

T.C.
İSTANBUL OKAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BESLENME VE DİYETETİK ANA BİLİM DALI
BESLENME VE DİYETETİK PROGRAMI

Alev Selcan ARKÖSE

MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA ISIRGAN OTU İLE
BORİK ASİT'İN APOPTOZA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Hadi KARIMKHANI

İSTANBUL, Ekim 2023

T.C.
İSTANBUL OKAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BESLENME VE DİYETETİK ANA BİLİM DALI
BESLENME VE DİYETETİK PROGRAMI

Alev Selcan ARKÖSE
194006046

MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA ISIRGAN OTU İLE
BORİK ASİT'İN APOPTOZA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Hadi KARIMKHANI

İSTANBUL, Ekim 2023

T.C.
İSTANBUL OKAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BESLENME VE DİYETETİK ANA BİLİM DALI
BESLENME VE DİYETETİK BÖLÜMÜ

Alev Selcan Arköse

(194006046)

MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA ISIRGAN OTU İLE
BORİK ASİT'İN APOPTOZA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Tezin Enstitüye Teslim Edildiği Tarih :
Tezin Savunulduğu Tarih : 27.10.2023

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Hadi KARIMKHANI

Diğer Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Hande ÖNGÜN YILMAZ

Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Murat GÜNAL

İSTANBUL, Ekim 2023

ÖZET

MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA İSIRGAN OTU İLE BORİK ASİT'İN APOPTOZA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Bu çalışma, ısırgan otu, borik asit'in ve kombilerinin MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Bu iki maddeyi kullanarak meme kanseri modelinde apoptozis (programlı hücre ölümü) ve antiapoptotik (hücre ölümünü engelleyen) yollarını nasıl etkilediğini araştırmayı ve aynı zamanda ısırgan otu ve borik asidin koruyucu etkilerini belirlemeyi hedeflemektedir.

Gereç ve Yöntem: Hücrelerin canlılık durumunu değerlendirmek amacıyla MTT testi uygulanmış ve hücrelerin IC50 dozları belirlenmiştir. Ayrıca, hücre içindeki BAX, p53, Sitokrom C ve Kalpain protein düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçülmüştür.

Bulgular: p53 konsantrasyonu ölçümleri, kontrol grubuyla ısırgan otu ve borik asit arasında çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,001$). Sitokrom C konsantrasyonu ölçümleri, kontrol grubuyla ısırgan otu arasında çok yüksek düzeyde artış göstermiş, borik asit'te ise yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,001$), ($p<0,01$).

Sonuç: Bu araştırma, ısırgan otu ve borik asit kombinasyonunun meme kanseri hücrelerinde apoptozis üzerinde sınırlı etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle, bu bileşenlerin p53 ve Sitokrom C üzerinde olumlu etkileri gözlenmiştir. Bu bulgular, ısırgan otu ve borik asidin meme kanseri tedavisinde potansiyel kullanımının temellerini atmaktadır. Ancak, daha fazla klinik ve hayvan çalışması yapılması gerekmektedir. Bu çalışmalar, bu maddelerin etkinliğini, güvenliğini ve uygun dozlarını belirlemeye yönelik katkıda bulunacak ve klinik uygulamayı destekleyecektir. Gelecekteki araştırmalar, ısırgan otu ve borik asidin meme kanseri tedavisindeki rollerini daha iyi anlamamıza ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, MCF-7, Isırgan otu, Borik asit, Apoptoz etki

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF URTICA DIOICA AND BORIC ACID ON APOPTOSIS IN BREAST CANCER CELL LINE

Objective: This study aims to evaluate the effects of nettle, boric acid and their combinations on MCF-7 human breast cancer cells. It aims to investigate how these two substances affect the apoptosis (programmed cell death) and antiapoptotic (preventing cell death) pathways in the breast cancer model, and also to determine the protective effects of nettle and boric acid.

Materials and Methods: In order to evaluate the viability of the cells, the MTT test was applied and the IC50 doses of the cells were determined. Additionally, BAX, p53, Cytochrome C and Calpain protein levels inside the cell were measured by ELISA method.

Results: p53 concentration measurements showed a very highly statistically significant increase between the control group and nettle and boric acid ($p < 0.001$). Cytochrome C concentration measurements showed a very high increase between the control group and nettle, and a highly statistically significant increase in boric acid ($p < 0.001$), ($p < 0.01$).

Conclusion: This research shows that the combination of nettle and boric acid has limited effects on apoptosis in breast cancer cells. In particular, positive effects of these components on p53 and Cytochrome C were observed. These findings lay the foundations for the potential use of nettle and boric acid in the treatment of breast cancer. However, more clinical and animal studies are needed. These studies will contribute to determining the effectiveness, safety and appropriate doses of these substances and will support clinical practice. Future research will help us better understand the roles of nettle and boric acid in breast cancer treatment and help develop new treatment strategies.

Key Words: Breast cancer, MCF-7, Nettle, Boric acid, Apoptosis effect

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	5
ABSTRACT.....	6
İÇİNDEKİLER	1
SEMBOL LİSTESİ.....	3
KISALTMALAR.....	4
ŞEKİL LİSTESİ.....	6
TABLO LİSTESİ.....	7
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	8
2 GENEL BİLGİLER	10
2.1 Meme Anatomisi	10
2.2 Kanser	11
2.2.1 Kanser İnsidansı.....	12
2.3 Kanser Risk Faktörleri.....	12
2.3.1 Cinsiyet.....	12
2.3.2 Yaş	13
2.3.3 Alkol ve Tütün.....	13
2.3.4 Fiziksel Aktivite.....	14
2.3.5 Obezite	14
2.3.6 Üreme Faktörleri.....	14
2.4 Kanser Önleme ve Kontrolü	15
2.4.1 Öncelikli Korunma	15
2.4.2 Kanser Kaydı	15
2.4.3 Kanser Taraması	15
2.5 Meme Kanseri.....	16
2.6 Meme Kanseri Belirtileri	16
2.6.1 Memede Kitle ve Ağrı	16
2.6.2 Meme Başı Akıntısı	16
2.6.3 Forgue ve Retraksiyon Belirtisi	16
2.6.4 Meme Derisinde Ödem, Eritem, Ülserasyon	17
2.6.5 Portakal Kabuğu Görünümü	17
2.6.6 Lenf Nodüllerinde Büyüme	17
2.7 Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	17

2.8	Isırgan Otu	18
2.9	Bor	19
2.10	Apoptoz Mekanizması	21
2.11	Markerler	22
2.11.1	P53	22
2.11.2	BAX	23
2.11.3	Sitokrom C	24
2.11.4	Kalpainler	26
3	MATERYAL VE METOT	28
3.1	Ekstraksiyon ve Standardizasyon	28
3.1.1	Bitkisel Materyal	28
3.1.2	Ekstraksiyon	28
3.1.3	Standardizasyon	28
3.1.4	Hücre Kültürü	29
3.1.5	Hücre Patlatma	31
3.1.6	Hücre Sayımı	31
3.1.7	MTT Testi Yaparak Doz Ayarlanması	33
3.2	Biyokimya Parametrelerin İncelenmesi	34
3.2.1	P53 Düzeyinin Ölçümü	34
3.2.2	BAX Düzeyleri Ölçümü	34
3.2.3	Sitokrom C Düzeyleri Ölçümü	35
3.2.4	Kalpain Aktivitesi Ölçümü	35
3.2.5	ELISA Kiti Hazırlama ve Uygulama	36
3.3	Tüm verilerin istatistiksel analizinin yapılması ve yorumlanması çalışması	38
4	BULGULAR	39
5	TARTIŞMA	47
6	SONUÇ	52
	KAYNAKLAR	55

SEMBOL LİSTESİ

dk	: Dakika
g	: Gram
mcg	: Mikrogram
mL	: Mililitre
mg	: Miligram
mM	: Milimol
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
μ	: Mikro
μ L	: Mikrolitre

KISALTMALAR

A549	: Akciğer adenokarsinomu- 549
B	: Bor
BA	: Borik asit
BC	: Meme Kanseri
BKİ	: Beden Kütle İndeksi
Bax	: Bcl-2 ile ilişkili X proteini
BCL-2	: B-hücreli lenfoma 2
BRCA1	: BRCA1 DNA onarımı ilişkili
CAPN1	: Kalpain-1
CYTC	: Sitokrom C
DAD	: Diyot Array Dedektör
DMEM	: Dulbecco'nun Eagles Medium ModifikasyonU
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	: Enzime bağlı immünosorbent deneyi
FBS	: Fetal sığır serumu
GLOBOCAN	: Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence
HepG2	: Hepatoblastoma hücre hattı
HIF-1 α	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IC ₅₀	: Inhibitory Concentration of % 50
I κ B	: IkappaB kinaz
MCF-7	: Michigan kanser vakfi-7
MCF-10A	: Michigan kanser vakfi-10A
mRNA	: Mesajcı RNA
MTT	: 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür testi
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NF-k β	: Nükleer Faktör kappa B
NGS	: Nottingham Derecelendirme Sistemi

p21	: Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 1
p53	: Tümör proteini p53
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Meme Anatomisi	11
Şekil 2. ısrırgan otu yaprağı.....	19
Şekil 3. Borik asidin kimyasal yapısı	21
Şekil 4. Apoptoz da görülen sinyal yolları	22
Şekil 5. p53 ve apoptotik yolaklar	23
Şekil 6. BAX ve apoptotik yolaklar	24
Şekil 7. Sitokrom C ve apoptotik yolaklar	26
Şekil 8. Kalpain mekanizması	27
Şekil 9. ısrırgan ekstresi (10 mg/mL) HPLC kromatogramı	29
Şekil 10. MCF-7 hücrelerinin mikroskopta görünümü	30
Şekil 11. Hücre Sayımı.....	32
Şekil 12. MTT testi yapılışı	33
Şekil 13. P53 kalibrasyon eğrisi	34
Şekil 14. BAX kalibrasyon eğrisi.....	34
Şekil 15. Sitokrom C kalibrasyon eğrisi.....	35
Şekil 16. Kalpain kalibrasyon eğrisi.....	35
Şekil 17. p53 ve Cyt-C standartlarının farklı konsantrasyonlarının hazırlanması.....	36
Şekil 18. Bax standardının farklı konsantrasyonlarının hazırlanması	36
Şekil 19. CAPN1 standardının farklı konsantrasyonlarının hazırlanması.....	37
Şekil 20. ELİSA testin basamakları.....	38
Şekil 21. 24 ve 48 saatlik ısrırgan otu (urtica) konsantrasyonlarına göre MCF-7 hücre hattındaki canlılık değişimi.....	39
Şekil 22. 24 ve 48 saatlik borik asit konsantrasyonlarına göre MCF-7 hücre hattındaki canlılık değişimi.....	40
Şekil 23. Kontrol grubu ve 24 saatlik kombinasyonların canlılık değerleri.....	41
Şekil 24. Kontrol grubu ve 48 saatlik kombinasyonların canlılık değerleri.....	42
Şekil 25. Kontrol grubu, ısrırgan otu, borik asit ve ısrırgan otu+borik asit'te P53'ün konsantrasyon değerleri	43
Şekil 26. Kontrol grubu, ısrırgan otu, borik asit ve ısrırgan otu+borik asit'te BAX'ın konsantrasyon değerleri	44
Şekil 27. Kontrol grubu, ısrırgan otu, borik asit ve ısrırgan otu+borik asit'te CYCT'nin konsantrasyon değerleri	45
Şekil 28. Kontrol grubu, ısrırgan otu, borik asit ve ısrırgan otu+borik asit'te CAPN1'in konsantrasyon değerleri	46

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Deney Planı.....	30
Tablo 2. 24 ve 48 saatlik ısırgan otu konsantrasyonlarına göre MCF-7 hücre hattındaki canlılık değişiminin%’lik kıyaslanması.....	39
Tablo 3. 24 ve 48 saatlik borik asit konsantrasyonlarına göre MCF-7 hücre hattındaki canlılık değişiminin%’lik kıyaslanması.....	40
Tablo 4. Kontrol grubu ve 24 saatlik kombinasyonların canlılık değerleri açısından kıyaslanması	41
Tablo 5. Kontrol grubu ve 48 saatlik kombinasyonların canlılık değerleri açısından kıyaslanması	42

1 GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, DNA hasarı gibi çeşitli sebepler kaynaklı hücrelerin farklılaşması ve kontrolsüzce dağılım göstermesi ile meydana gelen bir hastalıktır (Topal et al., 2009). Meme kanseri, memenin kötü huylu tümörüdür. Multifaktöriyel bir hastalıktır ve kişilerde semptom göstermeden yayılım sağlayabilir (Gölbaşı et al., 2012). Meme kanseri gelişim sebeplerine bakıldığında hormonlar en üst sırada yer alır ve bu hormonlar arasında östrojenin en çok risk oluşturduğu ifade edilir (Karakuş, 2011). MCF-7, yıllardır birçok araştırmacı tarafından sıklıkla kullanılan bir meme kanseri hücre hattıdır (C. & Leung, 2011).

Isırgan otu olarak da bilinen *Urtica dioica*, yüzyıllardır tıbbi amaçlarla kullanılan bir bitkidir. *Urtica dioica*'nın polifenoller de dahil olmak üzere biyoaktif doğal ürünler içeriğinin, güçlü sitotoksitesine ve anti-kanser aktivitesine katkıda bulunan antioksidan, anti-mutajenik ve anti-proliferatif özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir (Esposito et al., 2019). *Urtica dioica*'nın meme kanseri tedavisinde antitümöral özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. *Urtica dioica* ekstraktlarının, kanser hücrelerinde, hasarlı veya anormal hücreleri ortadan kaldıran kendi kendini yok eden bir mekanizma olan apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Nafeh et al., 2023).

Bor (B), periyodik tablonun 13. grup elementlerinde metalik olmayan tek elementtir. Doğada B element formunda bulunmaz. Borik asit (BA), kernit, boraks, boratlar, üleksit ve kolemanitin bir bileşeni olarak bulunur (Kot, 2008). İnsanlarda uygulanan bor dozunun %90'ı solunum yolu epiteli, gastrointestinal dokuların mukozal membranları, ağız, vajina ve anüs tarafından emilir ve borik asit $B(OH)_3$ olarak vücutta eşit dağılır (Bakirdere et al., 2010). Borun çeşitli enzim ve minerallerin metabolik süreçlerini ve bağışıklık sistemi düzenlemesini değiştirebileceği de gösterilmiştir (Khaliq et al., 2011). Borun hem bazı bitkiler hem de hayvanlar için gerekli olduğu düşünülmektedir. Bor tarafından bağışıklık fonksiyonunun uyarılması, esas olarak bağışıklık hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını arttırmak ve salgılamayı arttırmak yoluyla olur. Borik asitin bazı kimyasal özellikleri kanser tedavisinde kullanılabilirliğini destekler (Ayodele, 2016). Borik asit yapısal olarak karbona benzeyen zayıf bir lewis asitidir ve karbon içerikli peptitaz,

proteaz gibi substratların inhibitörü olarak etki edebilmektedir (Bradke et al., 2008b). Hücre kültürü ve diğer çalışmalar ışığında çeşitli kanserler için borik asitin antiproliferatif etkileri olduğuna bilinmektedir (Barranco & Eckhert, 2006). Bor; testosteron, östrojen, glikoz ve insülin metabolizmaları üzerinde etki gösterir. Borik asit ile kompleks oluşturabilen; hidroksil grubu moleküller, glikoproteinler ve glikolipidler hücre zarı bütünlüğü için düzenleyici olabilirler (Nielsen, 2008). İn vitro ortamda borik asit kullanımı meme kanseri hücreleri üzerinde fayda sağlayacaktır (Barranco & Eckhert, 2004).a



2 GENEL BİLGİLER

2.1 Meme Anatomisi

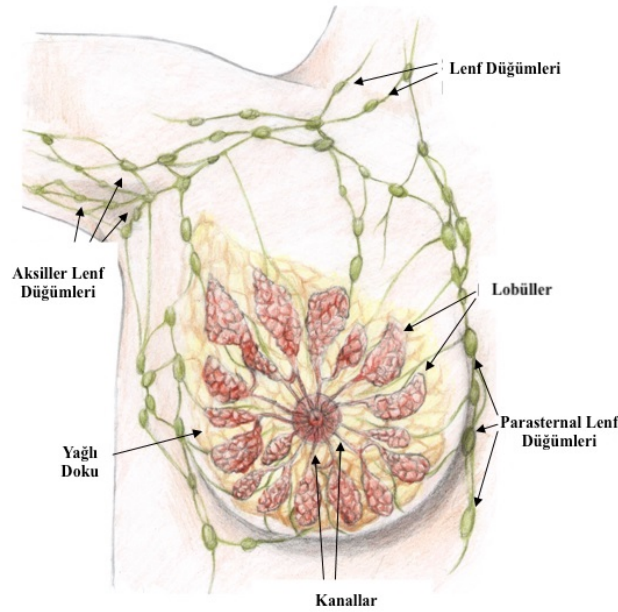
Hem erkeklerin hem de kadınların göğüsleri vardır. Meme, adipoz doku adı verilen yağlı dokudan oluşur. Kadınların memeleri genellikle erkeklerinkinden daha fazla glandüler doku içerir (Torre et al., 2016). Kadın göğüsleri daha küçük lobüllere ayrılan 12-20 lob içerir. Bu loblar ve lobüller birbirine süt kanalları ile bağlıdır. Memenin yağ dokusu bir sinir ağı, kan damarları, lenf damarları, lenf düğümleri tarafından sağlanır ve ayrıca fibröz bağ dokusu ve bağlardan oluşur (Tanis et al., 2001). Kadın memesi, bebekler için en uygun beslenmeyi sağlamak ve dışının kendisine cinsel zevk sağlamak için tasarlanmıştır. Göğüsler vücuttaki hormonal değişikliklere karşı çok hassas olan glandüler organlardır (Jagannathan & Sharma, 2017).

Adet döngüsü ile senkronize olarak döngüsel değişiklikleri benimserler. Kadınların genital sistemi ile yakından ilişkilidirler. Meme ucunun uyarılması, hipofiz bezinden prolaktin salgılanmasını artırır. Bu hormon aynı zamanda rahmi de etkiler ve kasılmalara neden olabilir. Göğüs dokularını boşaltan lenf bezleri de koltuk altlarında bulunur. Dişi bir bebek sahibi olduktan ve süt geldikten sonra, o bölgedeki meme dokusunun şişmesi nedeniyle annenin koltuk altlarında çarpıcı şişlikler gelişebilir. Göğüsler, meme uçları gibi her boyutta ve şekilde olabilir. Çoğu kadının bir memesi diğerinden biraz daha küçüktür (Brayboy et al., 2017).

Areola ve meme ucunun epidermisi çok fazla pigmentlidir ve bir dereceye kadar buruşuktur ve meme derisi birkaç apokrin ve sebace ter bezi ve biraz küçük saç içerir. 15-25 süt kanalları, süt sinüslerini sentezlemek için genişledikleri her yerde meme ucunun tabanına gider. Bu süt kanalları sütün meme uçlarına doğru taşıyıcı görevi görür (Hassiotou & Geddes, 2013). Meme ucunun yüzeyinin biraz altında, bu sinüsler koni şeklindeki ampullalarda son bulur. Küresel areola meme ucunun etrafında bulunur ve çapı 15 ila 60 mm arasındadır.

Cildinde yağ bezleri, ter bezleri ve lanugo kılları bulunur; Montgomery bezleri, areola epidermisindeki Morgagni tüberküllerine açılan küçük süt kanallarına sahip büyük, değiştirilmiş yağ bezleridir. Meme ucunun ve areolanın derinliklerinde, birkaç düz kas lifi, yoğun bağ dokusunda dairesel ve radyal olarak ve meme ucuna kadar uzanan laktiföz kanalların yanında uzunlamasına yerleştirilmiştir. Bu kas lifleri süt sinüslerinin boşalmasına, meme ucunun sertleşmesine ve areolanın kasılmasına neden olur.

Meme parankiminin büyük kısmı 2. veya 3. kaburga noktasından meme altı kıvrımına kadar aşağı doğru genişler. Yaklaşık 6. veya 7. kaburga noktasında ve sternum sınırından ön koltuk altı çizgisine kadar çapraz olan noktadadır. Meme dokusu ayrıca spence'in glandüler kuyruğu olarak koltuk altına doğru düzensiz bir şekilde genişler. Memenin arka yüzeyi pektoralis majör fasyasının segmenti, rektus abdominis kasları, dış abdominal oblik ve serratus anterior üzerinde durur (Love et al., 2004).



Şekil 1. Meme Anatomisi

2.2 Kanser

Kanser, genetik ve çevresel faktörlerden etkilenebilen hücrelerin normal olmayacak şekilde büyümeleri sonucu oluşan bir hastalıktır. Hücrenin genetik kodlarının saklandığı deoksiribo nükleik asit ipçikleri hücre içerisinde bulunur. İpçiklerin düzgün şekilde eşleşmemesi sonucu yeni yapı bir oluşur ve kontrol edilemeyen bir çoğalma ile istenmeyen kanserleşme gerçekleşir insan sağlığını hem fiziksel hem psikolojik olarak

etkileyen bu sağlık sorununun görülme sıklığı dünyada artarak devam etmektedir (Akyolcu et al., 2020). Globocan 2020 yılı verilerine göre dünya da 10 milyon kadar ölüm kanser sebeplidir (Bray et al., 2018).

2.2.1 Kanser İnsidansı

2016'da yaklaşık 4.064.000 yeni teşhis edilmiş kanser vakası rapor edildi ve bu da 293,9/100.000'lik bir kaba insidans oranıyla sonuşlandı. Tüm kanser vakaları için dünya standart popülasyonunda yaşa standardize edilmiş insidans oranı 186.5/100.000 idi. En sık teşhis edilen kanser türleri sırasıyla %20,4, %10,0, %9.8, %9,6 ve %7,5'i oluşturan ve tüm kanserlerin %57,3'n oluşturan akciğer, kolorektum, mide, karaciğer ve meme kanserleridir. Erkeklerde en sık görülen kanser akciğer kanseri (549.800; %24,6), bunu karaciğer kanseri (288.800; %12,9), mide kanseri (276.300; %12,4), kolorektal kanser (238.500; %10,7) ve yemek borusu kanseri (184.500; %8,3) izledi. Kadınlarda en sık görülen malignite kadın meme kanseri (306.000; %16,7) ve akciğer kanseri (278.300; %15,2) ikinci en yaygın kanserdi ve bunu kolorektal kanser (169.500; %9,3) ve tiroid kanseri (152.600; %8,3) izledi (Zheng et al., 2022). Tüm kanserler için kaba insidans oranları, 2000'den 2015'e kadar erkeklerde ve kadınlarda kademeli olarak arttı (Wei et al., 2020).

2.3 Kanser Risk Faktörleri

2.3.1 Cinsiyet

Meme kanseri genellikle kadınlara özgü bir hastalıktır ve erkeklerde nadir görülen bir malignitedir ve tüm kanser vakalarının %1'inden azını oluşturur (Giordano et al., 2002). Meme kanseri, hormonal dengesizliği olan, radyasyona maruz kalan ve ailede meme kanseri öyküsü olan yaşlı erişkin erkeklerde daha sık görülür ve erkeklerde bu hastalık için en yaygın risk faktörü BRCA2 geninin mutasyonudur (Abdelwahab Yousef, 2017).

2.3.2 Yaş

Meme kanserinde cinsiyetten sonra bilinen en önemli risk faktörü yaştır. Meme kanseri görülme sıklığı yaşla birlikte önemli ölçüde artmakta, menopoz çağında zirveye ulaşmakta, daha sonra giderek azalmakta veya sabit kalmaktadır. Bir vaka kontrol çalışmasında 50 yaş üstü meme kanseri görülme oranıyla ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, genç kadınlarda meme tümörleri daha büyük boyutlarda, ileri evrelerde, pozitif lenf düğümlerinde ve daha zayıf hayatta kalma oranlarında ortaya çıkmıştır (Momenimovahed & Salehiniya, 2019).

2.3.3 Alkol ve Tütün

Alkol tüketimi, dünya çapında kanser ölümleri için birincil risk faktörü olarak kabul edilir. Alkol tüketimi insanlar için kanserojen olarak sınıflandırılmıştır ve reaktif oksijen türleri oluşturduğu, vücudun besinleri parçalama yeteneğini bozduğu ve kandaki östrojen seviyelerini arttırdığı bilinmektedir (Li et al., 2019). Avrupa Prospektif Kanser ve Beslenme Araştırmasının (EPIC) sonuçları, alkol tüketimi ile hormon reseptörü pozitif ve hormon reseptörü negatif meme tümörleri arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları, alkol tüketim zamanının meme kanserine yakalanma riskini etkileyebileceğini ve ilk tam süreli hamilelikten önce alkol tüketenlerde meme kanserine yakalanma riskinin daha yüksek olduğunu göstermiştir (Romieu & Scocciati, 2015).

Tütün ürünleri, kritik kanser genlerinde karmaşık mutasyonlara neden olan nikotin ve uçucu organik bileşikler gibi çok sayıda kanserojen üretebilir (Hecht & Hatsukami, 2022). Meme kanseri tanısı konan kadınlar üzerinde yapılan bir araştırma, teşhisten bir yıl önce aktif sigara içenlerin meme kanseri, solunum yolu kanseri, diğer solunum yolu hastalıkları ve kardiyovasküler hastalıklardan ölme olasılığının hiç sigara içmeyenlere göre daha yüksek olduğunu bulunmuştur. Teşhis konulduktan sonra sigara içmeye devam eden kadınların meme kanserinden ölme olasılığı da daha yüksektir (Passarelli et al., 2016).

2.3.4 Fiziksel Aktivite

Fiziksel aktivite, seks hormonlarının seviyelerini düşürerek, insülin duyarlılığını azaltarak ve kolonik peristaltizmi artırarak kanser riskini azaltır (Cao, 2001). Yaşları 50-79 arasında değişen 74.171 kadınla yapılan prospektif bir kohort çalışmasının sonuçları, artan fiziksel aktivitenin menopoz sonrası kadınlarda meme kanserine yakalanma riskindeki azalmayla ilişkili olduğunu göstermiştir. Gözlemsel bir çalışmada araştırmacılar, meme kanseri tanısı konulduktan sonra yapılan fiziksel aktivitenin ölüm riskini azaltabileceğini belirtmişlerdir (Holmes et al., 2005). Egzersiz yapan kişilerde meme kanserine bağlı mortalite ve morbiditenin azaldığı diğer çalışmalarda da doğrulanmıştır (Momenimovahed & Salehiniya, 2019).

2.3.5 Obezite

Aşırı kilo ve obezite, uzun süreli inflamasyona ve oksidatif strese neden olabilir. Erkeklerde ve kadınlarda kanser yükünün sırasıyla %11,9'u ve %13,1'i obeziteye atfedilebilir. Obezitenin endometrial kanser, özofagus adenokarsinomu ve kolorektum, postmenopozal meme, prostat ve böbrek kanserleri riskini artırdığı gösterilmiştir (Avgerinos et al., 2019). Yağ dokusunda androjenik öncüllerin periferik aromatisasyon yoluyla östrojene dönüşme oranının daha yüksek olması nedeniyle obezite meme kanseri ile ilişkilidir. Öte yandan obeziteye yanıt olarak yüksek düzeyde insülin ve insülin benzeri faktörler, kanser hücrelerinin büyümesini uyarabilir (M.-J. Chen et al., 2016). Bir çalışmanın sonuçları, meme kanseri tanısı konulduğu sırada obez olan postmenopozal kadınların hastalısız sağkalım ve genel sağkalım oranlarının daha düşük olduğunu göstermiştir (Scholz et al., 2015).

2.3.6 Üreme Faktörleri

Çoklu üreme faktörlerinin meme kanseri riski ile ilişkisi iyi bilinmemektedir. Menarşta daha genç yaş ve menopozda daha ileri yaş meme kanseri riskinin artmasıyla ilişkilidir; bu durum potansiyel olarak bir kadının yaşamı boyunca yumurtlama sikluslarının sayısını ve östrojen maruziyetini yansıtır (Hamajima & Hirose, 2012). Doğurmuş kadınların doğumdan sonra meme kanseri riski, doğum yapmamış

kadınlara kıyasla başlangıçta daha yüksektir; bu risk, doğumdan yaklaşık 5 yıl sonra zirveye ulaşır ve yaklaşık 20 yıl boyunca yüksek kalır. Genel olarak, doğum sayısı daha fazla olan kadınların uzun vadede meme kanseri riski daha düşüktür ve sonraki her doğumda risk daha da azalır (Beral et al., 2002; Nichols & Schoemaker, 2019).

2.4 Kanser Önleme ve Kontrolü

2.4.1 Öncelikli Korunma

Birincil önleme çabaları, kanser yükünü azaltmak için en uygun maliyetli strateji olarak kabul edilir. Bu çabalar, kanser gelişimi ile ilişkili risk faktörlerine maruz kalmayı azaltmayı ve nüfusun kanser kontrolünde yüksek öncelikli bir husus olan kanser riskine karşı direncini artırmayı amaçlamaktadır. Tüm çabalar arasında, risk faktörlerini hedef alan aşılama ve eğitim müdahaleleri en önemli önleyici tedbirlerdir (Qu & Chen, 2014).

2.4.2 Kanser Kaydı

Kanser insidansını, morbiditesini, mortalitesini ve sağkalımını içeren kanser epidemiyolojisi, kanserin önlenmesi ve kontrolü için bilimsel bilgi sağlamak açısından çok önemlidir. Kanser kontrol programlarının temeli olarak kanser kayıt defteri, kanser epidemi sürveyansında, kanser kontrol programlarının değerlendirilmesinde ve kanser karşıtı stratejiler için rehberlikte çok önemli bir rol oynar (DR et al., 2011).

2.4.3 Kanser Taraması

Kanser gelişimi ile ilişkili risk faktörleri çeşitlidir ve bu nedenle yalnızca birincil koruma yoluyla kanser yükünü azaltmak zordur. Önemli sayıda yüksek kaliteli epidemiyolojik çalışma, belirli kanser türleri için taramanın, asemptomatik risk altındaki popülasyonlarda erken teşhis ve lezyonun çıkarılmasını sağlayarak kanser insidansını/mortalitesini etkili bir şekilde azaltabileceğini göstermiştir (Ding et al., 2022).

2.5 Meme Kanseri

Meme kanseri, dünya çapında kadınların maruz kaldığı en agresif kanser türüdür ve kadın kanser hastaları arasında ikinci önde gelen ölüm nedeni haline gelmektedir (Lee & Han, 2014). Her yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 250.000 kadına invaziv meme kanseri teşhisi konulmaktadır (Watkins, 2019). Meme kanseri hastalığının birincil nedeni, esas olarak hastaların genlerindeki genetik mutasyonları miras almasıyla ilgilidir (Majeed et al., 2014). Meme kanseri hızlı metastaz oluşmasına neden olabilmektedir ve bu da birincil tümörün meme kanseri hücrelerini kemik, karaciğer, akciğer ve beyin gibi uzak organlara kuvvetli bir şekilde yaymasına neden olur (Sree Kumar et al., 2010). Meme kanserinin metastatik özellikleri çoğunlukla yüksek tedavi edilemezlik oranından sorumludur (Sun et al., 2017). Meme kanseri tedavisindeki ilerlemeler tüm yaş gruplarında meme kanseri ölüm oranlarında bir azalmaya yol açsa da, genç yaş yüksek risk faktörü olmaya devam etmekte ve hayatta kalma oranı düşüktür (Lee & Han, 2014). Meme kanseri hastalarının erken tanısı, önleyici prosedürlerin geliştirilmesinin yanı sıra meme kanserinin hızlı ilerlemesinin önlenmesi açısından da önemlidir (Sun et al., 2017).

2.6 Meme Kanseri Belirtileri

2.6.1 Memede Kitle ve Ağrı

Kanser için ilk bulgu meme de bir kitlenin ele gelmesidir. Başlangıç evrelerde ağrı görülmemekle birlikte ilerleyen evrelerde ağrı meydana gelebilir (Atashi et al., 2020).

2.6.2 Meme Başı Akıntısı

Meme başı akıntısı her zaman kanser belirtici değildir. Gebelik sebebi ile oluşan çift taraflı akıntı normaldir ve bir hastalığa işaret değildir. İstenmeyen meme başı akıntısı genellikle tek taraflı kanlı olarak görülmektedir (Klarenbach et al., 2018).

2.6.3 Forge ve Retraksiyon Belirtisi

Meme başının tümörün bulunduğu yere doğru çekilerek yukarıda ve dolgun durması forge durumudur. Retraksiyon ise, meme dokusundaki tümör hücrelerin meme başında içe çekilerek oluşturduğu durumdur (Coşkun, 2019).

2.6.4 Meme Derisinde Ödem, Eritem, Ülserasyon

Kanserli hücrelerin artışı ile lenf damarları tıkanır ve dolaşımın bozulması meme derisinde ödem yapar. Damarların daha fazla tıkanması sonucu deri beslenmesi bozulur önce eritem sonra ise ülserasyon meydana gelir.

2.6.5 Portakal Kabuğu Görünümü

Meme kanserinin ileri evresinde görülür. Fazlaşan kanserli hücreler lenf damarlarının tıkanmasına yol açar ve sonucunda meme portakal kabuğu görünümü alır (Renzulli et al., 2019).

2.6.6 Lenf Nodüllerinde Büyüme

Tümör lenf nodüllerine yayılarak nodüllerinin tıkanmasına sebep olur. Genelde ağrısız kitleler, vücutta ateş ve kilo kaybı ile kendini gösterir (Feruza, 2021).

2.7 Meme Kanseri Risk Faktörleri

Epidemiyolojik çalışmalar, meme kanseri risk gelişimi veya ilerlemesi için farklı faktörleri ilişkilendirir (Sun et al., 2017). Geç evlilik yaşı, ilk doğum ve menopoz gibi risk faktörleri, hastalık gelişimi ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (Marphatia et al., 2017). Evlenme ve doğumda geç yaş, meme dokusu farklılaşmasının olmamasına, strojenik olmayan mutajenlere daha fazla maruz kalmaya ve östrojen tarafından genotoksisiteye yol açar (Dey et al., 2009). 50 yaşından sonraki menopoz, kadınları uzun süreli östrojen maruziyetine sokar (Dall & Britt, 2017). Erken gebelik ve daha uzun emzirme süresinin ER (Estrojen reseptörü) pozitif ve ER negatif meme kanseri riskini azalttığını gözlemlenmişler (Fortner et al., 2019). Dengesiz beslenme meme kanseri riski ile ilişkili başka bir faktördür. Vejeteryan olmayan ve yüksek hayvansal yağ diyeti uygulayan kadınların, vejeteryan diyeti uygulayan kadınlara göre meme kanseri gelişme riskinin daha yüksek olduğunu tahmin ediyor (Chang et al., 2017). Düşük fiziksel aktivite de meme kanseri riski ile ilişkilidir. Ev içi faaliyetlerle uğraşan kadınların, ev içi faaliyetlere katılmayan kadınlara kıyasla düşük meme kanseri riskine sahip olduğu belirlendi (Wirtz & Baumann, 2018). Obezite (yüksek bel-kalça oranı), menopoz sonrası kadınlarda meme

kanseri için başka bir güçlü risk faktörüdür ve ayrıca her yaşta kadında kötü hastalık sonucu ile ilişkilidir (Picon-Ruiz et al., 2017). Amerika Birleşik Devletleri'nde menopoz öncesi kadınların yaklaşık %18'i yüksek BKİ' (Beden Kütle İndeksi) ye sahiptir ve yüksek meme kanseri gelişme riski altındadır (Ma et al., 2018). BKİ' (Beden Kütle İndeksi) ≥ 5.0 ve karın çevresi ≥ 90 cm olan postmenopozal kadınların meme kanseri geliştirme olasılığının daha yüksek olduğu gözlemlendi (Recalde et al., 2021). Göğüs yağ dokusunda polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) aktivitesi ve birikiminden kaynaklanır. Göğüs yağ dokusunda PAH, meme kanseri gelişme riskini artırmak için hücrel östrojen reseptörü ile etkileşime girer (Niehoff et al., 2017). Meme kanserli obez kadınların, meme kanserli obez olmayan kadınlara göre daha kötü hastaliksız ve genel hayatta kalma oranlarına sahip olduğunu kaydetti (Picon-Ruiz et al., 2017). Meme dokusunda daha yüksek dozda alkol, alkol dehidrogenaz enzimi tarafından asetaldehite metabolize edilir. Birikmiş asetaldehit, proteinlere ve DNA'ya bağlanabilir ve BRCA1'i (Breast Cancer geni 1) aşağı doğru düzenleyerek antioksidan savunma sistemi, DNA sentezi ve onarım sistemine müdahale eder (Dumitrescu & Shields, 2005). Hormonal kontrasepsiyon formülasyonları daha düşük dozlarda östrojen içerir, ancak uzun süreli kullanımı kadınları yüksek meme kanseri riskine sokabilir (White, 2018).

2.8 Isırgan Otu

Isırgan otu (*Urtica Dioica*), Kuzey Afrika, Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'da yabancı olarak yetişir (Jakubczyk et al., 2015). Ham kurutulmuş toz, infüzyon (bitki çayı), kuru ekstrakt, kaynatma veya taze meyve suyu gibi türevleri fitoterapide tartışmasız önemli kabul edilmektedir (Ait et al., 2015). Isırgan otu, formik asit, histamin ve asetilkolin gibi çeşitli biyokimyasallar ve flavonoidler, tanenler, fitosteroller, saponinler, proteinler ve amino asitler gibi değerli bileşikler içerir (Ogles & Yalcin, 2012). Isırgan otunda bulunan flavonoidler arasında flavonoller, flavanonlar ve flavonoid glikozitler bulunur. Isırgan otunun toprak üstü kısımlarının su ve alkollü ekstraktları tiamin, riboflavin, piridoksin, folik asit, nikotinik asit ve askorbik asit gibi vitaminler içerir. Isırgan otu üzerinde yapılan araştırmalar, kersetin, trans-ferulik asit, beta-sitosterol, erusik asit, dotriakotan, ursolik asit, skopoletin, rutin ve p-hidroksilbenzalkol gibi çeşitli bileşiklerin izolasyonu ile sonuçlanmıştır (Ji et al., 2007). Isırgan otu, "farmakognozinin

babası" Dioscorides'in en beğenilen evcil bitkilerinden biri olduğu için antik çağlardan beri kullanılmaktadır. Anti-proliferatif ve antimikrobiyal aktiviteye sahiptir ve bulaşıcı hastalıkları iyileştirdiği kanıtlanmıştır.



Şekil 2. Isırgan otu yaprağı

Bitkilerin yapısında bulunan flavonoidler gibi birçok doğal fitokimyasalların tümör baskılama ve kanser üzerinde etki gösterebilen birçok protein ve gen ekspresyon durumlarını değiştirdikleri, böylelikle anti-karsinojenik etki yarattıkları bilinmektedir (Aggarwal et al., 2004). Isırgan otu, adjuvan terapötik bir ajan olarak kullanılabilir (Fattahi et al., 2018b). Antiproliferatif etki ile tümör büyümesini yavaşlatarak kanser tedavisi sağlayabilir (Abu-Dahab, 2007). Ayrıca ısırgan otu kemoterapide destekleyici etkiye sahiptir (Durak et al., 2004). Tümörlerinin büyümesini azaltabildiği ve indükleyebilmesi ile meme kanserine tedavi sağlayabilir (Mohammadi et al., 2017). İnsan meme kanseri hücre hatlarında adenzin ve poliamin denge sisteminde anahtar düzenleyici enzimler olarak ornitin dekarboksilaz ve adenzin deaminazı hedef alır hücre büyümesini inhibe ederek apoptozu indükler (Fattahi et al., 2018).

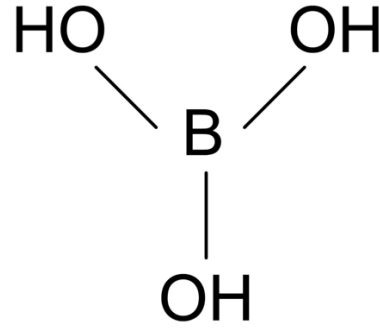
2.9 Bor

Periyodik tabloda 3A grubunda bulunan bor, ametallerden daha iyi iletkenlik özelliğine sahip bir yarı metaldir. Kimyasal sembolü B'dir. Atom numarası 5 olan borun atom ağırlığı ise 10,81 g/mol'dür (Restuccio et al., 1992). M.Ö 2000'li yıllarda, Babil uygarlığı tarafından kullanıldığına dair veriler bulunmaktadır. Türkiye bugün dünya bor rezervlerinin %72'sini barındırarak lider konumda yer almaktadır (Yenmez, 2011).

Borik asit, borun en yaygın çözünebilir formudur. H_3BO_3 kimyasal formülüne sahip olan borik asit, beyaz granül şeklinde, renksiz, kokusuz ve şeffaf kristal yapıda bulunur. Aynı zamanda ortoborik asit olarak da bilinen bor, bir Lewis asitidir. Bor, birçok bitki ve hayvan için önemli bir elementtir ve hem insan hem de hayvan dokularında düşük konsantrasyonlarda bulunur. Hayvanlarda, diyetlerinde 0.3 mg/kg bor bulunması ve tolere edilebilir en yüksek bor seviyesi olan 150 mg/kg'a kadar bor eksikliği görülmeyebilir (Barranco & Eckhert, 2004).

Borik asit vücuttan üriner sistem yoluyla atılır ve metabolize edilmez. Bor, vücutta yumuşak dokularda birikme eğilimi göstermez ve yarı ömrü yaklaşık olarak 1 gün kadardır. Bununla birlikte, kemik dokuda borik asidin artmış bir birikme özelliği bulunmaktadır (Qureshi et al., 2001). Diyetle alınan bor, başlangıçta ince bağırsak mukozasında borik asite dönüşerek pasif difüzyon yoluyla absorpsiyona uğrar ve bu şekilde dolaşım sistemine transfer olur (Henderson et al., 2015). Borik asit ve boratlar, oksijenle yüksek enerji gerektiren kimyasal bağların koparılması nedeniyle metabolize edilmez. Vücuda alınan borik asidin yaklaşık %50'si ilk 12 saat içinde böbrekler tarafından metabolize edilmeden atılır, kalan miktar ise azalan düzeylerde 7 gün boyunca atılır. Bor ve borik asidin insan sağlığı üzerindeki faydalı etkileri fark edildiğinden beri araştırmalar devam etmektedir. Bu maddelerin genital sistem üzerinde etkileri, endokrin sistemi aracılığıyla gerçekleşir (Ayodele & Ayodele, 2016).

Diyetle alınan borun kemik sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinmektedir. Bor ve türevlerinin immün sistem ve inflamasyon sürecinde etkin rol oynayan eikozanoid yolak üzerinde etkileri olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, bor ve bileşiklerinin LDL, trigliserid ve kolesterol seviyelerini düşürerek HDL kolesterolü artırarak kolesterol bozukluğunda faydalı olabileceği düşünülmektedir (Scorei et al., 2008). Yüksek dozda borik asit alınması, kısa süre içinde ataksi, depresyon, konvülsiyon ve benzeri etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Ayrıca, borun özellikle üreme sistemi üzerinde etkili olduğu ve yüksek dozlarda hamilelik sırasında gelişimsel anomalilere yol açabileceği belirtilmektedir (K. A. Henderson et al., 2015).



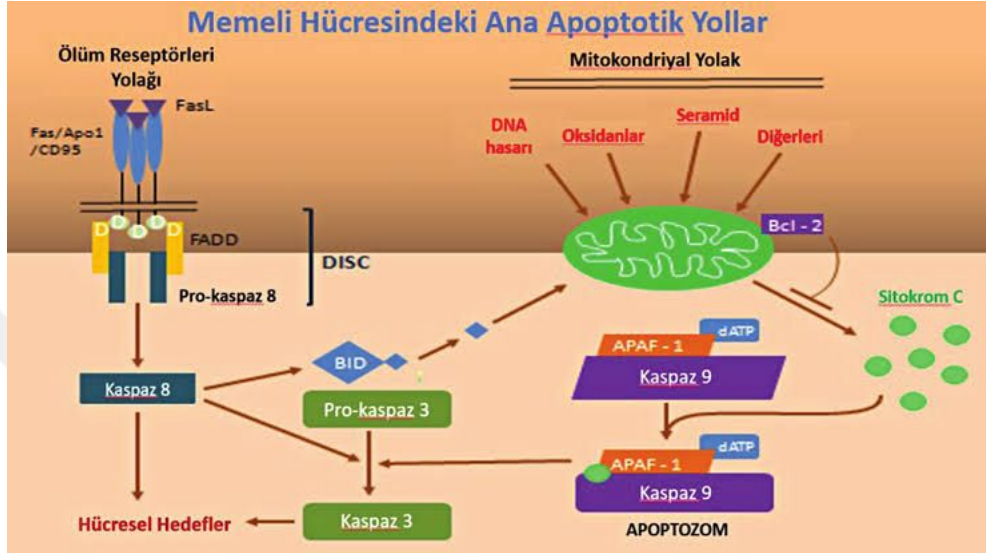
Şekil 3. Borik asidin kimyasal yapısı

Borik asit, borun plazmada dolaşan formudur ve medikal tedavilerde potansiyel olarak kullanılabilceği konusunda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu bilimsel araştırmalar, borik asidin kanser tedavisinde etkili olabileceğini gösteren verilere dayanan olumlu destekleyici unsurları içermektedir. Borik asidin yapısı, karbon atomuna benzeyen bir yapıya sahiptir ve zayıf bir Lewis asittir. Bu yapı nedeniyle, karbon içeren birçok madde için kompetitif inhibitör olarak davranabilir. Bu özelliği sayesinde borik asit, proteozomaz, proteaz, arjinaz, peptidaz, transpeptidaz ve nitrik oksit sentaz gibi bazı enzimlerde güçlü bir şekilde inhibisyon yapabilir. Ayrıca, borik asidin düşük toksik seviyeleri ve metabolize edilmeden hızlı bir şekilde idrar yoluyla atılması, farmakolojik özellikleriyle birlikte kanser tedavisi için ilgi çekicidir (Bradke et al., 2008).

2.10 Apoptoz Mekanizması

Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, gen seviyesinde ince bir şekilde düzenlenir ve DNA hasarını takiben veya gelişim sırasında meydana gelenler gibi hasarlı hücrelerin düzenli ve verimli bir şekilde çıkarılmasıyla sonuçlanır (Fuchs & Steller, 2011). Apoptoz mekanizması karmaşıktır ve birçok sinyal yolunu içerir. Apoptoz, bir hücrede kaspaz aracılı dışsal veya içsel yollar yoluyla tetiklenebilir. Her iki yol da efektör apoptotik kaspazları aktive etmek için birleşir ve sonuçta apoptozun özellikleri olan morfolojik ve biyokimyasal hücresel değişikliklere neden olur (Wong, 2011). Genellikle, pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein düzenleyiciler arasındaki denge, bir hücrenin apoptoz geçirip geçirmediğini belirlemek için kritik bir anahtar noktadır. Kanser öncesi lezyonlarda DNA hasarının bir sonucu olarak apoptozun indüklenmesi, potansiyel olarak zararlı hücreleri ortadan kaldırabilir ve böylece tümör büyümesini bloke edebilir.

Bu ölüm sürecinin kuralsızlaştırılması, kontrolsüz hücre proliferasyonu, kanserin gelişimi ve ilerlemesi ve ilaç tedavilerine karşı kanser direnci ile ilişkilidir (Fulda, 2009). Bu nedenle, apoptozun kuralsızlaştırılması, kanserin ayırt edici özelliklerinden biri olarak kabul edilir (Hanahan & Weinberg, 2011).



Şekil 4. Apoptoz da görülen sinyal yolları

2.11 Markerler

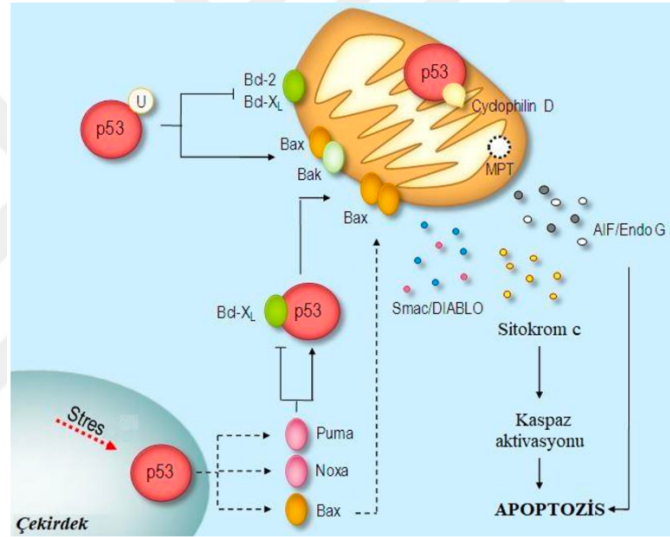
2.11.1 P53

p53, bir tümör baskılayıcı proteindir. Stresli koşullar altında apoptozu ve DNA onarımını teşvik ederek hücre büyümesini sıkı bir şekilde düzenler. Mutasyona uğradığında, işlevini kaybederek anormal hücre çoğalması ve tümör ilerlemesine neden olur. Mutasyonuna bağlı olarak, proteinin negatif işlev kazanmasına yol açan agregatlar oluşur. Mutant ilişkili agregasyon birkaç kanser dokusunda gözlenmiştir ve tümör büyümesini teşvik ettiği gösterilmiştir. Kanserde, protein yanlış katlanması/agregasyonu esas olarak p53 proteinini etkiler (Kanapathipillai, 2018).

P53, tümör büyümesi sırasında hücre döngüsünü, DNA replikasyonunu ve kontrolsüz hücre bölünmesini kontrol ettiği için tümör baskılayıcı protein olarak

adlandırılır. P53 proteini mutasyona uğradığında veya kümелendiğinde, işlevini kaybederek tümörün ilerlemesine ve büyümesine neden olur (Luo et al., 2017).

Normalde, p53 proteinleri hücreler stres yaşadığında ve kontrolsüz bölünme ve proliferasyona uğradığında kapatılır ve aktive edilir (Harris & Levine, 2005). Kontrolsüz hücre büyümesi ortaya çıktığında, p53, p21 ekspresyonunu indükleyerek hücre döngüsünün durmasına yol açar (Georgakilas et al., 2017). Hasar onarılamaz olduğunda, p53, Bcl-2 ailesinin proapoptotik bir üyesi olan BAX dahil olmak üzere apoptozla ilgili genleri tetikleyerek programlanmış hücre ölümünü tetikler (Gottlieb & Oren, 1998).

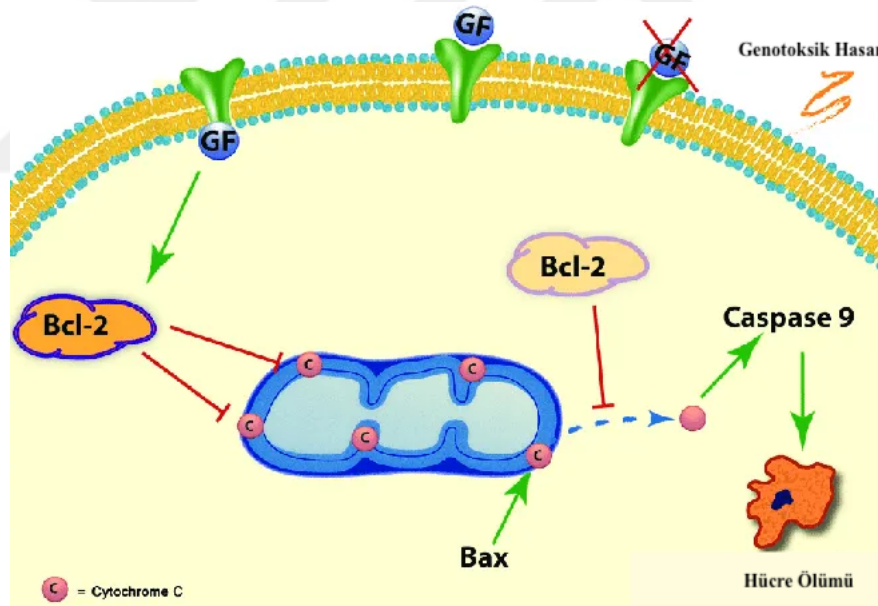


Şekil 5. p53 ve apoptotik yollar

2.11.2 BAX

Bax, apoptozu kontrol etmede çok önemli bir rol oynayan proapoptotik bir proteindir. Genellikle anti-apoptotik proteinlerle heterodimerize olan sitoplazmada bulunur. Bir hücre apoptotik bir uyarana maruz kaldığında, Bax proteini mitokondriye yer değiştirir. Artan Bax ekspresyonu, erken apoptozu aracılık eder. Bcl-2 ailesi üyeleri, BH1, BH2, BH3 ve BH4 olmak üzere dört homoloji türünden en az birini paylaşır (Wolter et al., 1997). Yapıları, dokuz α sarmalına ve mitokondriyal kaplamaya bağlı bir transmembran terminal C ile çekirdeğe gömülü bir hidrofobik α -helikse sahip homodimerler veya heterodimerler olabilir. Bax aktivasyonu, ısı, pH değişimi ve stres

koşulları gibi çeşitli abiyotik faktörler tarafından başlatılabilir. p53, stres ortamında Bax'ı bir uyarıcı yanıtı olarak yukarı doğru düzenler ve Bax gibi akış aşağı hedef genleri daha da etkinleştirir. Bax geni ilk önce önemli proapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinden biri olarak rapor edildi. İnsan Bax geni, 19q kromozomunda bulunur ve altı ekzon ve dört varyanttan oluşur (M. C. Wei et al., 2001). Bax geninin kodlama bölgelerindeki ve promotörlerindeki mutasyonlar ve değişikliklerin, çeşitli malignitelerde protein ekspresyonunu ve fonksiyonunu etkilediği tespit edilmiştir (K. Chen et al., 2007). Bax genindeki mutasyonlar çok siktir ve tümör baskılayıcı fonksiyonun kaybına ve apoptoza ve kemoterapiye dirençle sonuçlanır (Miquel et al., 2005). Bax'ın tek nükleotid polimorfizmi (SNP) geni, yani -125 nükleotidde, transkripsiyonun başlangıcından itibaren bir G'den A'ya geçiş ve translasyon başlangıcından itibaren -248 nükleotidde, kanserde fark edilmiştir. Bu SNP, kanser gelişimi ve kemorezistans ile ilişkili değiştirilmiş mRNA/protein ekspresyonu ile bağlantılıydı (Moshynska et al., 2005).



Şekil 6. BAX ve apoptotik yollar

2.11.3 Sitokrom C

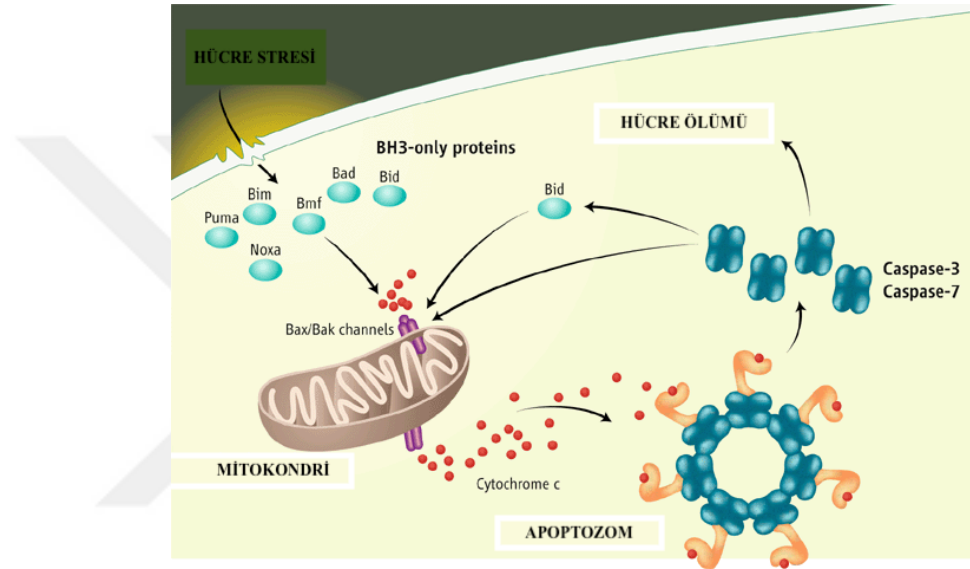
Sitokromlar ilk kez 1925 yılında David Keilin tarafından tanımlanmış ve adlandırılmıştır. Maya hücrelerinden, hayvanlardan ve bitkilerden alınan dokuların

absorpsiyon spektrumlarında dört absorpsiyon bandı bulunmuş, bu dört absorpsiyon bandından, "sitokrom" adını verdiği bir "hücrel pigment" tanımlanmıştır. a, b ve c olarak tanımlanan üç bileşikten oluşması önerilmiştir (Bose et al., 1925). Mitokondriyal solunum zincirindeki rolleri belirlenmiştir. Sitokrom b; koenzim Q - cyt-c' nin alt birimlerinden biridirredüktaz (kompleks III) ve sitokroma; sit c oksidazın (kompleks IV) alt birimlerinden biridir (Slater, 2003). Sitokrom C (cyt-c), kompleks III ve IV arasında, mitokondriyal zarlar arası boşlukta bulunan monomerik bir proteindir (Pérez-Mejías et al., 2019).

Sitokrom C, mitokondriyal solunum zincirinin bir elektron taşıyıcısıdır. Mitokondriyal dış zarın geçirgenleşmesi üzerine Sitokrom C, apoptozun içsel yolunu tetiklediği sitoplazmaya salınır. Apoptoz inhibisyonu, kanserin ayırt edici özelliklerinden biridir ve tümörlerde indüksiyonu, yaygın olarak kullanılan bir terapötik yaklaşımdır. Apoptoz inhibisyonu ve indüksiyonu, sırasıyla azalmış ve artmış serum Sitokrom C seviyeleri ile ilişkilidir. Proapoptotik uyarılar üzerine, mitokondriyal dış zar geçirgenleşir ve Sitokrom C'nin mitokondriyal zarlar arası boşluktan sitoplazmaya akışını tetikler (Kuwana et al., 2002). Sitoplazmada, Sitokrom C apoptotik proteaz aktive edici faktör-1'e (Apaf-1) bağlanarak, hücrel bileşenleri parçalayarak apoptozu gerçekleştiren bir proteaz sınıfı olan kaspazların aktivasyonuna neden olan bir dizi biyokimyasal reaksiyonla sonuçlanır (Slee et al., 2001). Apoptoz, kanserde en yüksek öneme sahip bir süreçtir. Birincisi, genellikle kanser hücrelerinde inhibe edilir (Mohamed et al., 2017). İkinci olarak, kanser hücresi apoptozisinin uyarılması olağanüstü terapötik potansiyele sahiptir (Pfeffer & Singh, 2018). Mitokondriyal dış zar geçirgenliği, apoptozun içsel yolunun tetiklenmesinde geri dönüşü olmayan bir nokta olarak kabul edilir (Singh et al., 2019). Doğrudan sonuçlarından biri, Sitokrom C'nin mitokondriyal zarlar arası boşluktan sitoplazmaya akışıdır. Kanser dokularında azalmış Sitokrom C seviyeleri tespit edilmiştir, bu da apoptoz inhibisyonunu düşündürür. Sitokrom C'nin kanser hücrelerinin apoptozunu indükleme kapasitesi, kanser hücrelerinin sitoplazmasına taşınması ve salınması için çeşitli moleküler araçların geliştirilmesine ilham vermiştir (Delinois, 2021).

Sitokrom C dağıtım sistemleri genel olarak füzyon proteini bazlı sistemler ve nanopartikül bazlı sistemler olarak ayrılabilir. Yaygın sitotoksiteden kaçınmak için

birçoğu, kanser hücrelerinin yüzeyinde spesifik olarak ifade edilen bir zar proteinini tanıyan bir protein veya peptit içerir. Bu modifikasyon, Sitokrom C dağıtım sisteminin bu hücreler tarafından seçici olarak tanınmasını ve endositozunu destekler. Olası sitotoksik etkileri en aza indirmek için, endositenmiş ekzojen maddeler hızla lizozomlara aktarılabilir ve bu da bunların lizozomal bozunmasına neden olur. Bu koruyucu mekanizma, endosite edilmiş bir ilacın terapötik etkisine engel oluşturabilir (Pessoa, 2022).

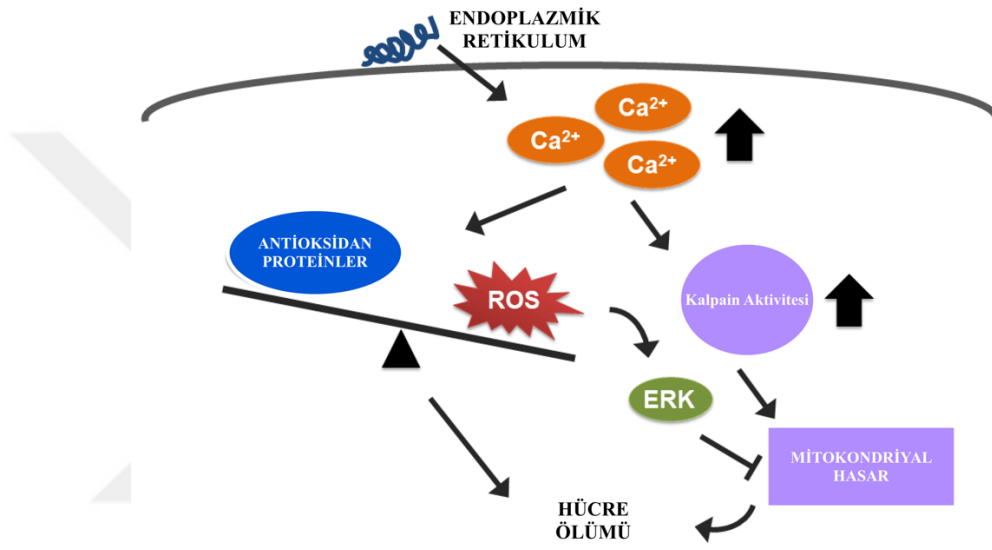


Şekil 7. Sitokrom C ve apoptotik yollar

2.11.4 Kalpainler

Kalpain sistemi, hücre döngüsü, hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi, hücresel proliferasyon, göç, kanser hücresi istilası, metastaz, hayatta kalma, otofaji, apoptoz ve sinyalleşmenin yanı sıra çok çeşitli bozuklukların patogenezi dahil olmak üzere birçok önemli fizyolojik süreç için gereklidir. Kalpainler, kanser ilerlemesi sırasında önemli sinyal molekülleri olan spesifik substratlarının proteolizini katalize ederek ve düzenleyerek kanserin ilerlemesine aracılık etmede yer alan, hücre içi korunmuş kalsiyumla aktive olan nötr sistein proteinazlardır (Nian & Ma, 2021). Kalpain ailesi ondan fazla üyeden oluşmasına rağmen, μ -kalpain ve m-kalpain en sık tanımlananlardır ve her yerde ifade edilirler. Kalpastatin, μ -kalpain ve m-kalpainin endojen inhibitörüdür ve çoklu izoformları ve ek varyantları vardır. Kalpain, kanser ve uzuv-kuşak kas distrofisi

tip 2A (LGMD2A) ve nörodejenerasyon dahil olmak üzere bir dizi başka hastalık durumuyla bağlantılıdır. Kalpain aktivitesi, fokal adezyon kinaz ve talin gibi fokal adezyon proteinlerinin proteolizi yoluyla hücreSEL göç ile bağlantılıdır. Kalpain, nükleer faktör- κ B ($\text{I}\kappa\text{B}$) inhibitörlerinin bölünmesi yoluyla hücrenin hayatta kalmasıyla bağlantılıdır. Kalpain, BCL-2 ailesi üyelerinin, kaspazların ve apoptozu indükleyen faktörün bölünmesi yoluyla apoptoz ile bağlantılıdır. Kalpain ve kalpastatin ekspresyonu, tümörün ilerlemesi ve terapilere yanıt ile ilişkilendirilmiştir (Storr et al., 2011)



Şekil 8. Kalpain mekanizması

3 MATERYAL VE METOT

3.1 Ekstraksiyon ve Standardizasyon

3.1.1 Bitkisel Materyal

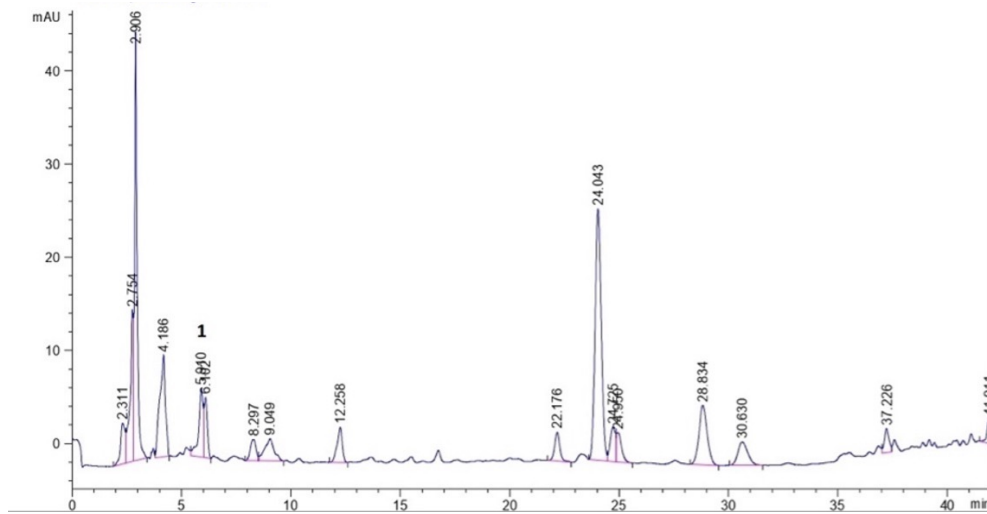
Urtica dioica L. (ısırgan otu) toprak üstü kısımları kuru droglar olmak koşuluyla aktardan, borik asit Sigma-Aldrich (B6768) temin edilmiştir.

3.1.2 Ekstraksiyon

Çalışmada kullanılan bitki örnekleri, Avrupa Farmakopesi standartlarına uygunluğu kontrol edildikten sonra uygun boyutta öğütüldü. Daha sonra, farklı oranlarda farmakopeye uygun çözücüler (etanol-su, 1:1 hacim/hacim veya etanol-su, 1.5:0.5 hacim/hacim vb., etanol, metanol, su vb.) kullanılarak çeşitli ekstraktlar hazırlandı. Bitki materyalleri, uygun çözücüler içinde 30 dakika boyunca ultrasonik banyoda ekstrakte edildi. Ardından, ekstraksiyon verimleri hesaplandı ve ekstraksiyon verimine bağlı olarak gerektiğinde 24 saat boyunca çalkalamalı maserasyon yöntemiyle ekstraksiyon yapıldı.

3.1.3 Standardizasyon

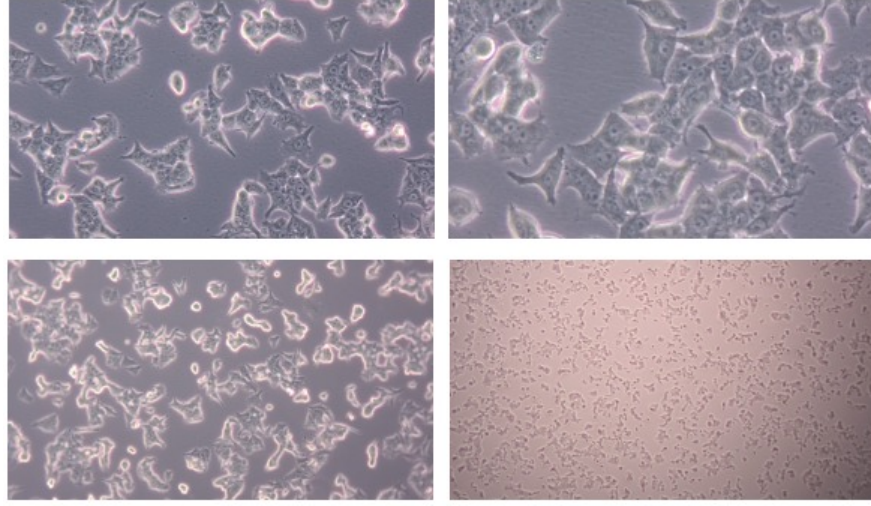
HPLC analizleri Agilent 1100 HPLC sistemi üzerinde UV dedektörü kullanılarak gerçekleştirildi. Sabit faz olarak C18 kolon (250x4.6mm10µm) kullanıldı ve mobil faz olarak A: asetonitril: su: formik asit (10:89:1), B: su: asetonitril: formik asit (89:10:1) gradient akışı ile çalışıldı. Akış hızı 0.7 mL/dk olarak ayarlandı. Pikler 330 nm'de tespit edildi. Çalışılan ekstraktlar 10 mg/mL konsantrasyonda incelendi ve metanolde çözüldükten sonra 0.22 mikron membran filtreden süzülerek analiz edildi. Enjeksiyon hacmi 20 µL olarak ayarlandı ve kolon sıcaklığı 40°C olarak sabitlendi (Şekil 9) (Karadağ et al., 2019).



Şekil 9. Isırgan ekstresi (10 mg/mL) HPLC kromatogramı

3.1.4 Hücre Kültürü

Hücre kültürünün temel prensibi, canlı dokulardan çeşitli yöntemler ile alınan parçaların in vitro ortamda canlılık ve üreme gibi faaliyetlerini sürdürebilmesidir (Freschney, 2005). MCF-7 insan meme kanseri hücreleri, %10 fetal sığır serumu (FBS), 2 mM glutamin, 0.01 mg/ml insülin ve %1 penisilin/streptomisin karışımı içeren düşük glikozlu Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle ortamında (DMEM) 1×10^6 hücre/şişede T25 şişelerinde ekilmiş ve %5 CO₂ atmosferinde 37°C'de inkübe edilmiştir. Ortam yenilemesi haftada 2 kez gerçekleştirilmiş, hücreler ise haftada 1: 3'lük bir alt kültürasyon oranında pasajlanmıştır (Comşa et al., 2012). Alternatif bir hücre kültürü ortamı, antibiyotikler/antimikotikler ve %10 FBS ile desteklenen DMEM olacaktır (Comşa et al., 2015).



Şekil 10. MCF-7 hücrelerinin mikroskopta görünümü

Hücreler stok yapılması amacı ile dondurulmuştur. Geliştirilmiş olan hücre canlılığı ve çözündürme işleminde sonra hücrelerin geri kazanımı amacıyla dondurma solüsyonu fetal serumu içermektedir. Ayrıca bu solüsyon, en iyi oranda fetal sığır serumu (FBS) içermelidir çünkü gelişmiş hücre canlılığını ve çözündürmeden sonra hücrelerin geri kazanımı sağlanmalıdır. %10 FBS ve %1 DMSO karıştırılıp solüsyon hazırlanıp 1 ml tripsin ile hücreler toplanmıştır ve sonra cryo tüpler içinde -80°C 'de dondurulmuştur.

Hücreler çözündürülür iken mekanik hasar olmaması sebebiyle çözündürme işleminin hızlı olarak yapılması gerekmektedir. -80°C 'den çıkarılan hücreler, çözünmesi için 37°C 'lik su banyosunda bekletilmiştir. Bekleme bitince hücre kültür kabındaki 37°C ısıtılmış 9 mL RPMI 1640 (%10 FBS + %0.1 gentamisin) besiyeri hücrelerin üzerine dikkatli bir şekilde pipetaj yapılmasının ardından ilave edilmiştir.

Tablo 1. Deney Planı

Grup Numarası	Grup Adı
Grup I	MCF-7
Grup II	MCF-7 + Isırgan otu
Grup III	MCF-7 + Borik asit
Grup IV	MCF-7 + Isırgan otu + Borik asit

3.1.5 Hücre Patlatma

MCF-7 hücreleri flasklarda büyütüldü ve ardından tripsinizasyon işlemi uygulanarak hücreler flasktan çıkarıldı. Tripsin sonrasında, hücrelerin kalıntılarında ayrılması için 1500 rpm hızında 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra, hücre pelleti (çökeltisi) hücre mediumu ve tripsinden tamamen ayrılması için PBS ile yıkandı ve 1000 rpm hızında 5 dakika süreyle tekrar santrifüj edildi. Hücrelerin temizlenmesi için medium atıldıktan sonra, hücreler önceden soğutulmuş olan PBS ile 3 defa yıkandı. Hücrelerin stabil kalması ve tutulması için 1×10^6 hücre için, önceden soğutulmuş olan PBS'e 150-250 μ L eklendi. Dondurma-çözdürme işlemi birkaç kez tekrarlandı, bu şekilde hücrelerin dondurulması ve çözülmesi sağlandı. Dondurma-çözdürme işleminden sonra, 2-8 °C'de 1500 rpm hızında 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında, tüpün en altında kalan hücre parçaları bir pellet oluşturdu ve proteinler süpernatantın (üstte kalan sıvı kısım) içinde kaldı. Protein analizi veya diğer testler için süpernatantlar toplandı.

3.1.6 Hücre Sayımı

Tripan mavisi boyama, ölü hücreleri tanımlamak için uzun süredir devam eden ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Yalnızca sağlam zarları olan hücreler boyayı etkili bir şekilde dışlayabilir, bu nedenle tehlikeli zarları olan ölü hücreler lekelenir. Dilüsyon miktarı hücre sayımı yaparken güvenilirlik açısından önemli role sahiptir. Hücre süspansiyon ideal dilüsyonu için ortalama hücre sayısının 50, 150 aralığında tutulması gerekir. Hücre sayısının fazla çıktığı durumlarda tripan blue ve hücre karışımının hücre hacimi azaltılır tripan mavisi hacmi artırılır bu durum sonucu daha dilüe olan hücre süspansiyonu ortaya çıkarttıktan sonra hücre sayımı yinelenir. Sonuç olarak dilüsyon oranı yükseltilmiş olacaktır. Hücre sayısı yoğun çıktığı zaman 20 μ l hücre süspansiyonu, 80 μ l tripan mavisi alınarak yapılabilir. mL olarak hücre sayısını belirtmek için formül kullanılır. Hücre sayısında azlık veya fazlalık yok ise 10 mcg hücre 10 mcg %0,5 tripan mavisi olacak şekilde hazırlanır.

Tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 10 μ l 0,5 ml'lik endorfa alınır (Bizim elimizdeki protokole göre yaptığımız tripsinizasyon;

santrifüjden sonra falkonun üst kısmını boşaltıp 2 ml complete medium ekledik. Bu 2 ml complete mediumdan 100 µl alınır).

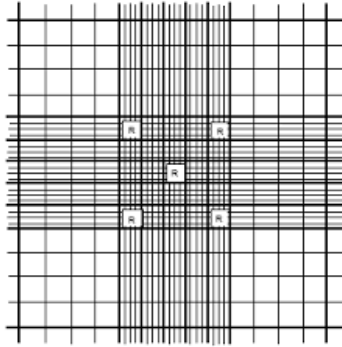
100 µl %0,5 tripan mavisi üzerine eklenerek iyice karıştırılır. Distile su ile toma lamı temizlenir. Toma lamı üzerine lamelin kaymaması için köşeleri distile su ile ıslatılır. Toma lameline ön arka bakarak yapışıklık durumunu kontrol ediyoruz. Lam üzerinde hücre sayımı yapılabilmesi için hazırlanan karışımdan 100 µl alınır ve toma lamı üzerine konulur. E harfi ile gösterilen bölge içinde ki hücreler sayılır. Toma lamında iki bölmede bulunan iki alanın ortalaması ayrı ayrı sayılarak belirlenir. Formüle göre hesaplama yapılır ve 1 ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplanır.

1 ml içindeki hücre sayısı = Sayılan hücre ortalaması x 10.000 x dilüsyon faktörü

Sayılan hücre ortalaması (iki E alanındaki hücrelerin sayılıp ikiye bölünmesi) yada (Zone 1 + Zone 2 + Zone 3 + Zone 4) /4 = X

X = Cell per 0.1 µl

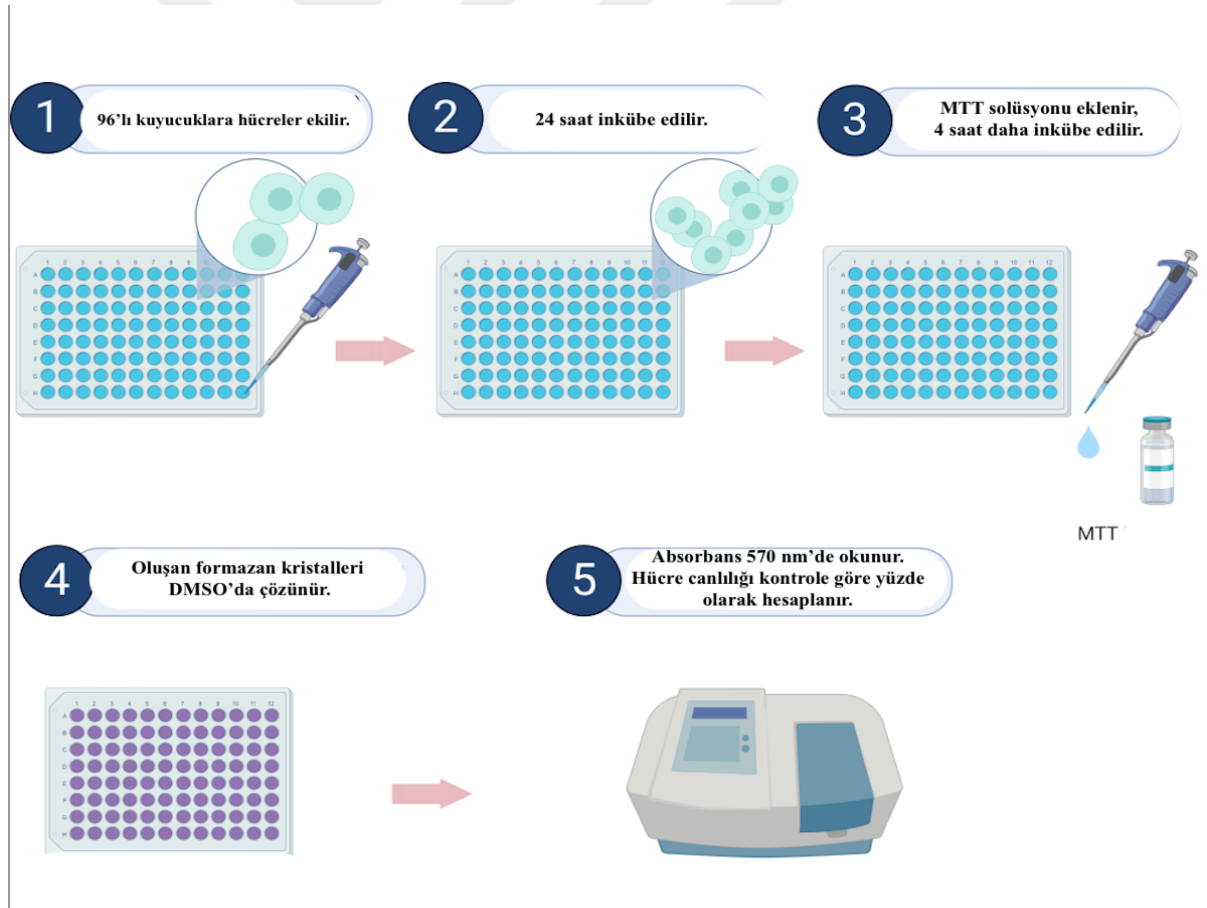
Dilüsyon faktörü (final hacim/hücre hacmi – ne kadar hücreye ne kadar boya koyulduysa, örneğin 10 mcg hücreye 10 mcg tripan mavisi koyulduysa; 20/10 = 2 – dilüsyon katsayısı)



Şekil 11. Hücre Sayımı

3.1.7 MTT Testi Yaparak Doz Ayarlanması

Hücre sayımı yapıldıktan sonra MTT (canlılık testi) yapıldı ve hücelere uygulanmış olan maddelerin hücrelerin yarısını öldüren doz olarak tanımlanan IC50 dozları belirlenmiştir. MTT testi yapabilmek için 96 kuyucuklu platelere, 100 µl besiyeri içerisine 10.000 hücre olacak şekilde MCF-7 hücrelerinin ekimi yapılmıştır. 2 mg/ml PBS ile hazırlanıp her bir kuyucuğa ilave edilmiş ve ardından hücreler 37°C'de, %5'lik CO₂ inkübatöründe 4 saat daha inkübe edilmiştir. 4 saatlik inkübasyonun sonunda, kuyular özveri ile boşaltılmıştır ve formazan kristallerini çözündürmek amacıyla 100 µl DMSO eklenmiştir ve 15-30 dakika arasında bekletilmiştir. Son aşamada mikropate okuyucu kullanılarak 570 nm'de, 630 nm referans alınarak okutulmuştur (Mohammadi et al., 2016).

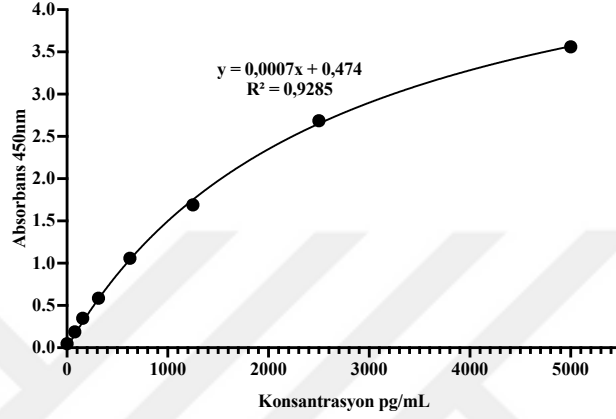


Şekil 12. MTT testi yapılışı

3.2 Biyokimya Parametrelerin İncelenmesi

3.2.1 P53 Düzeyinin Ölçümü

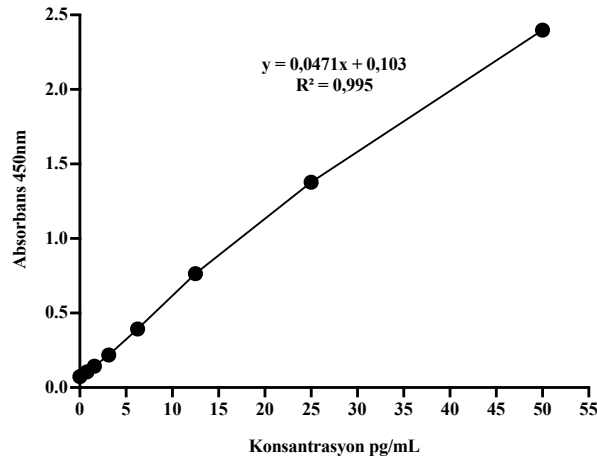
Hücre hattında P53 düzeyleri P53 ELISA ticari kiti kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 13).



Şekil 13. P53 kalibrasyon eğrisi

3.2.2 BAX Düzeyleri Ölçümü

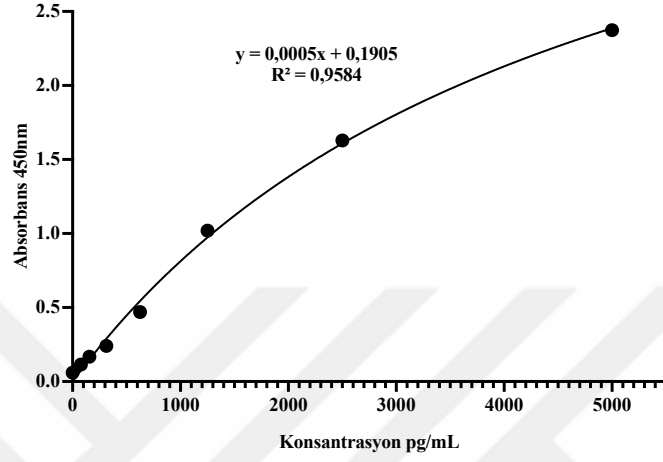
Hücre hattında BAX düzeyleri BAX ELISA ticari kiti kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 14).



Şekil 14. BAX kalibrasyon eğrisi

3.2.3 Sitokrom C Düzeyleri Ölçümü

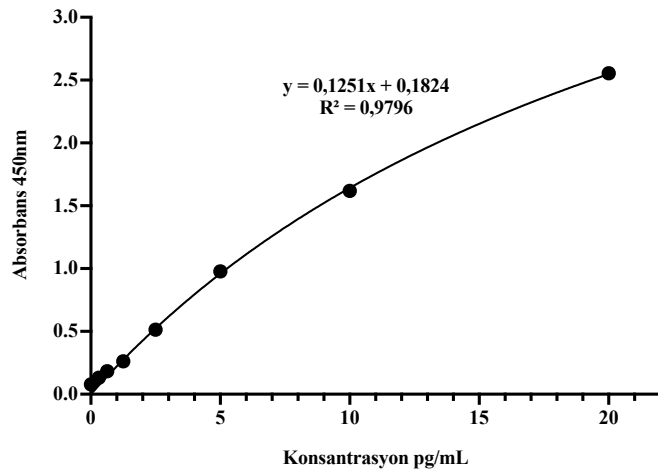
Hücre hattında Sitokrom C düzeyleri Sitokrom C ELISA ticari kiti kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 15).



Şekil 15. Sitokrom C kalibrasyon eğrisi

3.2.4 Kalpain Aktivitesi Ölçümü

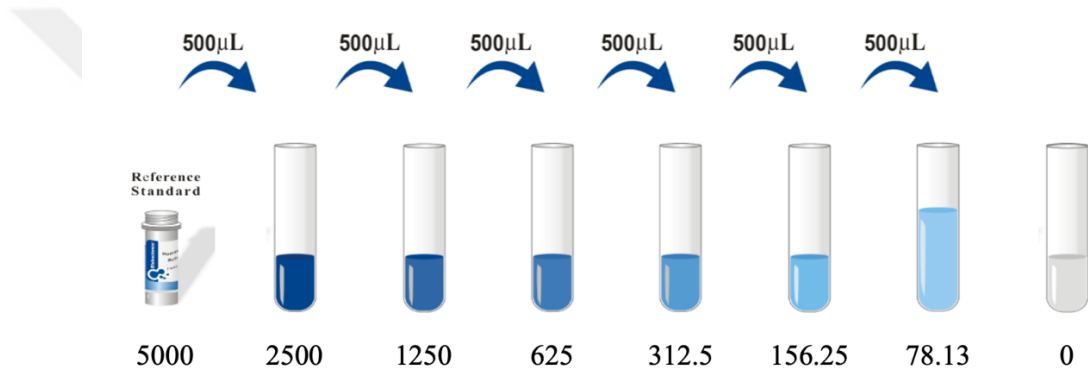
Hücre hattında Kalpain aktivitesi, Kalpain ELISA ticari kiti kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 16).



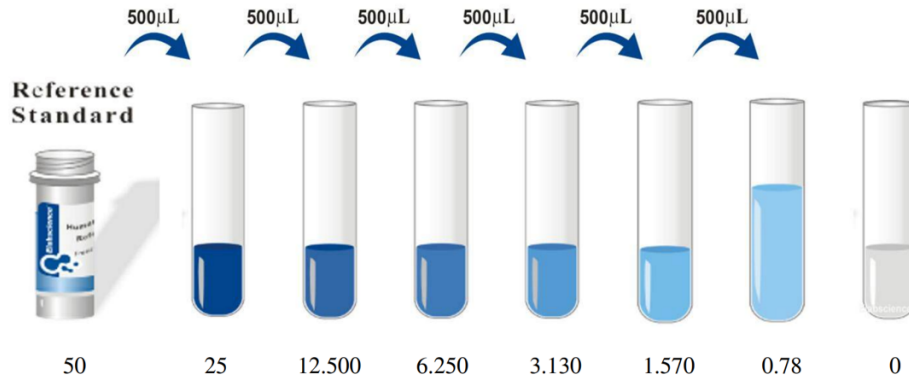
Şekil 16. Kalpain kalibrasyon eğrisi

3.2.5 ELISA Kiti Hazırlama ve Uygulama

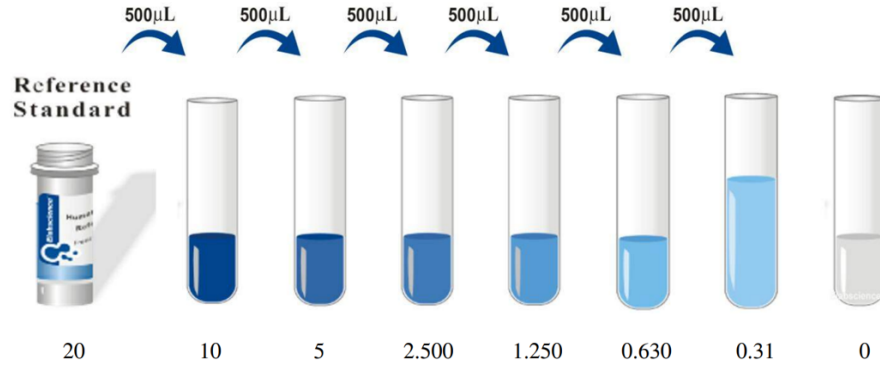
Reaktiflerin hepsi kullanım sağlamadan 20 dk önce buzdolabından çıkarıldı ve oda sıcaklığına (18-25 °C) getirildi. Maddeler kullanım sağlamadan önce oda sıcaklığına (18-25 °C) getirildi. Numuneler köpürtülmeden tamamen karıştırıldı. 25x Konsantre Yıkama Tamponunu 1x çalışma solüsyonuna dilüe edildi. Referans Standardı farklı konsantrasyonlara dilüe edildi. 100x Biyotinlenmiş Saptama Ab/Ag'yi, ilk aşama sonlandırılmadan 15 dakika önce 1x çalışma solüsyonunda dilüe edildi. 100x Konsantre HRP Konjugatını ikinci aşama sonlandırılmadan 1x çalışma solüsyonuna 15 dakika önce dilüe edildi. Son aşamaya başlandığında mikrolaka okuyucusu önceden ısıtıldı.



Şekil 17. p53 ve Cyt-C standartlarının farklı konsantrasyonlarının hazırlanması



Şekil 18. Bax standardının farklı konsantrasyonlarının hazırlanması



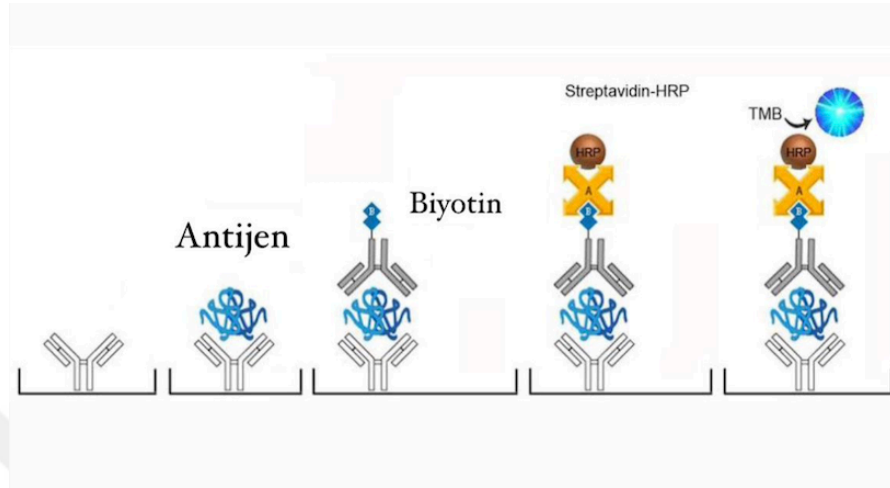
Şekil 19. CAPN1 standardının farklı konsantrasyonlarının hazırlanması

Dilüe edilmiş standart, kör ve madde için kuyucuklar belirlendi. Uygun kuyucuklara standart, kör ve maddenin hepsinin seyreltilmiş halinden 100 mikrolitre eklendi (Tüm maddelerin ve standartların iki kopya olarak test edilmesi önerilir). Plaka kitin içinde bulunan yapıştırıcı ile kapatıldı. 90 dakika 37°C'de inkübe edildi. Mikro ELISA plakasının dibine çözeltiler iç duvara değdirilmeden ve köpürtülmeden eklendi. Her kuyucuktan yıkamadan sıvılar boşaltıldı. Detection Ab çalışma solüsyonu 100 mikrolitre miktarınca her kuyucuğa eklendi. Plakayı yeni bir şeffaf yapıştırıcı ile plaka örtüldü. 37 °C'de 60 dakika inkübesi sağlandı. Her kuyucuktan sıvılar boşaltıldı ve kuyucuklara 350 mikrolitre miktarında yıkama tamponu eklendi. 1 dakika beklettikten sonra solüsyon her kuyucuktan boşaltıldı, temiz emici kağıt üzerinde kurulandı. Bu yapılan yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Yıkama adımlarında bir mikropilaka yıkayıcı kullanıldı. Kuyucukların kurumasına engel olundu.

HRP Konjugat çalışma solüsyonu kuyucuklara 100 mikrolitre olarak eklendi. Plakayı yeni bir şeffaf yapıştırıcı ile örtüldü. 30 dakika 37°C'de inkübesi sağlandı. Her bir kuyucuktaki çözeltiyi boşaltıldı, 3. adımda gerçekleştirildiği gibi yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı.

Her kuyucuğa 90 mikrolitre Substrat Reaktif eklendi. Plaka yeni bir şeffaf yapıştırıcı ile örtüldü. 37°C'de yaklaşık 15 dakika inkübasyon sağlandı. Plaka ışıktan korundu. Reaksiyon süresi, gerçek renk değişimine göre kısaltılabilir veya uzatılabilir, ancak 30 dakikayı geçemez. OD (optik yoğunluğunu) ölçümünden önce Microplate Reader'ı yaklaşık 15 dakika önceden ısıtıldı. Her kuyucuğa 50 mikrolitre Stop Solution

eklendi. Durdurma solüsyonunun eklenmesi, substrat solüsyonu ile aynı sırada yapıldı. 450 nm'ye ayarlanmış bir mikro plaka okuyucu ile her kuyucuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) aynı anda belirlendi.

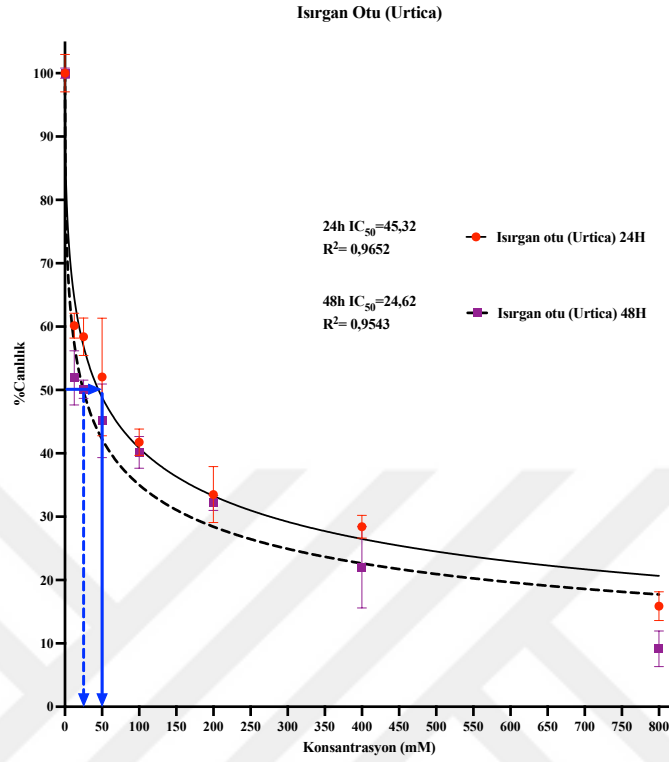


Şekil 20. ELİSA testin basamakları

3.3 Tüm verilerin istatistiksel analizinin yapılması ve yorumlanması çalışması

Veriler, istatistiksel olarak analiz edilmek üzere SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Windows 26.0 ve GraphPad Prism 9 programlarıyla değerlendirildi. Gruplar arasında değişken ölçümleri açısından fark olup olmadığını belirlemek için öncelikle dağılımların normal dağılıma uygunluğu incelendi. Parametrik verilerin normal dağılıp dağılmadığını belirlemek için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanıldı. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılması için Tek Yönlü Varyans Analizi (Oneway ANOVA) testi kullanıldı ve gruplar arasında çoklu karşılaştırmalar için TUKEY HSD testi uygulandı. Bulgular, ortalama \pm SD (standart sapma) olarak sunuldu. Normal dağılım göstermeyen verilerin karşılaştırılması için Kruskal-Wallis testi kullanıldı ve gruplar arasında çoklu karşılaştırmalar için TUKEY HSD testi uygulandı. Bu veriler, ortanca değer, 25. yüzdeler ve 75. yüzdelerle ifade edildi. Değişkenler arasındaki ilişkiyi göstermek için Pearson ve Spearman korelasyon testleri kullanıldı ve $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4 BULGULAR



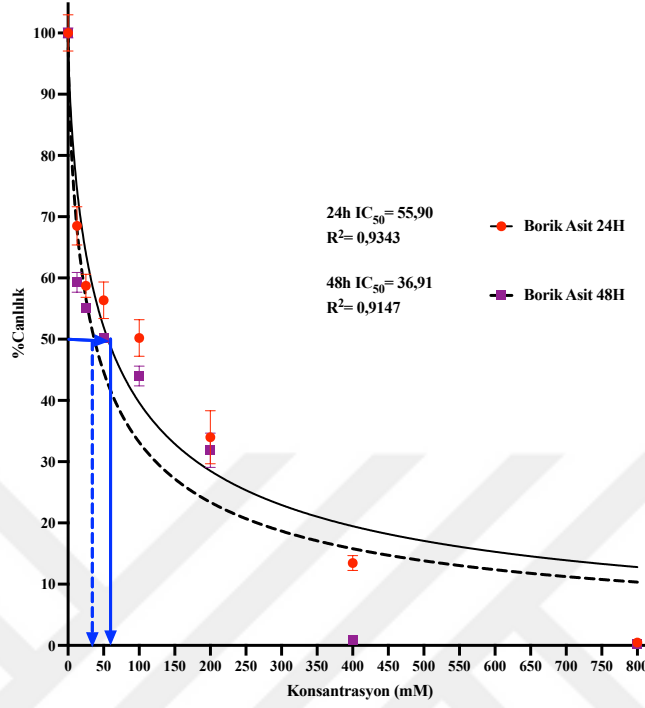
Şekil 21. 24 ve 48 saatlik ısırgan otu (urtica) konsantrasyonlarına göre MCF-7 hücre hattındaki canlılık değişimi

24 saatlik ve 48 saatlik ısırgan otu konsantrasyonlarına göre MCF-7 hücre hattındaki canlılık değişiminde biyoistatistik analizlerine göre 24 saatlik IC₅₀ değeri 45.32 μ M, 48 saatlik IC₅₀ değeri 24.62 μ M olarak saptanmıştır. Belirlenen doz 50 μ M olarak seçilmiştir (Şekil 20).

Tablo 2. 24 ve 48 saatlik ısırgan otu konsantrasyonlarına göre MCF-7 hücre hattındaki canlılık değişiminin%’lik kıyaslanması

Konsantrasyon (mM)	Isırgan Otu 24H (N=4) %	Isırgan Otu 48H (N=4) %
0	100,000	100,000
12,5	60,158	51,919
25	58,414	50,113
50	52,047	45,122
100	41,753	40,143
200	33,490	32,180
400	28,411	22,022
800	15,888	9,155

Borik Asit



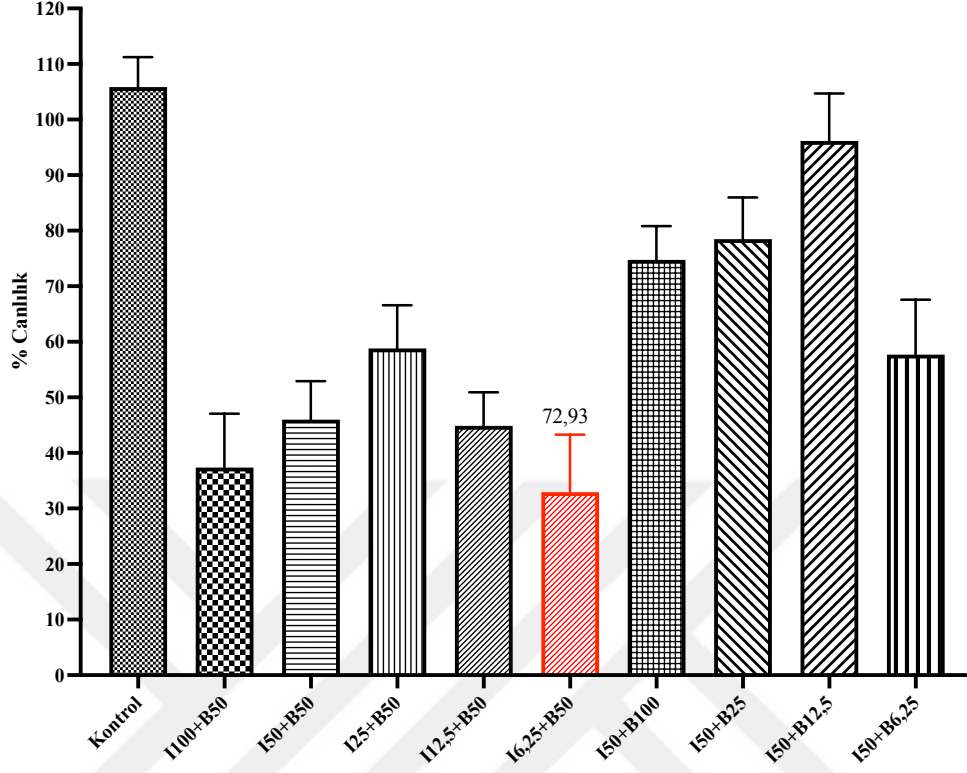
Şekil 22. 24 ve 48 saatlik borik asit konsantrasyonlarına göre MCF-7 hücre hattındaki canlılık değişimi

24 saatlik ve 48 saatlik borik asit konsantrasyonlarına göre MCF-7 hücre hattındaki canlılık değişiminde biyoistatistik analizlerine göre 24 saatlik IC₅₀ değeri 55.90 µM, 48 saatlik IC₅₀ değeri 36.91 µM olarak saptanmıştır. Belirlenen doz 50 µM olarak seçilmiştir (Şekil 21).

Tablo 3. 24 ve 48 saatlik borik asit konsantrasyonlarına göre MCF-7 hücre hattındaki canlılık değişiminin%’lik kıyaslanması

Konsantrasyon (mM)	Borik Asit 24H (N=4) %	Borik Asit 48H (N=4) %
0	100,000	100,000
12,5	68,496	59,293
25	58,717	55,079
50	56,367	50,138
100	50,197	43,993
200	33,990	31,879
400	13,448	0,853
800	0,470	0,251

Isırgan Otu (Urtica) + Borik Asit-24H



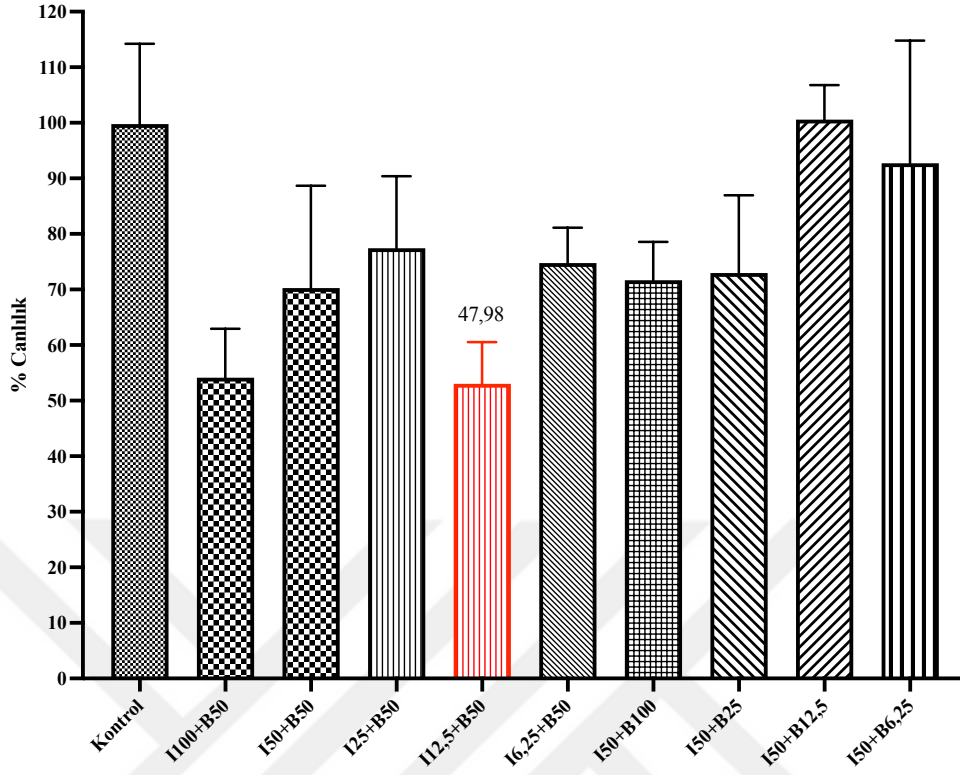
Şekil 23. Kontrol grubu ve 24 saatlik kombinasyonların canlılık değerleri

24 saatlik kontrol grubu ve kombinasyonların konsantrasyonlarına göre MCF-7 hücre hattındaki canlılık değişiminde kontrol grubuyla en fazla fark olan I6,25+B50 kombinasyonunda 24 saatlik IC50 değeri 72,93 μ M olarak saptanmıştır (Şekil 22).

Tablo 4. Kontrol grubu ve 24 saatlik kombinasyonların canlılık değerleri açısından kıyaslanması

Değişkenler	Kontrol-Xi Farkı
Kontrol	
I100+B50	68,52
I50+B50	59,88
I25+B50	47,05
I12,5+B50	61,00
I6,25+B50	72,93
I50+B100	31,12
I50+B25	27,37
I50+B12,5	9,724
I50+B6,25	48,17

Isırgan Otu (Urtica) + Borik Asit-48H

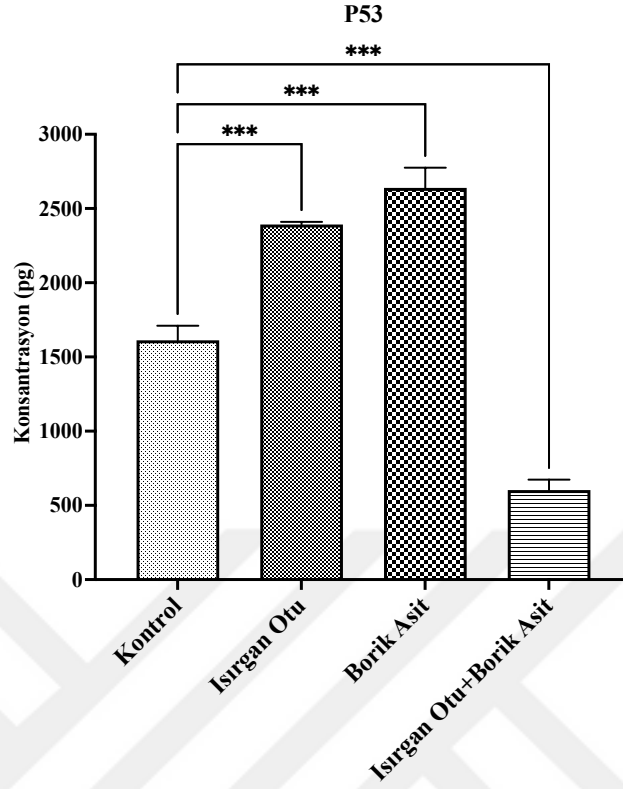


Şekil 24. Kontrol grubu ve 48 saatlik kombinasyonların canlılık değerleri

48 saatlik kontrol grubu ve kombinasyonların konsantrasyonlarına göre MCF-7 hücre hattındaki canlılık değişiminde kontrol grubuyla en fazla fark olan I12,5+B50 kombinasyonunda 48 saatlik IC50 değeri 47,98 μ M olarak saptanmıştır (Şekil 23).

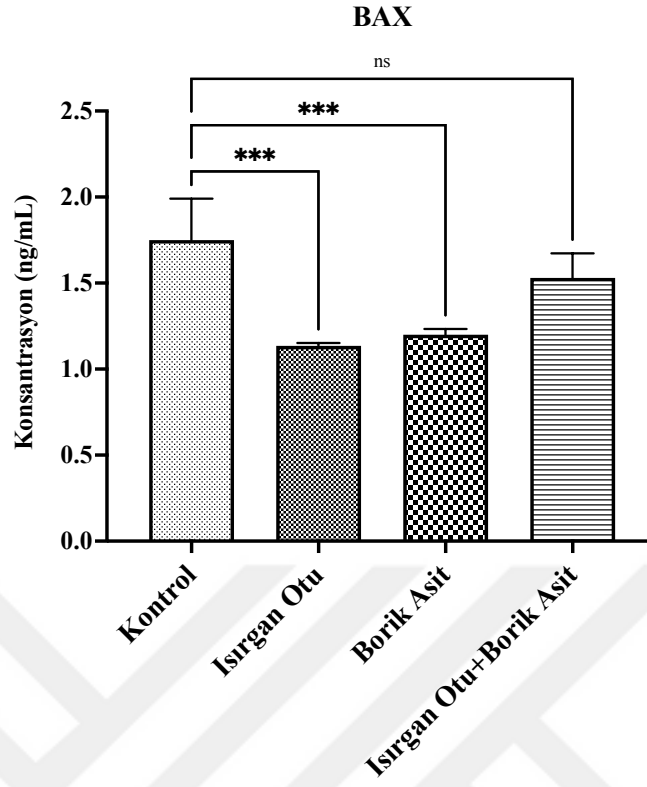
Tablo 5. Kontrol grubu ve 48 saatlik kombinasyonların canlılık değerleri açısından kıyaslanması

Değişkenler	Kontrol-Xi Farkı
Kontrol	
I100+B50	45,66
I50+B50	29,51
I25+B50	22,35
I12,5+B50	46,75
I6,25+B50	25,04
I50+B100	28,12
I50+B25	26,83
I50+B12,5	-0,7960
I50+B6,25	7,063



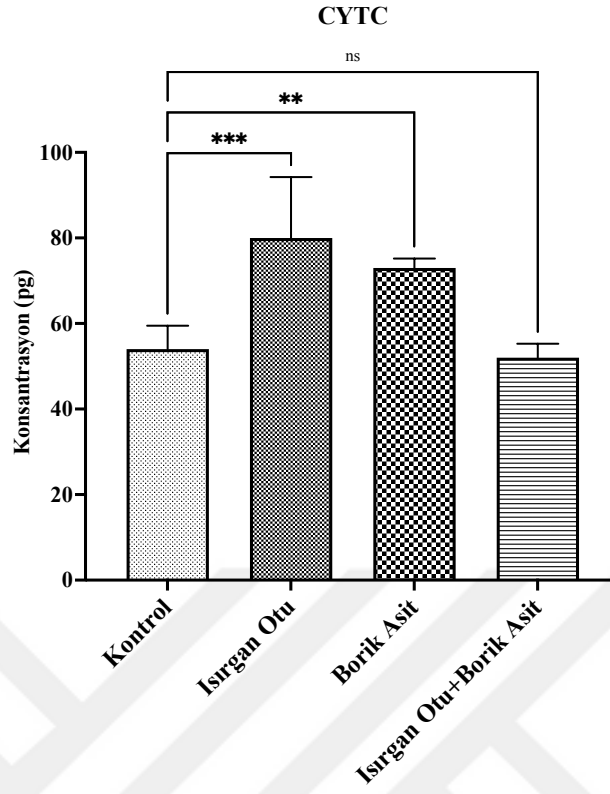
Şekil 25. Kontrol grubu, ısırgan otu, borik asit ve ısırgan otu+borik asit'te P53'ün konsantrasyon değerleri (***)
 (***) $p < 0,001$)

P53'te ısırgan otu ve borik asit konsantrasyon bulguları kontrol grubunun konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında artışta çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görülmüştür ($p < 0,001$). Isırgan otu+borik asit konsantrasyon bulguları karşılaştırıldığında azalışta çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olduğu görülmüştür ($p < 0,001$) (Şekil 24).



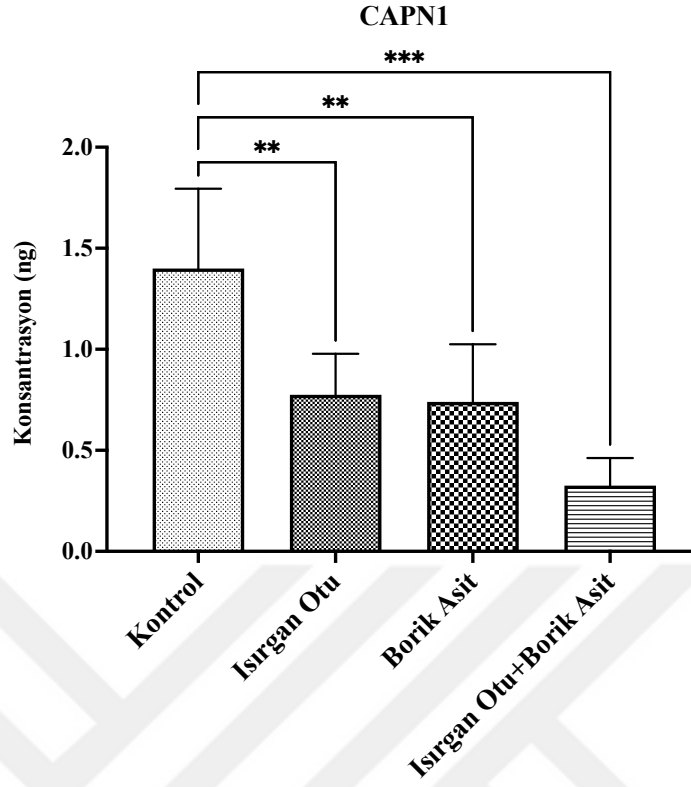
Şekil 26. Kontrol grubu, ısırgan otu, borik asit ve ısırgan otu+borik asit'te BAX'ın konsantrasyon değerleri
(ns: $p>0,05$; ***: $p<0,001$)

BAX'ta ısırgan otu ve borik asit konsantrasyon bulguları kontrol grubunun konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında azalışta çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Isırgan otu+borik asit konsantrasyon bulguları ile kontrol grubu konsantrasyon bulguları karşılaştırıldığında azalışın istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olmadığı görülmüştür ($p>0,05$) (Şekil 25).



Şekil 27. Kontrol grubu, ısırgan otu, borik asit ve ısırgan otu+borik asit'te CYCT'nin konsantrasyon değerleri
(ns: $p>0,05$; ** $p<0,01$; ***: $p<0,001$)

CYCT'de ısırgan otu konsantrasyon bulguları kontrol grubunun konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında artışta çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Borik asit konsantrasyon bulguları kontrol grubu konsantrasyon bulguları ile karşılaştırıldığında artışta yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olduğu görülmüştür ($p<0,01$). Isırgan otu+borik asit konsantrasyon bulguları ile kontrol grubu konsantrasyon bulguları karşılaştırıldığında azalışın istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olmadığı görülmüştür ($p>0,05$) (Şekil 26).



Şekil 28. Kontrol grubu, ısırgan otu, borik asit ve ısırgan otu+borik asit'te CAPN1'in konsantrasyon değerleri

(**p<0,01; ***: p<0,001)

CAPN-1'de ısırgan otu ve borik asitin konsantrasyon bulgularını kontrol grubunun konsantrasyonu ile karşılaştırdığımızda azalışta yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olduğu görülmüştür ($p<0,01$). Isırgan otu+borik asit konsantrasyon bulguları kontrol grubunun konsantrasyon bulgularıyla karşılaştırıldığında azalışta çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olduğu görülmüştür ($p<0,001$) (Şekil 27).

5 TARTIŞMA

Meme kanseri, kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türüdür ve dünya genelinde kadınların hayatını kaybetme nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Bu nedenle, meme kanserinin tedavisi için farklı ilaçlar ve maddeler üzerinde birçok araştırma yapılmakta ve çeşitli çalışmalar yürütülmektedir. Bitkiler, kanser önleyici tedavi için adjuvan, tamamlayıcı veya alternatif bir kaynak olarak kullanılabilir ve umut vericidir (Esposito et al., 2019).

Isırgan otu, kanser önlemede etkili olabilecek biyolojik aktivitelere sahiptir; hücrel metabolizmadaki önemli süreçlerin indüksiyonu veya inhibisyonu ve apoptotik yolları aktive etme yeteneği bu etkiler arasındadır. Esposito ve arkadaşları (2019) yaptıkları bir çalışmada, ısırgan otunun farklı insan kanserleri üzerinde anti-proliferatif ve apoptotik etkilerini bildirmiştir. Isırgan otu ekstraktlarının bu etkilerinin, antioksidan, anti-mutajenik ve anti-proliferatif özelliklere sahip olduğu bildirilen polifenoller dahil olmak üzere biyoaktif doğal ürün içeriğinden kaynaklandığını öne sürmüştür (Esposito et al., 2019). Fattahi ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, ısırgan otu yaprak sulu özütünün insan meme kanseri hücre dizisi MCF-7 üzerindeki aktivitesi incelenmiştir ve doza bağlı bir şekilde önemli hücre ölümü tespit edilmiştir (Fattahi et al., 2013). Percin ve arkadaşları (2022), ısırgan otu ekstraktlarının MCF-7, MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 hücrelerine karşı sitotoksitesini araştırmıştır. Isırgan otunun MCF-7, MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığını doza bağlı bir şekilde azalttığını göstermiştir (Karakol et al., 2022).

Borik asit, güçlü bir antioksidan etkiye sahiptir ve özellikle kanser tedavisinde kullanılan ilaçların yan etkilerini azaltmada ve reaktif oksijen türlerinin seviyesinin düşürülmesinde önemli bir rol oynayabilir (Miyamoto et al., 2000). Scorei ve arkadaşları (2008), meme kanseri hücre dizisi MDA-MB-231 üzerinde borik asit ve kalsiyum fruktoboratin etkisini incelemiştir MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksiteye neden olduğunu göstermiştir (Scorei et al., 2008). Ceyhan ve arkadaşlarının (2020) bir çalışmasında, yüksek konsantrasyonlarda borik asidin DU-145 insan prostat kanseri hücre hattında kontrole kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya

neden olduğu gösterilmiştir (Çiğel et al., 2020). Barranco ve arkadaşları (2004) yapmış oldukları çalışmada, borik asidin DU-145 prostat kanseri hücre hattında proliferasyonu inhibe ettiğini ve hücre büyümesini baskıladığını göstermiştir (Barranco & Eckhert, 2004). Alvin ve arkadaşları (2009), insan deri melanoma hücre hatları üzerinde yaptıkları çalışmada, yüksek düzeyde borik asidin melanoma hücrelerinin çoğalmasını durdurduğunu göstermiştir (Acerbo & Miller, 2009).

Bu çalışmada, MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde ısırgan otu ve borik asit'in apoptotik etkileri araştırılmıştır. Bunun için, p53, BAX, Sitokrom C ve CAPN-1 markerları kullanılarak apoptoz tespit edilmiştir.

P53, DNA hasarına yanıt veren bir tümör baskılayıcı gendir. Bununla birlikte, p53'ün bir dizi strese hücresele yanıtı koordine etmede çeşitli rolleri keşfedilmiştir. Artık p53'ün oksidatif strese ve oksitlenmiş DNA'ya yanıt verdiği bilinmektedir; hücresele metabolizmanın özelliklerini izler ve düzenler, uygun kromozom ayırımını yönetir; hücresele stres faktörlerine yanıt olarak hücre döngüsü durmasını kontrol eder; apoptozu indükler ve otofaji ve yaşlanmayı düzenler (Mills, 2013). Karakol ve arkadaşları (2022) tarafından yapılan bu çalışmada, ısırgan otunun tümör büyümesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Isırgan otunun in vivo immüno histokimyasal incelemelerinde sıçanların tümöral dokularında p53 aktivitesini artırdığı gözlenmiştir (Karakol et al., 2022). Fattahi ve arkadaşları (2013) bir çalışmasında ısırgan otu yaprak özü uygulanan MCF7 hücre hattında p53 seviyesini artışı ile apoptozu ilişkilendirmiştir (Fattahi et al., 2013). Yapılan bir çalışmada, ısırgan otunun insan lösemi hücre hattında p53 seviyelerinin artışı ile apoptotik etkisi bildirilmiştir (Temiz et al., 2021). Borik asit'in akciğer kanseri hücreleri üzerine anti kanser etkileri çalışılmış ve P53 proteinlerin seviyelerinin borik asit tedavisiyle birlikte artış gösterdiği rapor edilmiştir (Cebeci et al., 2022). Başka bir çalışmada, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde borik asitin apoptoz mekanizmasındaki etkileri incelenmiş ve p53 protein ekspresyon seviyesinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı rapor edilmiştir (Scorei et al., 2008). Barranco ve arkadaşlarının çalışmasında, prostat kanseri hücreleri borik aside maruz bırakılmıştır. p53 ekspresyonunda herhangi bir değişiklik gözlenmediği bildirilmiştir (Barranco & Eckhert, 2006).

Bu çalışmada ısırgan otu, borik asit ve ısırgan otu+borik asidin p53 konsantrasyonuna etkileri incelenmiştir. Isırgan otu ve borik asitin p53 seviyelerini artırdığı, ısırgan otu+borik asit kombinasyonunun ise p53 seviyelerini azalttığı görülmüştür. Isırgan otu ve borik asit kombinasyonu p53 seviyelerini azaltarak apoptozun olumsuz etkilediğinden; kanser tedavisi kullanımı konusunda daha temkinli olunması gerektiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, sadece ısırgan otu veya sadece borik asit kullanımının p53 konsantrasyonlarını artırarak apoptozu olumlu etkileyebileceği görülmüştür ve bu artışlar literatürü de destekler niteliktedir. Isırgan otu ve borik asit bileşenlerinin kanser tedavisinde potansiyel bir kullanımı olabileceği gösterilmiştir.

Bax, apoptozun içsel yolunun temel düzenleyicilerindendir. Apoptotik uyarana üzerine, apoptozda önemli bir adım olarak kabul edilen geçirgenleştirmeye aracılık etmek için mitokondriyal dış membranda aktive edilir (Peña-Blanco & García-Sáez, 2018). Yapılan bir çalışmada ısırgan otu yapraklarının sulu özü, akut miyeloid lösemi hücre hattının proliferasyonunu azaltmıştır. Ayrıca, proapoptotik protein Bax ekspresyonunu artırarak ve antiapoptotik protein erken ve geç aşamalarda hücre döngüsünü G0 fazına durdurabildiği ve hücre apoptozunu artırabildiği gösterilmiştir (Rizk et al., 2017). Yapılan bir diğer çalışmada ısırgan otunun farklı konsantrasyonlarda hepatokarsinom hücre hattında ve kolon kanseri hücre hattında antiproliferatif etkiler gösterdiği saptanmıştır ve Bax oranının arttığı gözlenmiştir (Kardan et al., 2020). Bir araştırmada, akciğer kanseri hücrelerinde yapılan deneylerde farklı konsantrasyonlardaki borik asitin etkisi incelenmiştir. Borik asit akciğer kanseri hücrelerindeki BAX geninde ekspresyon seviyesini artırmıştır (Genet et al., 2021). Güneş ve arkadaşlarının (2023) yaptıkları bir çalışmada zamana ve doza bağlı olarak borik asit hücre canlılığını baskılamış ve Bax proteininin belirgin bir şekilde artmasına sağlamıştır (Eroglu Gunes, 2023). Yapılan bir çalışmada ısırgan otu yaprağının sulu ekstraktının doza bağlı anti-proliferatif etkisi MCF-7 hücreleri üzerinde gözlenmiştir. Bax proteinlerin artışı ile apoptozdaki artış ilişkilendirilmiştir (Fattahi et al., 2013). Bu çalışmada literatür verilerinin aksine ısırgan otu ve borik asit Bax konsantrasyonunu düşürmüştür ve apoptotik etki göstermemiştir. Aynı şekilde kombinasyonları da apoptotik etki göstermemiştir. Kanser tedavisinin hedeflenen etkilerinin anlaşılabilmesi için Bax seviyeleri önemli bir sisteme sahiptir. Bu

nedenle, Bax'ın artırılması veya azaltılmasının belirlenmesi, yeni kanser tedavisi teknolojisinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

Sitokrom C, mitokondride bulunan bir proteindir. Apoptoz sırasında mitokondriden sitoplazmaya salınır ve burada hücre ölümüne yol açan bir dizi olayı aktive eder (Nur Ahsani, 2014). Hacıoğlu ve arkadaşlarının (2020) prostat kanseri ile ilgili bir çalışmada 24 saat boyunca uygulanan borik asit; Sitokrom C düzeyini önemli ölçüde artırarak apoptotik yolların etkili bir şekilde başlattığı gözlenmiştir (Hacıoglu et al., 2020). Yapılan bir diğer çalışmada, meme kanseri hücreleri üzerinde borik asit'in Sitokrom C seviyelerinde bir farklılık yaratmadığı gözlenmiştir (Scorei et al., 2008). Güneş ve arkadaşlarının (2023) çalışmada borik asitin, insan pankreas kanseri hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı ve Sitokrom C ekspresyonunun önemli ölçüde artırdığı saptanmıştır (Eroglu Gunes, 2023). Bu çalışmada, meme kanseri hücre hattında ısırgan otu, borik asit ve ısırgan otu+borik asit kombinasyonunun Sitokrom C konsantrasyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde ısırgan otu ve borik asit'in konsantrasyonu artırarak apoptotik etki gösterdiği gözlenmiştir. Isırgan otu+borik asit konsantrasyonunun ise apoptotik etkisi gözlenmemiştir. Hücre ölümüne yol açan bir dizi olayı aktive eden Sitokrom C'nin konsantrasyonunu artıran veya azaltan bileşiklerin belirlenmesi, kanser tedavisi için yeni hedeflerin belirlenmesinde katkı sağlayacaktır.

Kalpainler, transkripsiyon, hayatta kalma, çoğalma, apoptoz, göç ve istila dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde önemli roller oynayan kalsiyumla aktive olan sistein kalpainler potansiyel anti-kanser hedefleri olarak kabul edilmektedir (Leloup & Wells, 2011). Kalpain ailesinin proteolitik aktivitesinin çok sayıda hücre içi proteini düzenlediğini ve hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi, hücre yapışması, göç, proliferasyon ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlemlerde rol oynadığı gösterilmiştir (Gora & Latajka, 2015). Yapılan bir çalışmada, MCF-7 hücre hattında ısırgan otu özünün kalpain1 seviyesini artırdığı ve apoptotik etki gösterdiği gözlenmiştir (Fattahi et al., 2013). Li ve arkadaşlarının (2017) yaptıkları çalışmada, kalpain inhibitörlerinin, MCF-7 hücrelerinin istilasını inhibe ettiği gösterilmiştir (C. L. Li et al., 2017). Yapılan bir çalışmada, kalpainlerin apoptozu düzenleyebileceği ve mitokondriyal işlev üzerine etki gösterebileceği gösterilmiştir (Smith & Schnellmann, 2012). Davis ve

arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, endokrin tedavisi alan meme kanseri hastalarında düşük kalpain ekspresyonunu, kötü sonuçlar ile ilişkilendirmişlerdir (Davis et al., 2014). Yapılan bir diğer çalışmada, prostat kanseri hücreleri üzerinde kalpain inhibitörüyle tedavinin hücre proliferasyonunu azalttığı ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Wang et al., 2020). Yapılan bir çalışmada, kalpainin meme kanseri ilerlemesinde, prognozunda ve tedaviye yanıtında aktif rol oynadığını bildirilmiştir (Storr et al., 2015).

Bu çalışma, ısırgan otu, borik asit ve ısırgan otu+borik asitin meme kanseri hücrelerinde kalpain protein konsantrasyonunu azalttığını göstermiştir. Isırgan otu+ borik asit kombinasyonunun kalpain konsantrasyonunu azaltmada ki etkisi ısırgan otu ve borik asite göre daha fazladır. Bu bileşenlerin meme kanseri tedavisinde kullanımına yönelik daha çok araştırma yapılması gerektiği düşünülmektedir.

6 SONUÇ

Kanser, vücudun normal hücrelerinin kontrolsüz ve anormal bir şekilde büyüyerek vücudun diğer bölgelerine saldırdığı ve yayıldığı bir grup hastalıktır. Kansere karşı savaşmak için doğal, sentetik veya biyolojik ajanlar kullanılarak tümör baskılayabilen veya önleyebilen tedaviler uygulanır. Bitkiler, kanser önleyici tedavi için adjuvan, tamamlayıcı veya alternatif bir kaynak olarak kullanılabilir ve umut vericidir (Esposito et al., 2019).

Isırgan otunun literatürde antiproliferatif antikanser kemopreventif belirlenmiş etkileri mevcuttur. Bu etkileri yapısında bulunan çok sayıda flavanol glikozitleri vasıtasıyla gerçekleştirdiği belirtilmektedir. Hem polifenollerin hem de karotenoidlerin önleyici aktivitesi, ısırgan otunun kanser gibi hastalıklara karşı sağlığı geliştirici etkileri ile ilişkilidir. Borik asitin kemo-önleyici rolü, MCF-7 hücre hattını kullanarak borik asit'in meme kanseri üzerinde benzer bir anti-kanser etkisi olup olmadığını belirleme çabasına teşvik etmiştir. Borik asit testosteron, östrojen gibi meme kanseri gelişiminde rol alan çeşitli mekanizmalar üzerinde etkin olmakla birlikte hücre kültürü ve diğer çalışmalarda kanser türleri için antiproliferatif ve antitümörijenik etki göstermektedir.

Elde edilen sonuçlara dayanarak, bu çalışma MCF-7 meme kanseri hücre hattında ısırgan otu, borik asit ve ısırgan otu+borik asit ekstralarının apoptoz üzerine etkilerini araştırmıştır. Araştırmanın amacı, kanser tedavisinde potansiyel olarak kullanılabilen doğal bileşiklerin belirlenmesi ve alternatif tedavi seçeneklerinin ortaya konmasıdır. Isırgan otu ve borik asit kombinasyonunun apoptoz etkilerinin, literatürde kombine olarak henüz çalışılmamış oluşu bu çalışmayı özgün kılmaktadır. P53, BAX, Sitokrom C ve CAPN-1 markerları kullanılarak yapılan analizler sonucunda şu bulgular elde edilmiştir:

P53 konsantrasyonları ölçüldüğünde, ısırgan otu ve borik asit uygulamalarının kontrol grubuna göre anlamlı bir artış ile farklılık yarattığı ve apoptozu desteklediği gözlenmiştir. Bu sonuçlar, ısırgan otu ve borik asitin kanser hücrelerinde p53 aktivasyonunu artırarak hücre ölümünü tetikleyebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, ısırgan otu+borik asit kombinasyonunun p53 konsantrasyonunu azaltarak

apoptozu desteklemediği tespit edilmiştir. Bu bulgu, kombinasyon tedavisinin p53 yolları üzerindeki etkilerini daha ayrıntılı şekilde araştırmayı gerektirmektedir.

Bax konsantrasyonları ölçüldüğünde, ısırgan otu ve borik asit uygulamalarının kontrol grubuna göre anlamlı bir azalış ile farklılık yarattığı ve apoptozu desteklemediği gözlenmiştir. Isırgan otu+ borik asitin kontrol grubuna göre Bax konsantrasyonlarında anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, ısırgan otu+ borik asitin kanser hücrelerinde Bax aktivasyonunu etkilemediğini göstermektedir. Ancak, diğer apoptotik yollar veya mekanizmalar üzerindeki etkileri daha ayrıntılı olarak incelenmelidir.

Sitokrom C konsantrasyonları ölçüldüğünde, ısırgan otu ve borik asit uygulamalarının kontrol grubuna göre artarak anlamlı bir farklılık oluşturduğu ve Sitokrom C konsantrasyonlarının apoptozu desteklediği tespit edilmiştir. Bu bulgular, ısırgan otu ve borik asitin mitokondriyal apoptoz yollarını etkileyerek hücre ölümünü uyardığını göstermektedir. Ancak, ısırgan otu+borik asit kombinasyonunun Sitokrom C konsantrasyonlarında anlamlı bir farklılık oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu durum, kombinasyon tedavisinin Sitokrom C salınımı üzerindeki etkilerini daha fazla araştırmayı gerektirmektedir.

CAPN-1 konsantrasyonları ölçüldüğünde, ısırgan otu, borik asit ve ısırgan otu+borik asit uygulamalarının kontrol grubuna göre CAPN-1 konsantrasyonlarını anlamlı olarak azalttığı ve apoptotik etki göstermediği saptanmıştır. Bu sonuçlar, bu bileşiklerin CAPN-1 enzimi üzerinde doğrudan etkili olmadığını ve kanser hücrelerinde başka mekanizmalar aracılığıyla hücre ölümünü tetikleyebileceğini göstermektedir.

Bu çalışmanın sonuçları, ısırgan otu ve borik asitin meme kanseri hücrelerinde apoptozu uyardığını ve potansiyel anti-kanser etkilerine sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, ısırgan otu+borik asit kombinasyonunun etkileri daha fazla araştırılmalıdır. Sonuç olarak, bu çalışma ısırgan otu, borik asit ve ısırgan otu+borik asit ekstraktlarının meme kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini değerlendirmiştir. Elde edilen bulgular, ısırgan otu ve borik asitin p53 ve sitokrom C üzerinde etkili

olduğunu ve apoptozu desteklediğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, Bax ve CAPN-1 üzerindeki etkileri sınırlı veya istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Bu çalışmanın sonuçları, ısırgan otu ve borik asitin potansiyel anti-kanser etkilerini vurgulamaktadır. Bu doğal bileşiklerin kanser tedavisi alanında alternatif ve tamamlayıcı tedavi seçenekleri olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, ileriki çalışmalarda bu kombinasyonun etkinliği ve mekanizmaları daha ayrıntılı bir şekilde incelenmelidir. Bu bulgular, daha fazla deneysel ve klinik çalışmalarla desteklenmeli ve mekanizmaları daha ayrıntılı olarak araştırılmalıdır.



KAYNAKLAR

- Abdelwahab Yousef, A. J. (2017). Male Breast Cancer: Epidemiology and Risk Factors. *Seminars in Oncology*, 44(4), 267–272. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2017.11.002>
- Abu-Dahab, R. (2007). Antiproliferative activity of selected medicinal plants of Jordan against a breast adenocarcinoma cell line (MCF7). *Scientia Pharmaceutica*, 75(3), 121–136. <https://doi.org/10.3797/scipharm.2007.75.121>
- Acerbo, A. S., & Miller, L. M. (2009). Assessment of the chemical changes induced in human melanoma cells by boric acid treatment using infrared imaging. *Analyst*, 134(8), 1669–1674. <https://doi.org/10.1039/B823234B>
- Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., & Takada, Y. (2004). Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer Research*, 24(5A).
- Ait, A., Said, H., Benmoussa, A., Sbai, I., Otmani, E. L., & Derfoufi, S. (2015). Highlights on nutritional and therapeutic value of stinging nettle (*Urtica Dioica*). *Article in International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(10). <https://www.researchgate.net/publication/283675999>
- Akyolcu, N., Ozhanlı, Y., & Kandemir, D. (2020). Recent Developments in Breast Cancer. *Sağlık Bilimleri ve Meslekleri Dergisi*, 6(3), 583–594. <https://doi.org/10.5152/hsp.2019.440012>
- Atashi, H. A., Vaghar, M. E., Olya, M., Mirzamohammadi, P., Arani, H. Z., Hadizadeh, M., Rafsanjani, S. M. R. H., & Alizadeh, G. (2020). Knowledge, Attitudes, and Practices toward Breast Cancer: among Midwives in a Breast Cancer Educational Seminar in Tehran. *Archives of Breast Cancer*, 29–36. <https://doi.org/10.32768/ABC.20207129-36>
- Avgerinos, K. I., Spyrou, N., Mantzoros, C. S., & Dalamaga, M. (2019). Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism*, 92, 121–135. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.001>
- Ayodele, O. (2016). *Boron Complexes as Anticancer Agents and Recent Advances*. 2(2), 40–42. <https://doi.org/10.52155/ijpsat.v2.2.20>
- Bakirdere, S., Örenay, S., & Korkmaz, M. (2010). Effect of Boron on Human Health. *The Open Mineral Processing Journal*, 3, 54–59.
- Barranco, W. T., & Eckhert, C. D. (2004). Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Letters*, 216(1), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.06.001>
- Barranco, W. T., & Eckhert, C. D. (2006). Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells. *British Journal of Cancer*, 94(6), 884–890. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603009>
- Beral, V., Bull, D., Doll, R., Peto, R., & Reeves, G. (2002). 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. *The Lancet*, 360(9328), 187–195. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09454-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09454-0)
- Bose, J. C., Koketsu, R., Ricca, U., Das ; Bose, S. C., & Guha, S. C. (1925). On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 98(690), 312–339. <https://doi.org/10.1098/RSPB.1925.0039>

- Bradke, T. M., Hall, C., Carper, S. W., & Plopper, G. E. (2008). Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability. *Cell Adhesion & Migration*, 2(3), 153–160. <https://doi.org/10.4161/CAM.2.3.6484>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brayboy, L. M., Oulhen, N., Long, S., Voigt, N., Raker, C., & Wessel, G. M. (2017). Multidrug resistance transporter-1 and breast cancer resistance protein protect against ovarian toxicity, and are essential in ovarian physiology. *Reproductive Toxicology*, 69, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.02.002>
- C., B., & Leung, E. (2011). Heterogeneity of Phenotype in Breast Cancer Cell Lines. In *Breast Cancer - Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways* (Issue May 2014). InTech. <https://doi.org/10.5772/21984>
- Cebeci, E., Yüksel, B., & Şahin, F. (2022). Anti-cancer effect of boron derivatives on small-cell lung cancer. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 70, 126923. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.126923>
- Chang, Y. J., Chang, Y. J., Hou, Y. C., Chen, L. J., Wu, J. H., Wu, C. C., & Chung, K. P. (2017). Is vegetarian diet associated with a lower risk of breast cancer in Taiwanese women? *BMC Public Health*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/S12889-017-4819-1>
- Chen, K., Hu, Z., Wang, L.-E., Sturgis, E. M., El-Naggar, A. K., Zhang, W., & Wei, Q. (2007). Single-nucleotide polymorphisms at the TP53-binding or responsive promoter regions of BAX and BCL2 genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*, 28(9), 2008–2012. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm172>
- Chen, M.-J., Wu, W. Y. Y., Yen, A. M. F., Fann, J. C. Y., Chen, S. L.-S., Chiu, S. Y. H., Chen, H.-H., & Chiou, S.-T. (2016). Body mass index and breast cancer: analysis of a nation-wide population-based prospective cohort study on 1 393 985 Taiwanese women. *International Journal of Obesity*, 40(3), 524–530. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.205>
- Çiğel, A., Bilgin, M. D., & Ek, R. O. (2020). Evaluation of the Anti-cancer and Biological Effects of Boric Acid on Colon Cancer Cell Line. *Meandros Medical and Dental Journal*, 21(3), 238–243. <https://doi.org/10.4274/meandros.galenos.2020.82246>
- Comşa, Ş., Cîmpean, A. M., & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of experience in research. In *Anticancer Research* (Vol. 35, Issue 6, pp. 3147–3154). International Institute of Anticancer Research.
- Comşa, Ş., Ciuculescu, F., & Raica, M. (2012). Mesenchymal stem cell-tumor cell cooperation in breast cancer vasculogenesis. *Molecular Medicine Reports*, 5(5), 1175–1180. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.796>
- Coşkun, S. P. (2019). *Yoksul Kadınlarda MemeKanseri Korkusu VKadercilik Algısının Erken Tani DavranışlarınEtkisi*. 6–15.
- Dall, G. V., & Britt, K. L. (2017). Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk. *Frontiers in Oncology*, 7(MAY). <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00110>

- Davis, J., Martin, S. G., Patel, P. M., Green, A. R., Rakha, E. A., Ellis, I. O., & Storr, S. J. (2014). Low calpain-9 is associated with adverse disease-specific survival following endocrine therapy in breast cancer. *BMC Cancer*, *14*(1), 995. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-995>
- Delinois, L. J. (2021). Cytochrome c: Using Biological Insight toward Engineering an Optimized Anticancer Biodrug. *Inorganics*, *9*(11), 83. <https://doi.org/10.3390/inorganics9110083>
- Dey, S., Boffetta, P., Mathews, A., Brennan, P., Soliman, A., & Mathew, A. (2009). Risk factors according to estrogen receptor status of breast cancer patients in Trivandrum, South India. *International Journal of Cancer*, *125*(7), 1663–1670. <https://doi.org/10.1002/ijc.24460>
- Ding, R., Xiao, Y., Mo, M., Zheng, Y., Jiang, Y.-Z., & Shao, Z.-M. (2022). Breast cancer screening and early diagnosis in Chinese women. *Cancer Biology & Medicine*, *19*(4), 450–467. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2021.0676>
- DR, A., AM, A., CD, B., WC, B., JD, C., RM, F., IF, G., C, G., PM, M., & JD, S. (2011). Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *New England Journal of Medicine*, *365*(5), 395–409. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1102873>
- Dumitrescu, R. G., & Shields, P. G. (2005). The etiology of alcohol-induced breast cancer. *Alcohol*, *35*(3), 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2005.04.005>
- Durak, I., Biri, H., Devrim, E., Sözen, S., & Avcı, A. (2004). Aqueous extract of urtica dioica makes significant inhibition on adenosine deaminase activity in prostate tissue from patients with prostate cancer. *Cancer Biology & Therapy*, *3*(9), 855–857. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.9.1038>
- Eroglu Gunes, C. (2023). Boric Acid Shows ER Stress and Apoptosis Mediated Anticancer Activity in Human Pancreatic Cancer MIA PaCa-2 and PANC-1 Cells. *Selcuk Tip Dergisi*, *39*(1), 1–6. <https://doi.org/10.30733/std.2023.01608>
- Espósito, S., Bianco, A., Russo, R., Di Maro, A., Isernia, C., & Pedone, P. V. (2019). Therapeutic Perspectives of Molecules from *Urtica dioica* Extracts for Cancer Treatment. *Molecules*, *24*(15). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24152753>
- Fattahi, S., Ardekani, A. M., Zabihi, E., Abedian, Z., Mostafazadeh, A., Pourbagher, R., & Akhavan-Niaki, H. (2013). Antioxidant and Apoptotic Effects of an Aqueous Extract of *Urtica dioica* on the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *14*(9), 5317–5323. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.9.5317>
- Fattahi, S., Ghadami, E., Asouri, M., Ardekani, A. M., & Akhavan-Niaki, H. (2018). *Urtica dioica* inhibits cell growth and induces apoptosis by targeting Ornithine decarboxylase and Adenosine deaminase as key regulatory enzymes in adenosine and polyamines homeostasis in human breast cancer cell lines. *Cellular and Molecular Biology*, *6*(3), 97–102. <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.3.16>
- Feruzi, X. (2021). Current Concepts Of Breast Cancer Risk Factors. *International Journal of Philosophical Studies and Social Sciences*, *1*(3), 57–66. <http://ijpsss.iscience.uz/index.php/ijpsss/article/view/89>
- Fortner, R. T., Sisti, J., Chai, B., Collins, L. C., Rosner, B., Hankinson, S. E., Tamimi, R. M., & Eliassen, A. H. (2019). Parity, breastfeeding, and breast cancer risk by hormone receptor status and molecular phenotype: results from the Nurses' Health Studies. *Breast Cancer Research*, *21*(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1119-y>
- Freschney, R. I. (2005). *Culture of Animal Cells: a manual of basic technique*. 642–642.

- Fuchs, Y., & Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147(4), 742–758. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.10.033>
- Fulda, S. (2009). Tumor resistance to apoptosis. *International Journal of Cancer*, 124(3), 511–515. <https://doi.org/10.1002/IJC.24064>
- Genet, V. E., Nur, G., & Tez, S. (2021). A549 ve beas- 2b hücre hatlarında borik asitin apoptoz yolağındaki genlerin ekspresyon düzeylerine etkisinin incelenmesi.
- Georgakilas, A. G., Martin, O. A., & Bonner, W. M. (2017). p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends in Molecular Medicine*, 23(4), 310–319. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2017.02.001>
- Giordano, S. H., Buzdar, A. U., & Hortobagyi, G. N. (2002). Breast cancer in men. *Annals of Internal Medicine*, 137(8), 678–687. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-137-8-200210150-00013>
- Gölbashi, Z., Çetin, R., Kalkan, S., Durmuş, T., & Bilgi, K. (2012). Breast Cancer and Breast Self Examination. *The Journal of Breast Health*, 2, 69–73.
- Gora, J., & Latajka, R. (2015). Involvement of cysteine proteases in cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 22(8), 944–957. <https://doi.org/10.2174/0929867321666141106115624>
- Gottlieb, T. M., & Oren, M. (1998). p53 and apoptosis. *Seminars in Cancer Biology*, 8(5), 359–368. <https://doi.org/10.1006/scbi.1998.0098>
- Hacıoglu, C., Kar, F., Kacar, S., Sahinturk, V., & Kanbak, G. (2020). High Concentrations of Boric Acid Trigger Concentration-Dependent Oxidative Stress, Apoptotic Pathways and Morphological Alterations in DU-145 Human Prostate Cancer Cell Line. *Biological Trace Element Research*, 193(2), 400–409. <https://doi.org/10.1007/S12011-019-01739-X>
- Hamajima, N., & Hirose, K. (2012). Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *The Lancet. Oncology*, 13(11), 1141–1151. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70425-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70425-4)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- Hardman, A. E. (2001). Physical activity and cancer risk. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60(1), 107–113. <https://doi.org/10.1079/PNS200076>
- Harris, S. L., & Levine, A. J. (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24(17), 2899–2908. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1208615>
- Hassiotou, F., & Geddes, D. (2013). Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)*, 26(1), 29–48. <https://doi.org/10.1002/CA.22165>
- Hecht, S. S., & Hatsukami, D. K. (2022). Smokeless tobacco and cigarette smoking: chemical mechanisms and cancer prevention. *Nature Reviews. Cancer*, 22(3), 143–155. <https://doi.org/10.1038/S41568-021-00423-4>
- Henderson, K. A., Kobylewski, S. E., Yamada, K. E., & Eckhert, C. D. (2015). Boric acid induces cytoplasmic stress granule formation, eIF2 α phosphorylation, and ATF4 in prostate DU-145 cells. *Biometals*, 28(1), 133. <https://doi.org/10.1007/S10534-014-9809-5>

- Holmes, M. D., Chen, W. Y., Feskanich, D., Kroenke, C. H., & Colditz, G. A. (2005). Physical Activity and Survival After Breast Cancer Diagnosis. *JAMA*, 293(20), 2479–2486. <https://doi.org/10.1001/JAMA.293.20.2479>
- Jagannathan, N. R., & Sharma, U. (2017). Breast Tissue Metabolism by Magnetic Resonance Spectroscopy. *Metabolites*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/METABO7020025>
- Jakubczyk, K., Janda, K., & Szkyrpan, S. (2015). Stinging Nettle (*Urtica Dioica* L.) – Botanical Characteristics, Biochemical Composition And Health Benefits. *Pomeranian Journal of Life Sciences*, 61(2), 191–198. <https://doi.org/10.21164/POMJLIFESCI.78>
- Ji, T. F., Liu, C. H., Wang, A. G., Yang, J. B., Su, Y. L., Yuan, L., & Feng, X. Z. (2007). Studies on the chemical constituents of *Urtica dioica* L. grown in Tibet Autonomous Region. *Zhong Yao Cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese Medicinal Materials*, 30(6), 662–664.
- Kanapathipillai, M. (2018). Treating p53 Mutant Aggregation-Associated Cancer. *Cancers*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/CANCERS10060154>
- Karadağ, A. E., Demirci, B., Çaşkurlu, A., Demirci, F., Okur, M. E., Orak, D., Sipahi, H., & Başer, K. H. C. (2019). In vitro antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. flower extract fractions. *South African Journal of Botany*, 125, 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.07.039>
- Karakol, P., Saraydin, S. U., Bozkurt, M., Hepokur, C., Inan, Z. D. S., & Turan, M. (2022). Anticancer Effects of *Urtica Dioica* in Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 23(2), 673. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2022.23.2.673>
- Karakuş, E. (2011). Östrojen-bağımlı Meme Kanseri ve Sodyum-bağımlı Organik Anyon Taşıyıcı. In *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* (Vol. 5, Issue 3).
- Kardan, M., Rafiei, A., Golpour, M., Ebrahimzadeh, M. A., Akhavan-Niaki, H., & Fattahi, S. (2020). *Urtica dioica* Extract Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in HepG2 and HTC116 as Gastrointestinal Cancer Cell Lines. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 20(8), 963–969. <https://doi.org/10.2174/1871520620666200311095836>
- Khaliq, H., Juming, Z., & Ke-Mei, P. (2011). *The Physiological Role of Boron on Health*. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1284-3>
- Klarenbach, S., Sims-Jones, N., Lewin, G., Singh, H., Thériault, G., Tonelli, M., Doull, M., Courage, S., Garcia, A. J., Thombs, B. D., Klarenbach, S., Sims-Jones, N., Lewin, G., Singh, H., Thériault, G., Doull, M., Courage, S., & Jaramillo, A. (2018). Recommendations on screening for breast cancer in women aged 40-74 years who are not at increased risk for breast cancer. *CMAJ. Canadian Medical Association Journal*, 190(49), E1441–E1451. <https://doi.org/10.1503/cmaj.180463>
- Kot, F. S. (2008). *Boron sources, speciation and its potential impact on health*. <https://doi.org/10.1007/s11157-008-9140-0>
- Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 111(3), 331–342. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01036-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01036-X)
- Lee, H. B., & Han, W. (2014). Unique Features of Young Age Breast Cancer and Its Management. *Journal of Breast Cancer*, 17(4), 301. <https://doi.org/10.4048/JBC.2014.17.4.301>

- Leloup, L., & Wells, A. (2011). Calpains as potential anti-cancer targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15(3), 309–323. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.553611>
- Li, C. L., Yang, D., Cao, X., Wang, F., Hong, D. Y., Wang, J., Shen, X. C., & Chen, Y. (2017). Fibronectin induces epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer MCF-7 cells via activation of calpain. *Oncology Letters*, 13(5), 3889–3895. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5896>
- Li, N., Deng, Y., Zhou, L., Tian, T., Yang, S., Wu, Y., Zheng, Y., Zhai, Z., Hao, Q., Song, D., Zhang, D., Kang, H., & Dai, Z. (2019). Global burden of breast cancer and attributable risk factors in 195 countries and territories, from 1990 to 2017: results from the Global Burden of Disease Study 2017. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S13045-019-0828-0>
- Love, R. R., Love, S. M., & Laudico, A. V. (2004). Breast cancer from a public health perspective. *The Breast Journal*, 10(2), 136–140. <https://doi.org/10.1111/J.1075-122X.2004.21375.X>
- Luo, Q., Beaver, J. M., Liu, Y., & Zhang, Z. (2017). Dynamics of p53: A Master Decider of Cell Fate. *Genes* 2017, Vol. 8, Page 66, 8(2), 66. <https://doi.org/10.3390/GENES8020066>
- Ma, H., Ursin, G., Xu, X., Lee, E., Togawa, K., Malone, K. E., Marchbanks, P. A., McDonald, J. A., Simon, M. S., Folger, S. G., Lu, Y., Sullivan-Halley, J., Deapen, D. M., Press, M. F., & Bernstein, L. (2018). Body mass index at age 18 years and recent body mass index in relation to risk of breast cancer overall and ER/PR/HER2-defined subtypes in white women and African-American women: a pooled analysis. *Breast Cancer Research: BCR*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S13058-017-0931-5>
- Majeed, W., Aslam, B., Javed, I., Khaliq, T., Muhammad, F., Ali, A., & Raza, A. (2014). Breast cancer: major risk factors and recent developments in treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 15(8), 3353–3358. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.8.3353>
- Marphatia, A. A., Ambale, G. S., & Reid, A. M. (2017). Women's Marriage Age Matters for Public Health: A Review of the Broader Health and Social Implications in South Asia. *Frontiers in Public Health*, 5. <https://doi.org/10.3389/FPUBH.2017.00269>
- Mills, K. D. (2013). Tumor suppression: putting p53 in context. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(22), 3461–3462. <https://doi.org/10.4161/CC.26806>
- Miquel, C., Borrini, F., Grandjouan, S., Aupérin, A., Viguier, J., Velasco, V., Duvillard, P., Praz, F., & Sabourin, J. C. (2005). Role of bax mutations in apoptosis in colorectal cancers with microsatellite instability. *American Journal of Clinical Pathology*, 123(4), 562–570. <https://doi.org/10.1309/JQ2X3RV3L8F9TGYW>
- Miyamoto, S., Sutoh, M., Shiimoto, A., Yamazaki, S., Nishimura, K., Yonezawa, C., Matsue, H., & Hoshi, M. (2000). Determination of boron in animal materials by reactor neutron induced prompt gamma-ray analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 244(2), 307–309. <https://doi.org/10.1023/A:1006750617838>
- Mohamed, M. S., Bishr, M. K., Almutairi, F. M., & Ali, A. G. (2017). Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 22(12), 1487–1509. <https://doi.org/10.1007/S10495-017-1429-4>
- Mohammadi, A., Mansoori, B., Baradaran, P. C., Khaze, V., Aghapour, M., Farhadi, M., & Baradaran, B. (2017). Urtica dioica Extract Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis and Related Gene Expression of Breast Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *Clinical Breast Cancer*, 17(6), 463–470. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2017.04.008>

- Mohammadi, A., Mansoori, B., Goldar, S., Shanehbandi, D., Khaze, V., Mohammadnejad, L., Baghbani, E., & Baradaran, B. (2016). Effects of *Urtica dioica* dichloromethane extract on cell apoptosis and related gene expression in human breast cancer cell line (MDA-MB-468). *Cellular and Molecular Biology*, 62(2), 62–67. <https://doi.org/10.14715/cmb/2016.62.2.11>
- Momenimovahed, Z., & Salehiniya, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 11, 151–164. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S176070>
- Moshynska, O., Moshynskyy, I., Misra, V., & Saxena, A. (2005). G125A single-nucleotide polymorphism in the human BAX promoter affects gene expression. *Oncogene* 2005 24:12, 24(12), 2042–2049. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208377>
- Nafeh, G., Akl, M. A., Samarani, J., Bahous, R., Kari, G. Al, Younes, M., Sarkis, R., & Rizk, S. (2023). *Urtica dioica* Leaf Infusion Enhances the Sensitivity of Triple-Negative Breast Cancer Cells to Cisplatin Treatment. 1–13.
- Nian, H., & Ma, B. (2021). Calpain–calpastatin system and cancer progression. *Biological Reviews*, 96(3), 961–975. <https://doi.org/10.1111/brv.12686>
- Nichols, H. B., & Schoemaker, M. J. (2019). Breast Cancer Risk After Recent Childbirth: A Pooled Analysis of 15 Prospective Studies. *Annals of Internal Medicine*, 170(1), 22–30. <https://doi.org/10.7326/M18-1323>
- Niehoff, N., White, A. J., McCullough, L. E., Steck, S. E., Beyea, J., Mordukhovich, I., Shen, J., Neugut, A. I., Conway, K., Santella, R. M., & Gammon, M. D. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons and postmenopausal breast cancer: an evaluation of effect measure modification by body mass index and weight change. *Environmental Research*, 152, 17. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2016.09.022>
- Nielsen, F. H. (2008). Is boron nutritionally relevant? In *Nutrition Reviews* (Vol. 66, Issue 4, pp. 183–191). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2008.00023.x>
- Nur Ahsani, D. (2014). Mitokondria Sebagai Target Terapi Kanker. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan Indonesia*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.20885/JKKI.Vol6.Iss1.Art2>
- Otles, S., & Yalcin, B. (2012). Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle. *The Scientific World Journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/564367>
- Passarelli, M. N., Newcomb, P. A., Hampton, J. M., Trentham-Dietz, A., Titus, L. J., Egan, K. M., Baron, J. A., & Willett, W. C. (2016). Cigarette Smoking Before and After Breast Cancer Diagnosis: Mortality From Breast Cancer and Smoking-Related Diseases. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(12), 1315–1322. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.9328>
- Peña-Blanco, A., & García-Sáez, A. J. (2018). Bax, Bak and beyond — mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS Journal*, 285(3), 416–431. <https://doi.org/10.1111/FEBS.14186>
- Pérez-Mejías, G., Guerra-Castellano, A., Díaz-Quintana, A., De la Rosa, M. A., & Díaz-Moreno, I. (2019). Cytochrome c: Surfing Off of the Mitochondrial Membrane on the Tops of Complexes III and IV. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 654–660. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2019.05.002>
- Pessoa, J. (2022). Cytochrome c in cancer therapy and prognosis. *Bioscience Reports*, 42(12). <https://doi.org/10.1042/BSR20222171>

- Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. K. (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2). <https://doi.org/10.3390/IJMS19020448>
- Picon-Ruiz, M., Morata-Tarifa, C., Valle-Goffin, J. J., Friedman, E. R., & Slingerland, J. M. (2017). Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *67*(5), 378–397. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21405>
- Qu, C., & Chen, T. (2014). Efficacy of Neonatal HBV Vaccination on Liver Cancer and Other Liver Diseases over 30-Year Follow-up of the Qidong Hepatitis B Intervention Study: A Cluster Randomized Controlled Trial. *PLoS Medicine*, *11*(12), e1001774. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001774>
- Qureshi, S., Al-Shabanah, O. A., Al-Harbi, M. M., Al-Bekairi, A. M., & Raza, M. (2001). Boric acid enhances in vivo Ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in Swiss albino mice. *Toxicology*, *165*(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00396-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00396-1)
- Recalde, M., Davila-Batista, V., Díaz, Y., Leitzmann, M., Romieu, I., Freisling, H., & Duarte-Salles, T. (2021). Body mass index and waist circumference in relation to the risk of 26 types of cancer: a prospective cohort study of 3.5 million adults in Spain. *BMC Medicine*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/S12916-020-01877-3>
- Renzulli, M., Zanotti, S., Clemente, A., Mineo, G., Tovoli, F., Reginelli, A., Barile, A., Cappabianca, S., Taffurelli, M., & Golfieri, R. (2019). Hereditary breast cancer: Screening and risk reducing surgery. *Gland Surgery*, *8*(Suppl 3), S142–S149. <https://doi.org/10.21037/gs.2019.04.04>
- Restuccio, A., Mortensen, M. E., & Kelley, M. T. (1992). Fatal ingestion of boric acid in an adult. *The American Journal of Emergency Medicine*, *10*(6), 545–547. [https://doi.org/10.1016/0735-6757\(92\)90180-6](https://doi.org/10.1016/0735-6757(92)90180-6)
- Rizk, S., Al Bast, N., Hodroj, M. H., & Borjac, J. (2017). Aqueous Urtica Dioica Leaves Extract Inhibits Proliferation of Acute Myeloid Leukemia Cells in Vitro. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, *17*, S279–S280. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2017.07.060>
- Romieu, I., & Scoccianti, C. (2015). Alcohol intake and breast cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *International Journal of Cancer*, *137*(8), 1921–1930. <https://doi.org/10.1002/IJC.29469>
- Scholz, C., Andergassen, U., Hepp, P., Schindlbeck, C., Friedl, T. W. P., Harbeck, N., Kiechle, M., Sommer, H., Hauner, H., Friese, K., Rack, B., & Janni, W. (2015). Obesity as an independent risk factor for decreased survival in node-positive high-risk breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *151*(3), 569–576. <https://doi.org/10.1007/S10549-015-3422-3/FIGURES/4>
- Scorei, R., Ciubar, R., Ciofrangeanu, C. M., Mitran, V., Cimpean, A., & Iordachescu, D. (2008). Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells. *Biological Trace Element Research*, *122*(3), 197–205. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-8081-8>
- Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *20*(3), 175–193. <https://doi.org/10.1038/S41580-018-0089-8>
- Slater, E. C. (2003). Keilin, cytochrome, and the respiratory chain. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(19), 16455–16461. <https://doi.org/10.1074/JBC.X200011200>

- Slee, E. A., Adrain, C., & Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7320–7326. <https://doi.org/10.1074/JBC.M008363200>
- Smith, M. A., & Schnellmann, R. G. (2012). Calpains, mitochondria, and apoptosis. *Cardiovascular Research*, 96(1), 32. <https://doi.org/10.1093/CVR/CVS163>
- Sree Kumar, S., Radhakrishnan, A. K., & Cheong, S. K. (2010). Rapid metastasis of breast cancer cells from primary tumour to liver. *Pakistan Journal of Biological Sciences : PJBS*, 13(7), 303–315. <https://doi.org/10.3923/PJBS.2010.303.315>
- Storr, S. J., Carragher, N. O., Frame, M. C., Parr, T., & Martin, S. G. (2011). The calpain system and cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 11, Issue 5, pp. 364–374). <https://doi.org/10.1038/nrc3050>
- Storr, S. J., Thompson, N., Pu, X., Zhang, Y., & Martin, S. G. (2015). Calpain in Breast Cancer: Role in Disease Progression and Treatment Response. *Pathobiology*, 82(3–4), 133–141. <https://doi.org/10.1159/000430464>
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P. P., & Zhu, H. P. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(11), 1387. <https://doi.org/10.7150/IJBS.21635>
- Tanis, P. J., Nieweg, O. E., Valdés Olmos, R. A., & Kroon, B. B. R. (2001). Anatomy and physiology of lymphatic drainage of the breast from the perspective of sentinel node biopsy. *Journal of the American College of Surgeons*, 192(3), 399–409. [https://doi.org/10.1016/S1072-7515\(00\)00776-6](https://doi.org/10.1016/S1072-7515(00)00776-6)
- Temiz, E., Koyuncu, İ., Saadat, S., Yüksekdağ, Ö., & Award, Y. (2021). Exploring the Antiproliferative Mechanisms of *Urtica dioica* L. extract in Human Promyelocytic Leukemia Cell Line. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 18(3), 468–474. <https://doi.org/10.35440/hutfd.1012538>
- Topal, T., Öter, Ş., & Korkmaz, A. (2009). Melatonin ve kanserle ilişkisi. *Genel Tıp Dergisi*, 19(3), 137–143.
- Torre, L. A., Goding Sauer, A. M., Moon, J., Chen, S., Kagawa-Singer, M., Jemal, A., & Siegel, R. L. (2016). Cancer statistics for Asian Americans, Native Hawaiians, and Pacific Islanders, 2016: Converging incidence in males and females. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(3), 182–202. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21335>
- Wang, Y., Zhang, Z., Auyeung, K. K. W., Cho, C. H., Yung, K. K. L., & Ko, J. K. S. (2020). Cryptotanshinone-Induced p53-Dependent Sensitization of Colon Cancer Cells to Apoptotic Drive by Regulation of Calpain and Calcium Homeostasis. *The American Journal of Chinese Medicine*, 48(5), 1179–1202. <https://doi.org/10.1142/S0192415X20500585>
- Watkins, E. J. (2019). Overview of breast cancer. *JAAPA : Official Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 32(10), 13–17. <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000580524.95733.3D>
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H. Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., Macgregor, G. R., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science*, 292(5517), 727–730. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1059108>
- Wei, W., Zeng, H., Zheng, R., Zhang, S., An, L., Chen, R., Wang, S., Sun, K., Matsuda, T., Bray, F., & He, J. (2020). Cancer registration in China and its role in cancer prevention and control. *The Lancet. Oncology*, 21(7), e342–e349. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30073-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30073-5)

- White, N. D. (2018). Hormonal Contraception and Breast Cancer Risk. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 12(3), 224–226. <https://doi.org/10.1177/1559827618754833>
- Wirtz, P., & Baumann, F. T. (2018). Physical Activity, Exercise and Breast Cancer - What Is the Evidence for Rehabilitation, Aftercare, and Survival? A Review. *Breast Care (Basel, Switzerland)*, 13(2), 93–101. <https://doi.org/10.1159/000488717>
- Wolter, K. G., Hsu, Y. Te, Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G., & Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the Cytosol to Mitochondria during Apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 139(5), 1281–1292. <https://doi.org/10.1083/JCB.139.5.1281>
- Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 30(1). <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>
- Yenmez, N. (2011). Stratejik Bir Maden Olarak Bor Minerallerin Türkiye İçin Önemi. *Coğrafya Dergisi*, 19(19), 59–94. <https://dergipark.org.tr/pub/iucografya/issue/25047/264426>
- Zheng, R., Zhang, S., Zeng, H., Wang, S., Sun, K., Chen, R., Li, L., Wei, W., & He, J. (2022). Cancer incidence and mortality in China, 2016. *Journal of the National Cancer Center*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.JNCC.2022.02.002>