İyot da meme kanseri üzerinde olumlu etkileri olabilecek esansiyel elementlerden biri kabul edilmektedir. (184). Bu kanı Amerika’da yapılan göçmen Çinli, Japon ve Filipinli kadınları inceleyen bir çalışma sonucunda ortaya çıkmıştır. Bu kadınlardaki meme kanseri gözlenme sıklığındaki artış, Batı’ya göç ettikten sonra maruz kaldıkları çevresel faktörler ve yaşam tarzı değişiklikleri ile ilişkilendirilmiştir. Yaşam tarzı ile ilgili en önemli bileşenlerden biri de memleketlerindeki deniz ürünlerinden dolayısıyla iyottan zengin beslenme alışkanlığıdır (185)

İyodun meme kanseri ile olası bağlantısını inceleyen ve bu konuya değinen çalışmalar öncelikle epidemiyolojik sonra sırasıyla hayvan ve hücre çalışmaları olmak üzere aşağıda sırayla gözden geçirilmiş ve çalışmamızın metotları ile benzerlik gösterenlerin sonuçları, kendi sonuçlarımızı kıyaslamak ve değerlendirmek için kullanılmıştır.

Çalışmamızda MCF-7 hücrelerine değişen dozlarda iyot uygulaması yapılmış, hücre çoğalma davranışı 5 ayrı deney seti kullanılarak (MTT, Migrasyon deneyi, Koloni formasyon, 3D sferoid kültürler, Ki-67 immün floresan boyama) analiz edilmiştir.

Epidemiyolojik çalışmalara göz attığımızda, Ziegler’in (185) çalışması dışında az sayıda epidemiyolojik çalışma vardır. 1999 da yapılan bir çalışmada (186) dünya toplumlarında kanser insidans ve mortalite oranları incelenmiş, Çin, Japonya, diğer Doğu Asya ülkeleri ve o bölgedeki ada ülkelerinde meme kanseri insidansı, Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerine göre neredeyse üçte birinden daha az oranda düşük gözlenmiştir. Bu da iyotça zengin deniz ürünleri ile beslenmenin meme kanserine karşı koruyucu olabileceği teorisini destekleyen bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

Toplum bazlı bir diğer çalışmanın sonuçları da yüksek serum iyot seviyesine sahip kadınların daha düşük meme kanseri riskine sahip olduğunu bildirmiştir (187).

Bu çalışmaların sonuçları iyodun meme kanserindeki olası koruyucu etkisini ve bu etkinin meydana geliş şekillerini incelemek için araştırmacılara ve bize bir başlangıç noktası olmuştur.

Hayvan çalışmalarından ilk olarak Funahashi ve ark., çalışmalarında DMBA (7,12 Dimetil benz(a)antrasen) ile Sprague-Dawley ratlarda meme tümörü oluşumunu indüklemişler ve hayvanlara MPA (Medroksi-progesteroneasetat) ile birlikte 0.25 mg, 0,025 mg, 0,0025 mg /vücut kütle/gün dozlarında moleküler iyot verdiklerinde en düşük dozda tümör hacminin daha fazla azaldığını ve tümör dokusunda iyot konsantrasyonunun düşük doz verilen ratlarda daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bu paradoksal durumu düşük doz uygulanan ratlarda iyodun MPA aracılığıyla hücre içine daha kolay girmesine bağlamışlardır (188).

Aynı araştırmacının 2001 yılında bir deniz yosunu çeşidi olan mekabu ile yaptığı çalışmada, mekabunun iyot içeriği ana ekseninde olmak üzere bu yosunun Sprague-Dawley ratlarda meme tümörü gelişimini engellediği çalışmamızda kullandığımız MCF-7 hücrelerinde de apoptotik etkiyle tümör hücre sayısını azalttığı bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada iyot içeriği öne çıkarılsa da elde edilen etkinin yosunun içeriğinde bulunan diğer moleküller tarafından desteklenmiş olması da yüksek ihtimaldir (189).

Bir başka hayvan çalışmasında ratlarda DMBA ile indüklenen meme kanseri üzerinde iyodun çeşitli formlarda ve konsantrasyonlarda, (%0.05 I₂, %0.05 KI, %0.07 I₂, %0.05 I₂ +%0.05 KI (Miks), %0,1 KI, %0.05 I₂ + %0.1 KI (Lugol), 3 mg/ml tiroksin (T4), %0.05 MMI (Metimazol) +3 mg/ml tiriiyodotironin (T3), ve MMI/T3+Miks) etkisi analiz edilmiştir. Sonuçlar, her dozda iyot uygulamasının tümör gelişen hayvan sayısında azalmaya ve tümör gelişiminde gecikmeye neden olduğunu göstermiştir (161).

Garcia ve ark. yaptığı çalışmada ise, Virgin Sprague-Dawley ratlarda uyguladıkları deney modelinde MNU (N-metil-N-nitrozüre) ile meme tümörü indüksiyonu yapmışlar, kısa süreli profilaktik I₂ uygulanan grupta iyot kesilince hayvanlarda koruyucu etkinin çok belirgin olmadığı, MNU indüksiyonundan sonra iyoda devam edilen grupta ise tümör gelişiminin azaldığı bildirilmiştir (190) Buraya kadarki çalışmalar hayvan çalışmaları oldukları için çalışmamızla bir benzerlikleri yoktur ancak iyot uygulamasının tümör gelişimini azalttığını göstermek bakımından iyodun antitümöral etkilerini değerlendirmek için kıymetlidirler.

Çalışmamızda uygulama dozlarını tespit edebilmek için yaptığımız ilk deney olan MTT deneyinde örnek olarak kullandığımız çalışmanın dozları (10-20 mM) MCF-7 hücrelerinde çok şiddetli sitotoksik etki göstererek tüm hücrelerin ölümüne neden olmuştur. Deney görselleri

verilmiştir. Daha sonra yapılan optimizasyon deneyleri sonucunda 1,2 ve 3 mM dozlarla çalışmaya devam edilmiştir. Kullandığımız dozlar aşağıda detayları verilen çalışmaların pek çoğuna göre oldukça yüksek dozlardır. (maks. 3000 kat) Bu farklılığın neden kaynaklanmış olabileceği düşünüldüğünde bahsi geçen çalışmaların kendi aralarında da önemli doz farklılıkları olduğu göz önünde olduğu bulundurulur, olası sebepler şu şekilde sıralandırılmıştır:

- 1) Kullanılan malzemenin kalitesi
- 2) Hazırlanma şartları ve saklama koşulları (Kullanılan çözücüler, depolama ısısı, bekleme süresi vb.)
- 3) Hesap hatası

Aşağıda hücre çalışmaları ve sonuçları verilmiştir.

Arroyo ve ark. çalışmalarında MCF-7 hücrelerinde NIS ve pendrin için iyodun iki farklı kimyasal formunun (I_2 ve I^-) alımını ve antiproliferatif etkisini, proteinlere veya lipitlere iyot katılımını (Organifikasyon) ve IL-6 (İnterlökin-6)'nın hücre çoğalması üzerindeki etkisini analiz etmişlerdir. MCF-7 hücrelerinde I^- alımının NIS'e bağlı ve sürekli olduğunu ancak I_2 alımının NIS, Pendrin ve enerjiden bağımsız olarak 10 dakikada maksimuma çıktığını ve alımın sadece %10'u kadarının tutulduğu göstermiştir. Dolayısıyla meme kanseri hücrelerinde I_2 'nin kolaylaştırılmış bir difüzyon sistemi tarafından alındığını ve daha sonra proliferasyonu engelleyen lipitlere veya proteinlere kovalent olarak bağlandığını öne sürmüşlerdir. Çalışmada karşılaştırma amaçlı NIH3T3 (Embriyonik fare fibroblast hücreleri) hücrelerinde I^- alımı gözlenirse de tutulumu olmamıştır. Aynı çalışmada meme kanseri hücrelerinin I_2 , KI (2, 20 ve 100 μ M) ve IL-6 (0.1, 0.5 ve 1 μ M) ile inkübasyonu sonucunda I_2 ve IL-6'nın hücre proliferasyonunu doza ve zamana bağlı bir şekilde azalttığını, KI uygulamasının proliferasyonu azaltmada neredeyse hiç etkisi olmadığını bildirmişlerdir (191). Bizim çalışmamızın MTT sonuçlarına göre de I_2 doza ve süreye bağlı hücre sayısında azalmaya neden olmuştur ancak bizim çalışmamızda kullandığımız dozlar (1, 2 ve 3 mM) bu çalışmanın dozlarına kıyasla en az 500 en çok 1500 kat fazladır.

Bir diğer çalışmada, MCF-7 ve MDA-MB231 insan meme kanseri hücre hatlarında hem in vitro hem de ratlarda in vivo koşullarda (Ksenograft) moleküler iyodun (I_2) etkileri incelenmiştir. Ksenograft deneylerinde, hayvanların içme suyuna 0,025% oranda eklenen I_2 , MCF-7 ksenograftlarında tümör boyutunda anlamlı bir düşüşe yol açarken, tümör görülen hayvan sayısını da %50 azaltmıştır. İn vitro deneylerde ise MCF-7 hücre hattında 200 μ M I_2 uygulamasında hücre sayısının yaklaşık %60, 400 μ M da ise yaklaşık %25 seviyelerine indiği gözlenmiştir. Ayrıca bir hücre proliferasyon belirteci olan PCNA (Proliferatif hücre nükleer

antijeni) seviyelerinin de iyot uygulamasına ve hücre tipine bağlı olarak anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir (160). Bu çalışmanın dozları da bizim çalışmamızın dozlarına oranla daha düşüktür. Bizim çalışmamızda 48 saatlik uygulamalarda 3 mM I₂ uygulamasının hücre canlılığını kontrol grubuna göre %31'e indirdiğini, 2 ve 3 mM I₂+KI uygulamalarının canlılık üzerinde anlamlı düzeyde düşmelere sebep olduğunu tespit edildi. Bu çalışmanın sonuçlarıyla kıyaslanabilecek bir başka verimiz de Ki-67 pozitifliğidir. Çalışmada bir hücre proliferasyon belirteci olan PCNA'nın ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. Bizde de Ki-67 I₂ gruplarında pozitiflik oranı dramatik olarak etkilenmese de, 3 mM I₂+KI uygulaması pozitiflik oranını %28,5 oranında azaltmıştır. Her ikisi de proliferasyon belirteci olarak kabul edilen iki molekülün iyot uygulamaları sonucunda gözlenen bu etki iyodun apoptotik etkisinin yanında hücre çoğalmasını da baskılayabilecek bir potansiyele sahip olduğunu düşündürmüştür.

Stoddard'ın çalışmasında, ER (+) MCF-7 hücrelerinde %5 I₂ ve %10 KI (Lugol solüsyonu)'nin hücre çoğalması ve östrojen ile ilgili yollar üzerinde etkisi incelenmiş ve ER metabolizmasında görevli bazı genlerin ekspresyonlarında m-RNA seviyesinde artış ve azalmalar olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar topluca değerlendirildiğinde bu deneydeki iyot uygulamasının sitokrom-P450 yolağında değişiklik yaparak östrojenin hücre metabolizması üzerindeki etkisini baskıladığı ve özellikle Tamoxifen tedavisine dirençli tümörlerde arttığı gözlenen CCND1(Siklin D1)gen ifadesini azalttığı, dolayısıyla iyot tedavisinin Tamoxifen direncini azaltmada yada direnç gelişimini yavaşlatmada etkili olabileceği bildirilmiştir (159). Bu çalışma ile bizim çalışmamızın herhangi bir metodolojik bir benzerliği olmasa da bu çalışmanın sonuçlarında da iyot uygulamasının tümör gelişimini östrojen yolları üzerinden baskılaması bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Shrivastava ve ark. çalışmasında MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 ZR-75-1, T-47D meme kanseri hücre hatlarında moleküler iyotun sitotoksitesini belirlemek amacıyla iyot dozları (1,2,3 ve 4 µM) denemişlerdir. MCF-7 hücrelerinde doza bağımlı olarak hücre sayısında azalma olduğunu göstermişlerdir. Dozlara bağlı canlılık yüzdesinin sırasıyla %85, 60, 40, 10'a düştüğü görülmüştür. İyotun MCF-7 hücrelerinde Bcl-2' nin inhibisyonu, Bax'ın aktivasyonuna ve AIF3 (Apoptotik İndükleyici Faktör 3)' ün mitokondriden çekirdeğe salınması yoluyla zamana ve doza bağlı bir şekilde apoptozu indüklediğini ortaya konmuştur. Yüksek doz iyot uygulaması sonrasında hücre çekirdek yapısında yoğunlaşma, hücre duvarına doğru çekilme ve fragmentasyon gözlenmiştir (192). Bu çalışmada da bizim çalışmamızdakinden 250 ila 3000 kat düşük dozlar kullanılmıştır. O yüzden çalışma sonuçları arasındaki benzerlik yada farklılıkları tespit etmek mümkün olamamıştır.

Rösner ve ark. çalışmalarında ise I_2 , KI, PVP-I (Polivinilpirolidon iyodin (povidon iyot)) ve Lugol çözeltisinin insan karsinoma hücre hatlarında (MCF-7, HS-24, H1299, A549, Capan-2, PaTu 8902) üzerinde sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. 20 μM I_2 ve 100 μM KI ve ikisinin karışımlarını denemişlerdir. MCF-7 hücrelerinde KI tek başına herhangi bir sitotoksik etki göstermezken, I_2 ile kombine edildiğinde hücre canlılığını anlamlı düzeyde düşürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca başka bir iyot bileşiği olan PVP-I' in kontrole kıyasla hücre sayısını %10' a kadar azalttığı ve Lugol solüsyonunun hücre sayılarını %40'a kadar bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (193). Bu çalışmanın konsantrasyonları da bizim çalışmamıza oranla düşüktür.

Elliyanti ve ark. (194) çalışmasında, bizim çalışmamıza benzer olarak I_2 , Lugol ve her ikisinin kombinasyonu üç farklı tipte meme kanseri hücre hattında (MCF7, SKBR3 ve MDA-MB 213) denenmiştir. İyodun hücre canlılığı üzerindeki etkisini araştıran bu in vitro çalışmanın MTT deneyi sonuçlarına göre; 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilen hücrelerde sırasıyla 1 μM I_2 uygulamasının süre uzadıkça etkisinin arttığı ve Lugol 10 μM ve 20 μM uygulamasının, Lugol 1 μM ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. 10 ve 20 μM Lugol ve kombinasyon uygulamalarında da hücre canlılığı azalmıştır. 10 μM 'lik I_2 ve KI₃'nin 20 μM ile kombinasyon tedavileri arasında hücre proliferasyonu üzerinde önemli ölçüde farklı bir etki yoktur. Bu çalışmanın öne çıkan özelliği iyodun hücre çoğalması üzerine etkisinin bazı uygulamalarda dozdan bağımsız gerçekleşmesidir. Aynı çalışmada bizim çalışmamıza benzer olarak koloni formasyon deneyi de yapılmıştır. Sonuçlara göre, MCF-7 hücrelerinde 1 μM KI₃ haricinde tüm dozlar koloni gelişmesini engellemiştir. Bu çalışmanın dozları da bizim çalışmamıza oranla düşüktür ve çalışma sonuçlarının kendi içindeki tutarsızlıkları sebebiyle kıyaslama yapmak mümkün olmamıştır.

Sonuç olarak I_2 ve I_2 +KI uygulamaları MCF-7 meme kanseri hücre hattında doza ve süreye bağımlı olarak in vitro şartlarda sayısal bir azalmaya neden olmuştur. Bu etkinin çoğalmayı baskılamak yoluyla değil de daha çok apoptozu indüklemek yoluyla gerçekleştiği kanaatine varılmıştır. Bu kanaatin oluşmasında MTT sonuçları, Migrasyon deneyinde gözlenen kayıplar ve 3D kültürde gözlenen sferoid kitlesinden kopan ve hücrelerarası bağlantıları kaybettiği düşünülen hücreler etkili olmuştur. Koloni formasyon sonuçlarına göre, I_2 'nin I_2 +KI uygulamasına göre koloni oluşumunu baskılamakta daha etkili olduğuna karar verilmiştir. Ki-67 ise iyodun etkilerini değerlendirmekte, iyot çok ciddi hücre kaybına neden olduğundan MCF-7 hücreleri için in vitroda verimli bir belirteç olmadığı kanaatine varılmıştır.

İyodun anti proliferatif etkisini değerlendirmede bizim sonuçlarımızın, invitro şartlarda elde edildikleri için gerçek antitümoral etkiyi göstermede zayıf bir kanıt olarak

değerlendirilmesi gerektiği, ayrıca gözlenen etki organizma için oldukça yüksek dozlarda elde edildiğinden, ileriye dönük çalışmalar için iyodun antitümoral etkisini araştırırken kullanılan dozların organizmanın bütünü için toksik potansiyelini göz önünde bulundurmak gerektiği düşünülmüştür.



KAYNAKLAR

1. Erel S, Atahan MK. Memenin Anatomisi, Fizyolojisi ve Değerlendirilmesi. Editor: Akça T ÇG, Emre AU Genel Cerrahi. ed. Ankara: Akademisyen Kitabevi; 2019. p.395-400.
2. Pandya S, Moore RG. Breast development and anatomy. Clin Obstet Gynecol. 2011;54:91-5. doi:10.1097/GRF.0b013e318207ffe9.
3. Topuz E, Aydın A. Editor: Enstitüsü İÜO. Meme Kanseri, Biyoloji, Tanı, Evreleme, Tedavi. 1 ed. İstanbul: Nobel Kitapevi; 1997. p.136-8.
4. Gartner LP, Hiatt JL. Meme Bezleri. Editor: Kitabevi İT. BRS Hücre Biyolojisi ve Histoloji 7.ed. İstanbul: 2016.
5. Javed A, Lteif A. Development of the human breast. Seminars in plastic surgery. 2013. Thieme Medical Publishers. p.005-12.
6. Lakhtakia R. A brief history of breast cancer: Part I: Surgical domination reinvented. Sultan Qaboos Univ Med J. 2014;14:e166.
7. Cancer.org. What Is Breast Cancer? American Cancer Society [Web Page]; [Cited Date: 17.12.2023]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>.
8. IARCWHO. Cancer Today, Estimated number of prevalent cases, world, females, all ages [Web Page] Global Cancer Observatory; [Cited Date: 02.05.2023]. Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&half_pie=0&donut=0.
9. Kashyap D, Pal D, Sharma R, Garg VK, Goel N, Koundal D, et al. Global increase in breast cancer incidence: risk factors and preventive measures. BioMed Res Int. 2022;2022. doi:10.1155/2022/9605439.
10. Rojas K, Stuckey A. Breast cancer epidemiology and risk factors. Clin Obstet Gynecol. 2016;59:651-72. doi:10.1097/GRF.0000000000000239.
11. Admoun C, Mayrovitz H. The Etiology of Breast Cancer. Editor: Exon Publications. ed.: 2022. p.21-30.
12. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. Breast Cancer: Targets and Therapy. 2019:151-64.
13. Zeinomar N, Bandera EV, Qin B. Toward Understanding the Etiology of Male Breast Cancer: An Ongoing Research Challenge. Oxford University Press; 2021. p. pkab079.
14. Krause W. Review article Male breast cancer—an andrological disease: risk factors and diagnosis. Andrologia. 2004;36:346-54. doi:10.1111/j.1439-0272.2004.00639.x.
15. Tirona MT, Sehgal R, Ballester O. Prevention of breast cancer (part I): epidemiology, risk factors, and risk assessment tools. Cancer Investigation. 2010;28:743-50. doi:10.3109/07357907.2010.494321.

16. Severi G. Breast cancer risk factors [electronic resource] : a review of the evidence / Gianluca Severi and Laura Baglietto. ed. Surry Hills, N.S.W: National Breast and Ovarian Cancer Centre; 2009.
17. Altekruse SF. SEER cancer statistics review, 1975-2007. 2009.
18. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RG, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67:177-93. doi:10.3322/caac.21395. Epub 2017 Mar 1.
19. Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;165:193-200. doi:10.1007/s10549-017-4325-2.
20. Pharoah PDP, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 1997;71:800-9. doi:10.1002/(sici)1097-0215(19970529)71:5<800::aid-ijc18>3.0.co;2-b.
21. Antoniou AC, Easton, DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene.* 2006;25:5898-905. doi:10.1038/sj.onc.1209879.
22. Mehrgou A, Akouchekian M. The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. *MJIRI.* 2016;30:369.
23. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol.* 2015;26:1291-9. doi: 10.1093/annonc/mdv022.
24. Olgun Ş. Meme Kanseriinde Genetik Risk Faktörleri: BRCA1 ve BRCA2 Genleri. *ERÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi.* 2021;8:23-5.
25. Yue W, Wang J, Li Y, Fan P, Liu G, Zhang N, et al. Effects of estrogen on breast cancer development: Role of estrogen receptor independent mechanisms. *Int J Cancer.* 2010;127:1748-57. doi:10.1002/ijc.25207.
26. Pemp D, Geppert LN, Wigmann C, Kleider C, Hauptstein R, Schmalbach K, et al. Influence of breast cancer risk factors and intramammary biotransformation on estrogen homeostasis in the human breast. *Arch Toxicol.* 2020;94:3013-25. doi:10.1007/s00204-020-02807-1.
27. Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:606-16. doi:10.1093/jnci/94.8.606.
28. Beral V, Bull D, Pirie K, Reeves G. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol.* 2012;13:1141-51. doi:10.1016/s1470-2045(12)70425-4.
29. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev.* 1993;15:36-47. doi:10.1093/oxfordjournals.epirev.a036115.
30. Palmer JR, Viscidi E, Troester MA, Hong CC, Schedin P, Bethea TN, et al. Parity, lactation, and breast cancer subtypes in African American women: results from the AMBER Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106. doi:10.1093/jnci/dju237.
31. Beral V, Bull D, Doll R, Peto R, Reeves G. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *Lancet.* 2002;360:187-95. doi:10.1016/S0140-6736(02)09454-0.

32. Russo IH, Russo J. Pregnancy-induced changes in breast cancer risk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011;16:221-33. doi:10.1007/s10911-011-9228-y.
33. Naeem M, Hayat M, Qamar SA, Mehmood T, Munir A, Ahmad G, et al. Risk factors, genetic mutations and prevention of breast cancer. *Int J Biosci*. 2019;14:492-6. doi:10.7150/ijbs.21635.
34. Ban KA, Godellas CV. Epidemiology of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2014;23:409-22. doi:10.1016/j.soc.2014.03.011.
35. Pelucchi C, Levi F, la Vecchia C. The rise and fall in menopausal hormone therapy and breast cancer incidence. *Breast*. 2010;19 3:198-201. doi:10.1016/j.breast.2010.01.021. Epub 2010 Feb 21.
36. Mørch LS, Skovlund CW, Hannaford PC, Iversen L, Fielding S, Lidegaard Ø. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2017;377:2228-39. doi:10.1056/NEJMoa1700732.
37. Hiatt RA, Porco TC, Liu F, Balke K, Balmain A, Barlow J, et al. A multilevel model of postmenopausal breast cancer incidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23:2078-92. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0403.
38. Helm JS, Rudel RA. Adverse outcome pathways for ionizing radiation and breast cancer involve direct and indirect DNA damage, oxidative stress, inflammation, genomic instability, and interaction with hormonal regulation of the breast. *Arch Toxicol*. 2020;94:1511-49. doi:10.1007/s00204-020-02752-z.
39. John EM, Phipps AI, Knight JA, Milne RL, Dite GS, Hopper JL, et al. Medical radiation exposure and breast cancer risk: findings from the Breast Cancer Family Registry. *Int J Cancer*. 2007;121:386-94. doi:10.1002/ijc.22668.
40. Ng J, Shuryak I. Minimizing second cancer risk following radiotherapy: current perspectives. *Cancer Manag Res*. 2015;7:1-11. doi:10.2147/cmar.S47220.
41. Wang X, Hui T-L, Wang M-Q, Liu H, Li R-Y, Song Z-C. Body mass index at diagnosis as a prognostic factor for early-stage invasive breast cancer after surgical resection. *Oncol Res Treat*. 2019;42:190-6. doi:10.1159/000496548.
42. Łukasiewicz S, Czelelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers (Basel)*. 2021;13. doi:10.3390/cancers13174287.
43. Iyengar NM, Arthur R, Manson JE, Chlebowski RT, Kroenke CH, Peterson L, et al. Body Fat and Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women with Normal Body Mass Index: A Secondary Analysis of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials and Observational Study. *JAMA oncology*.
44. Prentice RL, Caan B, Chlebowski RT, Patterson R, Kuller LH, Ockene JK, et al. Low-fat dietary pattern and risk of invasive breast cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *Jama*. 2006;295:629-42. doi:10.1001/jama.295.6.629.
45. Murff HJ, Shu XO, Li H, Yang G, Wu X, Cai H, et al. Dietary polyunsaturated fatty acids and breast cancer risk in Chinese women: a prospective cohort study. *Int J Cancer*. 2011;128:1434-41. doi:10.1002/ijc.25703. Epub 2010 Nov 23.

46. Sinha R, Kulldorff M, Chow W-H, Denobile J, Rothman N. Dietary intake of heterocyclic amines, meat-derived mutagenic activity, and risk of colorectal adenomas. 2001. Report No: 1055-9965. Available from.
47. Fiolet T, Srour B, Sellem L, Kesse-Guyot E, Allès B, Méjean C, et al. Consumption of ultra-processed foods and cancer risk: results from NutriNet-Santé prospective cohort. *bmj*. 2018;360. doi:10.1136/bmj.k322.
48. Dong J-Y, He K, Wang P, Qin L-Q. Dietary fiber intake and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies—. *Am J Clin Nutr*. 2011;94:900-5. doi:10.3945/ajcn.111.015578.
49. Peeters P, Keinan-Boker L, Van Der Schouw Y, Grobbee D. Phytoestrogens and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*. 2003;77:171-83. doi:10.1023/a:1021381101632.
50. Dong J-Y, Qin L-Q. Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;125:315-23. doi:10.1007/s10549-010-1270-8.
51. Atoum M, Alzoughool F. Vitamin D and breast cancer: latest evidence and future steps. *Breast Cancer (Auckl)*. 2017;11:1178223417749816. doi:10.1177/1178223417749816.
52. Cui Y, Rohan TE. Vitamin D, calcium, and breast cancer risk: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:1427-37. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0075.
53. Zhou L, Chen B, Sheng L, Turner A. The effect of vitamin D supplementation on the risk of breast cancer: a trial sequential meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2020;182:1-8. doi:10.1007/s10549-020-05669-4.
54. Pan SY, Zhou J, Gibbons L, Morrison H, Wen SW, com CCRERGph. Antioxidants and breast cancer risk-a population-based case-control study in Canada. *BMC Cancer*. 2011;11:1-12. doi:10.1186/1471-2407-11-372.
55. Peraita-Costa I, Carrillo Garcia P, Morales-Suárez-Varela M. Is There an Association between β -Carotene and Breast Cancer? A Systematic Review on Breast Cancer Risk. *Nutr Cancer*. 2022;74:39-54. doi:10.1080/01635581.2020.1865422.
56. de Oliveira VA, Oliveira IKF, Pereira IC, Mendes LKF, Carneiro da Silva FC, Torres-Leal FL, et al. Consumption and supplementation of vitamin E in breast cancer risk, treatment, and outcomes: A systematic review with meta-analysis. *Clin Nutr ESPEN*. 2023;54:215-26. doi:10.1016/j.clnesp.2023.01.032.
57. Kimmick GG, Bell RA, Bostick RM. Vitamin E and breast cancer: a review. *Nutr Cancer*. 1997;27:109-17. doi:10.1080/01635589709514511.
58. Zhang D, Xu P, Li Y, Wei B, Yang S, Zheng Y, et al. Association of vitamin C intake with breast cancer risk and mortality: a meta-analysis of observational studies. *Aging (Albany NY)*. 2020;12:18415-35. doi:10.18632/aging.103769.
59. Cadeau C, Fournier A, Mesrine S, Clavel-Chapelon F, Fagherazzi G, Boutron-Ruault M-C. Vitamin C supplement intake and postmenopausal breast cancer risk: interaction with dietary vitamin C. *Am J Clin Nutr*. 2016;104:228-34. doi:10.3945/ajcn.115.126326.
60. Rojas K. 1, Stuckey A. Breast cancer epidemiology and risk factors *Clin Obstet Gynecol*. 2016;59:651-72.
61. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer*. 2015;112:580-93. doi:10.1038/bjc.2014.579.

62. Gram IT, Park S, Kolonel LN, Maskarinec G, Wilkens LR, Henderson BE, et al. Smoking and Risk of Breast Cancer in a Racially/Ethnically Diverse Population of Mainly Women Who Do Not Drink Alcohol: The MEC Study. *Am J Epidemiol*. 2015;182:917-25. doi:10.1093/aje/kwv092.
63. Jones ME, Schoemaker MJ, Wright LB, Ashworth A, Swerdlow AJ. Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast Cancer Res*. 2017;19:118. doi:10.1186/s13058-017-0908-4.
64. Stillwater BJ, Bull AC, Romagnolo DF, Neumayer LA, Donovan MG, Selmin OI. Bisphenols and risk of breast cancer: a narrative review of the impact of diet and bioactive food components. *Front Nutr*. 2020;7:581388. doi: 10.3389/fnut.2020.581388. eCollection 2020.
65. Lee H-S, Park E-J, Oh J-H, Moon G, Hwang M-S, Kim S-Y, et al. Bisphenol A exerts estrogenic effects by modulating CDK1/2 and p38 MAP kinase activity. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2014;78:1371-5. doi:10.1080/09168451.2014.921557.
66. Al-Bader M, Ford C, Al-Ayadhy B, Francis I. Analysis of estrogen receptor isoforms and variants in breast cancer cell lines. *Exp Ther Med*. 2011;2:537-44. doi:10.3892/etm.2011.226.
67. Sellitto A, D'Agostino Y, Alexandrova E, Lamberti J, Pecoraro G, Memoli D, et al. Insights into the role of estrogen receptor β in triple-negative breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12:1477. doi:10.3390/cancers12061477.
68. López-Carrillo L, Hernández-Ramírez RU, Calafat AM, Torres-Sánchez L, Galván-Portillo M, Needham LL, et al. Exposure to phthalates and breast cancer risk in northern Mexico. *Environ Health Perspect*. 2010;118:539-44. doi: 10.1289/ehp.0901091.
69. Hauser R, Duty S, Godfrey-Bailey L, Calafat AM. Medications as a source of human exposure to phthalates. *Environ Health Perspect*. 2004;112:751-3. doi:10.1289/ehp.6804.
70. Meeker JD, Sathyanarayana S, Swan SH. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009;364:2097-113. doi:10.1098/rstb.2008.0268.
71. Ahern TP, Broe A, Lash TL, Cronin-Fenton DP, Ulrichsen SP, Christiansen PM, et al. Phthalate exposure and breast cancer incidence: a Danish nationwide cohort study. *J Clin Oncol*. 2019;37:1800. doi:10.1200/JCO.18.02202.
72. Chen F-P, Chien M-H, Chern IY-Y. Impact of low concentrations of phthalates on the effects of 17 β -estradiol in MCF-7 breast cancer cells. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2016;55:826-34. doi:10.1016/j.tjog.2015.11.003.
73. Van Meeuwen J, Ter Burg W, Piersma A, Van den Berg M, Sanderson J. Mixture effects of estrogenic compounds on proliferation and pS2 expression of MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol*. 2007;45:2319-30. doi:10.1016/j.fct.2007.06.011. Epub 2007 Jun 15.
74. Hong E-J, Ji Y-K, Choi K-C, Manabe N, Jeung E-B. Conflict of estrogenic activity by various phthalates between in vitro and in vivo models related to the expression of Calbindin-D9k. *J Reprod Dev*. 2005;51:253-63. doi:10.1262/jrd.16075.
75. Leng L, Li J, Luo X-m, Kim J-y, Li Y-m, Guo X-m, et al. Polychlorinated biphenyls and breast cancer: A congener-specific meta-analysis. *Environ Int*. 2016;88:133-41. doi:10.1016/j.envint.2015.12.022.

76. Tıkırdık M, Ulusoy D. Endokrin Bozucuların Üreme ve Gelişim Toksisitesi Üzerine Etkileri. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*. 2022;6:166-74. doi:10.46237/amusbfd.978800.
77. Rodgers KM, Udesky JO, Rudel RA, Brody JG. Environmental chemicals and breast cancer: An updated review of epidemiological literature informed by biological mechanisms. *Environ Res*. 2018;160:152-82. doi:10.1016/j.envres.2017.08.045. Epub 2017 Oct 6.
78. Leso V, Ercolano ML, Cioffi DL, Iavicoli I. Occupational chemical exposure and breast cancer risk according to hormone receptor status: a systematic review. *Cancers (Basel)*. 2019;11:1882. doi:10.3390/cancers11121882.
79. Walker WH, Bumgarner JR, Walton JC, Liu JA, Meléndez-Fernández OH, Nelson RJ, et al. Light Pollution and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21. doi:10.3390/ijms21249360.
80. Place AE, Jin Huh S, Polyak K. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res*. 2011;13:1-11. doi:10.1186/bcr2912.
81. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141:39-51. doi:10.1016/j.cell.2010.03.014.
82. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*. 2007;117:3155-63. doi:10.1172/jci33295.
83. Sun Y, Zhao Z, Yang Z, Xu F, Lu H, Zhu Z, et al. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci*. 2017;13:1387. doi:10.7150/ijbs.21635.
84. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67:93-9. doi:10.3322/caac.21388.
85. Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the breast. *Histopathology*. 2020. doi:10.1111/his.14091.
86. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, Washington M, et al. *AJCC cancer staging manual*. ed.: Springer; 2017.
87. Koh J, Kim MJ. Introduction of a New Staging System of Breast Cancer for Radiologists: An Emphasis on the Prognostic Stage. *Korean J Radiol*. 2019;20:69-82. doi:10.3348/kjr.2018.0231.
88. Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:791-9. doi:10.1038/nrc2212.
89. AlSawaftah N, El-Abed S, Dhou S, Zakaria A. Microwave Imaging for Early Breast Cancer Detection: Current State, Challenges, and Future Directions. *J Imaging*. 2022;8. doi:10.3390/jimaging8050123.
90. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2010;10:955-60. doi:10.4161/cbt.10.10.13879.
91. Allred DC. Ductal carcinoma in situ: terminology, classification, and natural history. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2010;2010:134-8. doi:10.1093/jncimonographs/lgq035.
92. Erber R, Hartmann A. Histology of luminal breast cancer. *Breast Care (Basel)*. 2020;15:327-36. doi:10.1159/000509025.
93. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol*. 2015;8:23-31. doi:10.4137/CPath.S31563.

94. Rashmi R, Prasad K, Udupa CBK. Breast histopathological image analysis using image processing techniques for diagnostic purposes: A methodological review. *J Med Syst.* 2022;46:1-24. doi:10.1007/s10916-021-01786-9.
95. Park M, Kim D, Ko S, Kim A, Mo K, Yoon H. Breast cancer metastasis: Mechanisms and therapeutic implications. *Int J Mol Sci.* 2022;23:6806. doi:10.3390/ijms23126806.
96. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch.* 2014;465:1-14. doi:10.1007/s00428-014-1593-7.
97. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406:747-52. doi:10.1038/35021093.
98. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. *J Cancer.* 2016;7:1281. doi:10.7150/jca.13141.
99. Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet.* 2011;378:1812-23. doi:10.1016/S0140-6736(11)61539-0.
100. Dias K, Dvorkin-Gheva A, Hallett RM, Wu Y, Hassell J, Pond GR, et al. Claudin-Low Breast Cancer; Clinical & Pathological Characteristics. *PLoS One.* 2017;12:e0168669. doi:10.1371/journal.pone.0168669.
101. Tsang J, Tse GM. Molecular classification of breast cancer. *Adv Anat Pathol.* 2020;27:27-35. doi:10.1097/PAP.0000000000000232.
102. Orrantia-Borunda E, Anchondo-Nuñez P, Acuña-Aguilar LE, Gómez-Valles FO, Ramírez-Valdespino CA. Subtypes of breast cancer. Editor: Harvey N. Mayrovitz P. *Breast Cancer* ed. Brisbane Exon Publications; 2022.
103. Creighton CJ. The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics.* 2012;6:289-97. doi:10.2147/btt.S29923.
104. Gutierrez C, Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135:55-62. doi:10.5858/2010-0454-rar.1.
105. Ramamoorthy P, Dandawate P, Jensen RA, Anant S. Celestrol and triptolide suppress stemness in triple negative breast cancer: Notch as a therapeutic target for stem cells. *Biomedicines.* 2021;9:482. doi:10.3390/biomedicines9050482.
106. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection. *PloS one.* 2016;11:e0157368. doi:10.1371/journal.pone.0157368.
107. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2016;293:247-69. doi:10.1007/s00404-015-3859-y.
108. Hon JD, Singh B, Sahin A, Du G, Wang J, Wang VY, et al. Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. *Am J Cancer Res.* 2016;6:1864-72.
109. Hadison Santos Nogueira Curzio, R.D. Molecular classification of breast câncer [Online Database]. 2017 [Cited Date. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/Molecular-classification-of-breast-c%C3%A2ncer-Curzio/58d3e48761adc99a588f3c2d0c9cfe928a4cebfe>.
110. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51:1409-16. doi:10.1093/jnci/51.5.1409.

111. Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 cells—changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107:djv073. doi:10.1093/jnci/djv073.
112. Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. *J Cancer.* 2017;8:3131. doi:10.7150/jca.18457.
113. Knust KS, Leung AM. Iodine: basic nutritional aspects. Editor: Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals. ed.: Elsevier; 2017. p.133-41.
114. Zimmermann MB, Boelaert K. Iodine deficiency and thyroid disorders. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015;3:286-95. doi: 10.1016/S2213-8587(14)70225-6.
115. AYDIN HN, Yasemin K. Iodine Deficiency. *ODU MED J* 2023;10:31-40. doi:10.56941/odutip.1277012.
116. Rohner F, Zimmermann M, Jooste P, Pandav C, Caldwell K, Raghavan R, et al. Biomarkers of nutrition for development—iodine review. *J Nutr.* 2014;144:1322S-42S. doi:10.3945/jn.113.181974.
117. Murray CW, Egan SK, Kim H, Beru N, Bolger PM. US Food and Drug Administration's Total Diet Study: dietary intake of perchlorate and iodine. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2008;18:571-80. doi:10.1038/sj.jes.7500648. Epub 2008 Jan 2.
118. Kapil U. Health consequences of iodine deficiency. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2007;7:267.
119. Stagnaro-Green A, Abalovich M, Alexander E, Azizi F, Mestman J, Negro R, et al. Guidelines of the American Thyroid Association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and postpartum. *Thyroid.* 2011;21:1081-125. doi:10.1089/thy.2016.0457.
120. WHO U. ICCIDD. Global prevalence of iodine deficiency disorders. Geneva, World Health Organization; 1993.
121. Bleichrodt N, Born M. A metaanalysis of research on iodine and its relationship to cognitive development. Editor: Stanbury JB. The damaged Brain of Iodine Deficiency. ed. New York: Cognizant Communication Corporation; 1994. p.195-200.
122. Zimmermann MB. Iodine: it's important in patients that require parenteral nutrition. *Gastroenterology.* 2009;137:S36-S46. doi: 10.1053/j.gastro.2009.07.074.
123. WHO U. ICCIDD. Indicators for Assessing Iodine Deficiency Disorders and their Control Through Salt Iodization. Geneva: World Health Organization. Micronutrients Series1994.
124. Szybiński Z. Iodine prophylaxis in Poland in light of the WHO recommendation on reduction of the daily salt intake. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* 2009;15:103-7. doi:10.2174/1872214811666170608120810.
125. Kurtoğlu S. İyot eksikliği hastalıkları ve korunma. *Erciyes Medical Journal.* 1995;17(1):1-4.
126. Okuyucu A, Alaçam H. İyot metabolizması. *J Exp Clin Med.* 2012;29:277-9. doi:10.5835/jecm.omu.29.s4.014.
127. Nicola JP, Carrasco N, Masini-Repiso AM. Dietary I(-) absorption: expression and regulation of the Na(+)/I(-) symporter in the intestine. *Vitam Horm.* 2015;98:1-31. doi:10.1016/bs.vh.2014.12.002.

128. Ishii H, Inada M, Tanaka K, Mashio Y, Naito K, Nishikawa M, et al. Induction of outer and inner ring monodeiodinases in human thyroid gland by thyrotropin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983;57:500-5. doi:10.1210/jcem-57-3-500.
 129. Gottardi W. Iodine and disinfection: theoretical study on mode of action, efficiency, stability, and analytical aspects in the aqueous system. *Arch Pharm (Weinheim).* 1999;332:151-7. doi:10.1002/(sici)1521-4184(19995)332:5<151::aid-ardp151>3.0.co;2-e.
 130. Jameson JL. Editor: *Harrison Endokrinoloji.* ed.: İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi; 2013. p.268-71.
 131. Krinsky NI, Beecher GR, Burk RF, Chan AC, Erdman JW, Jacob RA, et al. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Editor: Institute of Medicine. ed. Washington DC: National Academies Press 2000. p.95-185.
 132. Stipanuk MH, Caudill MA. Biochemical, physiological, and molecular aspects of human nutrition-E-book. ed.: Elsevier health sciences; 2018.
 133. Rousset B, Dupuy C, Miot F, Dumont J. Chapter 2 Thyroid Hormone Synthesis And Secretion. Editor: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al. *Endotext.* ed. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.
- Copyright © 2000-2023, MDText.com, Inc.; 2000.
134. Erdman Jr JW, Macdonald IA, Zeisel SH. Present knowledge in nutrition. ed.: John Wiley & Sons; 2012.
 135. Tiroidin Metabolik Hormonları [Power Point Slayt] [Online Database]. avesis.istanbul.edu.tr 2020 [Cited Date: 10.01.2024]. Available from: <https://avesis.istanbul.edu.tr/resume/downloadfile/auslu?key=6c0f42ee-9e12-4350-bbf5-abf601d5cf19>.
 136. Köhrle J, Gärtner R. Selenium and thyroid. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23:815-27. doi:10.1016/j.beem.2009.08.002.
 137. Gnidehou S, Caillou B, Talbot M, Ohayon R, Kaniewski J, Noël-Hudson MS, et al. Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. *Faseb j.* 2004;18:1574-6. doi:10.1096/fj.04-2023fje.
 138. Grasberger H, Refetoff S. Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dyshormonogenesis. *Current opinion in pediatrics.* 2011;23:421.
 139. Carvalho DP, Dupuy C. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;458:6-15. doi:10.1016/j.mce.2017.01.038.
 140. Grasberger H, Refetoff S. Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dyshormonogenesis. *Curr Opin Pediatr.* 2011;23:421-8. doi:10.1097/MOP.0b013e32834726a4.
 141. Manna D, Roy G, Mughesh G. Antithyroid drugs and their analogues: synthesis, structure, and mechanism of action. *Acc Chem Res.* 2013;46:2706-15. doi:10.1021/ar4001229.
 142. Ahad F, Ganie SA. Iodine, Iodine metabolism and Iodine deficiency disorders revisited. *Indian J Endocrinol Metab.* 2010;14:13.
 143. Kansagra SM, McCudden CR, Willis MS. The challenges and complexities of thyroid hormone replacement. *Lab Med.* 2010;41:338-48. doi:10.1309/LMB39TH2FZGNDGIM.

144. Tazebay UH, Wapnir IL, Levy O, Dohan O, Zuckier LS, Hua Zhao Q, et al. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat Med* 2000;6:871-8. doi:10.1038/78630.
145. A. DIV, Santisteban P. Role of iodide metabolism in physiology and cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2018;25:R225-R45. doi:10.1530/ERC-17-0515.
146. Kamikawa A, Ichii O, Sakazaki J, Ishikawa T. Ca²⁺-activated Cl⁻ channel currents in mammary secretory cells from lactating mouse. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016;311:C808-C19. doi:10.1152/ajpcell.00050.2016.
147. Al-Shehri SS, Knox CL, Liley HG, Cowley DM, Wright JR, Henman MG, et al. Breastmilk-saliva interactions boost innate immunity by regulating the oral microbiome in early infancy. *PloS one*. 2015;10:e0135047. doi:10.1371/journal.pone.0135047.
148. Rillema JA, Hill MA. Prolactin regulation of the pendrin-iodide transporter in the mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284:E25-E8. doi:10.1152/ajpendo.00383.2002.
149. Cann SA, Van Netten JP, Van Netten C. Hypothesis: iodine, selenium and the development of breast cancer. *Cancer Causes Control*. 2000;11:121-7. doi:10.1023/a:1008925301459.
150. Aceves C, Anguiano B, Delgado G. Is iodine a gatekeeper of the integrity of the mammary gland? *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2005;10:189-96.
151. Yang YJ, Nam S, Kong G, Kim MK. A case-control study on seaweed consumption and the risk of breast cancer. *Br J Nutr*. 2010;103:1345-53. doi:10.1017/S0007114509993242.
152. Lemarchand L, Kolenel LN, Nomura AM. Breast cancer survival among Hawaii Japanese and Caucasian women: Ten-year rates and survival by place of birth. *Am J Epidemiol*. 1985;122:571-8. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a114136.
153. Venturi S. Is there a role for iodine in breast diseases? *Breast*. 2001;10:379-82. doi:10.1054/brst.2000.0267.
154. Berger F, Unterholzner S, Diebold J, Knesewitsch P, Hahn K, Spitzweg C. Mammary radioiodine accumulation due to functional sodium iodide symporter expression in a benign fibroadenoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;349:1258-63. doi:10.1016/j.bbrc.2006.08.170.
155. Lacroix L, Mian C, Caillou B, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, et al. Na (+)/I (-) symporter and Pendred syndrome gene and protein expressions in human extra-thyroidal tissues. *Eur J Endocrinol*. 2001;144:297-302. doi:10.1530/eje.0.1440297.
156. Tazebay UH, Wapnir IL, Levy O, Dohan O, Zuckier LS, Hua Zhao Q, et al. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nature medicine*. 2000;6:871-8.
157. Wapnir IL, van de Rijn M, Nowels K, Amenta PS, Walton K, Montgomery K, et al. Immunohistochemical profile of the sodium/iodide symporter in thyroid, breast, and other carcinomas using high density tissue microarrays and conventional sections. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:1880-8. doi:10.1210/jc.2002-021544.
158. Eskin BA, Grotkowski CE, Connolly CP, Ghent WR. Different tissue responses for iodine and iodide in rat thyroid and mammary glands. *Biol Trace Elem Res*. 1995;49:9-19. doi:10.1007/BF02788999.

159. Stoddard II FR, Brooks AD, Eskin BA, Johannes GJ. Iodine alters gene expression in the MCF7 breast cancer cell line: evidence for an anti-estrogen effect of iodine. *Int J Med Sci.* 2008;5:189. doi:10.7150/ijms.5.189.
160. Mendieta I, Nuñez-Anita RE, Nava-Villalba M, Zambrano-Estrada X, Delgado-González E, Anguiano B, et al. Molecular iodine exerts antineoplastic effects by diminishing proliferation and invasive potential and activating the immune response in mammary cancer xenografts. *BMC cancer.* 2019;19:1-12. doi:10.1186/s12885-019-5437-3.
161. Soriano O, Delgado G, Anguiano B, Petrosyan P, Molina-Servín ED, Gonsebatt ME, et al. Antineoplastic effect of iodine and iodide in dimethylbenz [a] anthracene-induced mammary tumors: association between lactoperoxidase and estrogen-adduct production. *Endocr Relat Cancer.* 2011;18:529-39. doi:10.1530/ERC-11-0065. Print 2011 Aug.
162. Aceves C, Anguiano B, Delgado G. Is iodine a gatekeeper of the integrity of the mammary gland? *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2005;10:189-96. doi:10.1007/s10911-005-5401-5.
163. Kreipe H, Harbeck N, Christgen M. Clinical validity and clinical utility of Ki67 in early breast cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2022;14:17588359221122725. doi:10.1177/17588359221122725.
164. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182:311-22. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
165. Ensembl.org. Ensembl [Web Page] [Cited Date: 08.11.2023]. Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000148773;r=10:62369192-62398957;t=ENST00000368654.
166. Uxa S, Castillo-Binder P, Kohler R, Stangner K, Müller GA, Engeland K. Ki-67 gene expression. *Cell Death Differ.* 2021;28:3357-70. doi:10.1038/s41418-021-00823-x. Epub 2021 Jun 28.
167. Andrés-Sánchez N, Fisher D, Krasinska L. Physiological functions and roles in cancer of the proliferation marker Ki-67. *Journal of Cell Science.* 2022;135:jcs258932. doi:10.1242/jcs.258932.
168. Miller I, Min M, Yang C, Tian C, Gookin S, Carter D, et al. Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. *Cell Rep.* 2018;24:1105-12 e5. doi:10.1016/j.celrep.2018.06.110.
169. Sobocki M, Mrouj K, Colinge J, Gerbe F, Jay P, Krasinska L, et al. Cell-cycle regulation accounts for variability in Ki-67 expression levels. *Cancer Res.* 2017;77:2722-34. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0707.
170. Uxa S, Castillo-Binder P, Kohler R, Stangner K, Muller GA, Engeland K. Ki-67 gene expression. *Cell Death Differ.* 2021;28:3357-70. doi:10.1038/s41418-021-00823-x.
171. Davey MG, Hynes SO, Kerin MJ, Miller N, Lowery AJ. Ki-67 as a prognostic biomarker in invasive breast cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13:4455. doi:10.3390/cancers13174455.
172. Solovjeva LV, Demin SJ, Pleskach NM, Kuznetsova MO, Svetlova MP. Characterization of telomeric repeats in metaphase chromosomes and interphase nuclei of Syrian Hamster Fibroblasts. *Mol Cytogenet.* 2012;5:37. doi:10.1186/1755-8166-5-37.

173. Heidebrecht H, Buck F, Haas K, Wacker H, Parwaresch R. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif.* 1996;29:413-25. doi:10.1111/j.1365-2184.1996.tb00984.x.
174. Miller I, Min M, Yang C, Tian C, Gookin S, Carter D, et al. Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence. *Cell Rep.* 2018;24:1105-12. e5. doi:10.1016/j.celrep.2018.06.110.
175. Solovjeva L, Firsanov D, Vasilishina A, Chagin V, Pleskach N, Kropotov A, et al. DNA double-strand break repair is impaired in presenescent Syrian hamster fibroblasts. *BMC Mol Biol.* 2015;16:1-18. doi:10.1186/s12867-015-0046-4.
176. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma.* 2018;127:175-86. doi:10.1007/s00412-018-0659-8.
177. Nielsen TO, Leung SCY, Rimm DL, Dodson A, Acs B, Badve S, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: updated recommendations from the international Ki67 in breast cancer working group. *J Natl Cancer Inst.* 2021;113:808-19. doi:10.1093/jnci/djaa201.
178. Guo R, Ma L, Bai X, Miao L, Li Z, Yang J. A Scoring Method for Immunohistochemical Staining on Ki67. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2021;29:e20-e8. doi:10.1097/PAI.0000000000000853.
179. Soliman NA, Yussif SM. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. *Cancer Biol Med.* 2016;13:496. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0066.
180. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Hayashi M, Toyozumi Y, Arima N. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. *Exp Ther Med.* 2010;1:747-54. doi:10.3892/etm.2010.133.
181. Yuan P, Xu B, Wang C, Zhang C, Sun M, Yuan L. Ki-67 expression in luminal type breast cancer and its association with the clinicopathology of the cancer. *Oncol Lett.* 2016;11:2101-5. doi:10.3892/ol.2016.4199.
182. Subik K, Lee J-F, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, et al. The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer (Auckl).* 2010;4:117822341000400004.
183. Cuenca-Micó O, Aceves C. Micronutrients and Breast Cancer Progression: A Systematic Review. *Nutrients.* 2020;12:3613. doi:10.3390/nu12123613.
184. Venturelli S, Leischner C, Helling T, Renner O, Burkard M, Marongiu L. Minerals and cancer: overview of the possible diagnostic value. *Cancers.* 2022;14:1256. doi:10.3390/cancers14051256.
185. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, et al. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:1819-27. doi:10.1093/jnci/85.22.1819.
186. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001;2:533-43. doi:10.1016/S1470-2045(01)00486-7.
187. Manjer J, Sandsveden M, Borgquist S. Serum Iodine and Breast Cancer Risk: A Prospective Nested Case–Control Study Stratified for Selenium Levels. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2020;29:1335-40. doi:10.1158/1055-9965.EPI-20-0122.
188. Funahashi H, Imai T, Tanaka Y, Tobinaga J, Wada M, Morita T, et al. Suppressive effect of iodine on DMBA-induced breast tumor growth in the rat. *J Surg Oncol.* 1996;61:209-13. doi:10.1002/(SICI)1096-9098(199603)61:3<209::AID-JSO9>3.0.CO;2-F.

189. Funahashi H, Imai T, Mase T, Sekiya M, Yokoi K, Hayashi H, et al. Seaweed prevents breast cancer? *Jpn J Cancer Res.* 2001;92:483-7. doi:10.1111/j.1349-7006.2001.tb01119.x.
190. García-Solís P, Alfaro Y, Anguiano B, Delgado G, Guzman RC, Nandi S, et al. Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis by molecular iodine (I₂) but not by iodide (I⁻) treatment: Evidence that I₂ prevents cancer promotion. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;236:49-57. doi:10.1016/j.mce.2005.03.001.
191. Arroyo-Helguera O, Anguiano B, Delgado G, Aceves C. Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocr Relat Cancer.* 2006;13:1147-58. doi:10.1677/erc.1.01250.
192. Shrivastava A, Tiwari M, Sinha RA, Kumar A, Balapure AK, Bajpai VK, et al. Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria-mediated pathway. *Journal of biological chemistry.* 2006;281:19762-71.
193. Rösner H, Möller W, Groebner S, Torremante P. Antiproliferative/cytotoxic effects of molecular iodine, povidone-iodine and Lugol's solution in different human carcinoma cell lines. *Oncol Lett.* 2016;12:2159-62. doi:10.3892/ol.2016.4811.
194. Elliyanti A, Susilo VY, Setiyowati S, Rao PV. An Iodine Treatments Effect on Cell Proliferation Rates of Breast Cancer Cell Lines; In Vitro Study. *J Med Sci.* 2020;8:1064-70. doi:10.3889/oamjms.2020.5447.

ÖZGEÇMİŞ

.)

İngilizce	İyi	Orta	İyi	
-----------	-----	------	-----	--

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin**

BENZERLİK RAPORU

Meme Kanseri Modeli Olarak MCF-7 Hücre Hattında İyot Uygulamasının Hücre Çoğalması Üzerine Etkisi

Yazar Sedanur Kahraman

Gönderim Tarihi: 19-Şub-2024 11:35AM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 2298656879

Dosya adı: Uygulamas_n_n_H_cre_o_almas_zerine_Etkisi-Seda_Nur_Kahraman.docx (5.41M)

Kelime sayısı: 12635

Karakter sayısı: 80802

Meme Kanseri Modeli Olarak MCF-7 Hücre Hattında İyot Uygulamasının Hücre Çoğalması Üzerine Etkisi

ORJİNALLİK RAPORU

% 18	% 16	% 9	% 8
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	%3
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2
3	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	%2
4	yildontanju.tr.gg İnternet Kaynağı	%1
5	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	%1
6	ELİYATKIN, Nuket, YALÇIN, Evrim, ZENGEL, Baha, AKTAŞ, Safiye and VARDAR, Enver. "Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way", AVES, 2015. Yayın	%1
7	Submitted to Ataturk Universitesi Öğrenci Ödevi	%1