

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİKROBİYOTA KAYNAKLI POSTBİYOTİK MEDIATÖRLERİN MEME
KANSERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN *IN VITRO* KOŞULLARDA
ARAŞTIRILMASI

Seval TALİBOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2024

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKROBİYOTA KAYNAKLI POSTBİYOTİK MEDIATÖRLERİN MEME KANSERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN *IN VITRO* KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI

Seval TALİBOĞLU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fadime KIRAN
Eş Danışman: Doç. Dr. Ahmet CEYLAN

Kanser, yüksek ölüm oranları nedeniyle tüm dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir. Özellikle kadınlar arasında yaygın olarak görülen meme kanseri, agresif invazyon, erken metastaz, kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen direnç ve yüksek mortalite nedeniyle önde gelen ölüm nedenlerinden biri olarak dikkat çekmektedir. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar, kanser ve mikrobiyota arasında önemli bir ilişki kurmaktadır. Bağırsak mikrobiyota çeşitliliğinde meydana gelen değişiklikler meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanserin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte güncel çalışmalar, bazı spesifik mikrobiyota bileşenlerinin ve ürettikleri metabolitlerin anti-kanser potansiyeli nedeniyle kanser tedavisinde kullanılabilirliğine işaret etmektedir. Mevcut tez çalışmasının amacı, kansere dirençli kör köstebek faresi *Spalax* sp. bağırsak mikrobiyotasından izole edilen *Ligilactobacillus animalis* EIR/SpX-1 suşu kaynaklı postbiyotik mediatörlerin (PM), MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları kullanılarak anti-kanser etkilerini belirlemektir. Hücreler değişen dozlarda PM ile muamele edilmiş ve potansiyel anti-kanser etkileri MTT, apoptoz, hücre döngüsü, koloni oluşumu, hücre göçü ve gen ifade analizleri ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, PM'lerin meme kanseri hücrelerinde seçici sitotoksosite sergilediğini, meme kanseri hücrelerinde koloni oluşumunu ve hücre hareketliliğini önemli derecede azalttığını, reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırdığını ve MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla MCF-7 hücrelerinde daha fazla etkinlik sergilediğini göstermektedir. Sonuç olarak, tamamlanan tez çalışması mikrobiyotanın faydalı üyeleri tarafından üretilen PM'lerin meme kanserini önlemek veya tedavi etmek amacıyla profilaktik ya da terapötik bir ajan olarak tasarlamasına yönelik doğal, alternatif ve yeni bir yaklaşım sunmaktadır.

Şubat 2024, 107 sayfa

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyota, meme kanseri, postbiyotik mediatör, anti-kanser

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF MICROBIOTA-DERIVED POSTBIOTIC MEDIATORS ON BREAST CANCER UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

Seval TALIBOGLU

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Fadime KIRAN
Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Cancer is recognized as a significant health issue worldwide due to high mortality rates. Breast cancer, commonly seen among women, gain attention as one of the leading causes of death because of its aggressive invasion, early metastasis, development of resistance against chemotherapeutic drugs, and high mortality. Recent studies have established a significant relationship between cancer and microbiota. Changes in the diversity of gut microbiota play an important role in the development and progression of many cancers, including breast cancer. Moreover, current researches indicate that certain specific microbiota components and their metabolites could be utilized in cancer treatment due to their anti-cancer potential. The aim of this thesis is to determine the anti-cancer effects of postbiotic mediators (PMs) derived from *Ligilactobacillus animalis* EIR/SpX-1 which is isolated from the gut microbiota of the cancer-resistant mole-rat *Spalax* sp., using MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. Cells were treated with different doses of PMs, and their potential anti-cancer effects were evaluated through MTT, apoptosis, cell cycle, colony formation, cell migration, and gene expression analyses. The results indicate that PMs exhibit selective cytotoxicity in breast cancer cells, significantly reduce colony formation and cell motility, increase the production of reactive oxygen species, and exhibit greater efficacy in MCF-7 cells compared to MDA-MB-231 cells. In conclusion, this thesis provide a natural, alternative, and novel approach for the development of PMs derived from beneficial members of microbiota as prophylactic or therapeutic agent for the prevention or treatment of breast cancer.

February 2024, 107 pages

Key Words: Microbiota, breast cancer, postbiotic mediator, anti-cancer

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimimde engin birikimiyle bana yol gösteren, hedefime ulaşmam için bu yolda beni her zaman destekleyen ve bana olan güvenini her zaman hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Fadime KIRAN'a bana kazandırdığı her şey için teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmam sürecinde her ihtiyacım olduğunda desteğini esirgemeyen eş danışmanım Doç. Dr. Ahmet CEYLAN'a bana olan inancını her zaman hissettirdiği ve tüm yardımları için teşekkürü borç bilirim.

Tez jürimde yer alarak değerli katkılarını sunan sayın hocamlarım Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY (Ankara Üniversitesi, Biyoloji A.B.D.), Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ (Gazi Üniversitesi, Biyoloji A.B.D.) ve Doç. Dr. Billur Sezgin KIZILOK'a (Koç Üniversitesi, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.B.D.),

Bünyesindeki cihazları kullanmama olanak sağlayan Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü yönetimine ve hücre akış sitometri analizlerinde destek olan Tamer Kahraman'a,

Bu zorlu süreçte desteğini ve sevgisini hissettiğim, her zaman yanımda olan ekip arkadaşlarım Hazal KİBAR DEMİRHAN, Emine OMER OGLOU, Ozan HASÇELİK, Hatice Büşra ESEN, Sultan GÖLPEK, Buket ÇELİK, İlknur AĞUN ve Buse SAFRANCI'ya,

Uzak mesafelere rağmen her zaman yanımda hissettiğim, maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen en değerli hazinem ailem; annem Pembe TALİBOĞLU ve babam İbrahim TALİBOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, "Mikrobiyota kaynaklı postbiyotik mediatörlerin meme kanseri üzerine etkilerinin *in vitro* koşullarda araştırılması" başlıklı yüksek lisans tez projesi (Proje No: FYL-2023-2908) kapsamında Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Seval TALİBOĞLU
Ankara, Şubat 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Kanser	3
2.2 Meme Kanseri.....	10
2.2.1 Epidemiyolojisi	10
2.2.2 Risk faktörleri	13
2.2.3 Gelişimi ve metastazı.....	16
2.2.4 Tanı yöntemleri ve belirteçleri.....	22
2.2.5 Sınıflandırılması ve evreleri	26
2.2.6 Tedavi yöntemleri ve sınırlılıkları	30
2.3 Mikrobiyota ve Kanser İlişkisi	32
2.4 Mikrobiyota ve Meme Kanseri İlişkisi.....	37
2.5 Spalax spp. ve Kanser	43
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	45
3.1 Materyal	45
3.1.1 Bakteri kültürünün hazırlanması.....	46
3.1.2 Sterilizasyon	46
3.2 Yöntem	47
3.2.1 Postbiyotik mediatörlerin (PM) hazırlanması.....	47
3.2.2 PM'lerin anti-kanser etkilerinin belirlenmesi	48
3.2.2.1 Hücre kültürü	48
3.2.2.2 Sitotoksosite analizleri	50
3.2.2.3 Apoptoz analizleri	50
3.2.2.4 Hücre döngüsü analizleri.....	51

3.2.2.5 Hücre göçü analizleri	51
3.2.2.6 Koloni oluşum testi	52
3.2.2.7 Reaktif oksijen giderim testi	53
3.2.2.8 Gen ifade analizleri	53
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	55
4.1 PM'lerin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	55
4.2 PM'lerin Apoptoz İndüksiyonuna Etkileri.....	55
4.3 PM'lerin Hücre Döngüsü Dağılımındaki Etkileri.....	61
4.4 PM'lerin Hücre Göçü (Migrasyon) Üzerine Etkileri.....	61
4.5 PM'lerin Klonojenik Aktivite Üzerindeki Etkileri	69
4.6 PM'lerin ROS Üretimine Etkileri.....	71
4.7 Gen İfadeleri Üzerindeki Etkileri.....	77
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	81
KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ.....	107

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
<	Küçük
>	Büyük
≤	Küçük veya eşit
≥	Büyük veya eşit
°C	Santigrat (Celcius) derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
cm	Santimetre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
ω	Omega

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Bcl2	B Hücresi Lenfoma-2
BH3	Bcl-2 Homolojisi-3
BRCA	Meme Kanserine Duyarlılık
CCND1	Siklin D1
CCNE1	Siklin E1
CO ₂	Karbon dioksit
DCFDA	2, 7-diklorofloresein diasetat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Media
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
ER	Östrojen Reseptörü
FBS	Fetal Sığır Serum
HDM	Hücre Dışı Matriks
HER	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
HRT	Hormon Replasman Tedavisi
İDK	İnvaziv Duktal Karsinoma
İLK	İnvaziv Lobüler Karsinoma
MAPK	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MMG	Moleküler Meme Görüntüleme
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme

MRS	De Man, Rogosa and Sharpe Besiyeri
mTOR	Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür
PBS	Fosfatlanmış Tamponlu Salin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI	Propidyum İyodür
PI3	Fosfoinozidit-3
PM	Postbiyotik Mediator
PR	Progesteron Reseptörü
qPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rb	Retinoblastoma Protein
rRNA	Ribozomal RNA
TMÇ	Tümör Mikro-çevre
UK	Birleşik Krallık
UPA	Ürokinaz Plazminojen Aktivatörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Her iki cinsiyet için 2020 dünya kanser insidans (a) ve mortalite (b) oranlarının bölgelere göre dağılımı	4
Şekil 2.2 Her iki cinsiyet (a), erkekler (b) ve kadınlar (c) arasında 2020 yılında en sık görülen ilk 10 kanser çeşidi için vaka ve ölüm oranları	5
Şekil 2.3 Kanser hücrelerinin ayırt edici ve destekleyici özellikleri.....	7
Şekil 2.4 Tümör mikro-çevrenin şematik gösterimi	9
Şekil 2.5 Dünya genelindeki meme kanseri insidans (a) ve mortalite (b) oranları	12
Şekil 2.6 Meme kanseri risk faktörleri	13
Şekil 2.7 İnsan memesinin anatomik yapısı	17
Şekil 2.8 Meme kanseri kaynaklı beyin metastazı	20
Şekil 2.9 Meme kanseri semptomları	22
Şekil 2.10 Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması	29
Şekil 2.11 Meme kanseri evreleri	30
Şekil 2.12 Mikrobiyota bileşimini etkileyen faktörler	33
Şekil 2.13 Postbiyotik mediatörlerin potansiyel anti-kanser etkileri	35
Şekil 2.14 Postbiyotik mediatör kaynaklı anti-kanser yollar	36
Şekil 2.15 Bağırsak mikrobiyotasının metabolizmaya etkisi ve östrojenin enterohepatik döngüsü	38
Şekil 2.16 Meme mikrobiyotası ve karsinogenez	40
Şekil 2.17 Meme kanserinde mikrobiyota değişimi	40
Şekil 3.1 <i>Ligilactobacillus animalis</i> bakterisine ait Gram boyama ve çizgi ekim görüntüleri	46
Şekil 3.2 PM'lerin hazırlanma aşamaları	47
Şekil 3.3 Çalışma kapsamında kullanılan hücrelerin mikroskop görüntüleri	49
Şekil 4.1 PM'lerin 48 saat süren inkübasyon sonrası hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi	56
Şekil 4.2 HUVEC hücrelerindeki apoptoz durumu.....	57
Şekil 4.3 MCF-7 hücrelerindeki apoptoz durumu.....	58
Şekil 4.4 MDA-MB-231 hücrelerindeki apoptoz durumu	59
Şekil 4.5 Apoptoz analiz sonuçlarını içeren yığın grafikleri.....	60
Şekil 4.6 HUVEC hücrelerine ait hücre döngüsü dağılımı	62
Şekil 4.7 MCF-7 hücrelerine ait hücre döngüsü dağılımı	63
Şekil 4.8 MDA-MB-231 hücrelerine ait hücre döngüsü dağılımı.....	64

Şekil 4.9 PM'lerin HUVEC hücre hareketliliği üzerine etkilerine ait mikroskop görüntüleri	65
Şekil 4.10 PM'lerin MCF-7 hücre hareketliliği üzerine etkilerine ait mikroskop görüntüleri.....	66
Şekil 4.11 PM'lerin MDA-MB-231 hücre hareketliliği üzerine etkilerine ait mikroskop görüntüleri	67
Şekil 4.12 PM'lerin hücre kapanması üzerine etkileri (%)	68
Şekil 4.13 PM'lerin hücre koloni oluşum aktivitesi üzerine etkisi	69
Şekil 4.14 7 günlük muamele neticesinde oluşan koloni sayıları	70
Şekil 4.15 7 günlük muamele neticesinde hesaplanan sağkalım fraksiyon yüzdeleri.....	70
Şekil 4.16 7 günlük muamele neticesinde hesaplanan yüzde kaplama verimliliği	71
Şekil 4.17 PM'lerin hücre koloni oluşum üzerine etkilerinin temsili mikroskop görüntüleri	72
Şekil 4.18 HUVEC hücrelerindeki ROS miktarlarını gösteren akış sitometri diyagramları	73
Şekil 4.19 MCF-7 hücrelerindeki ROS miktarlarını gösteren akış sitometri diyagramları	74
Şekil 4.20 MDA-MB-231 hücrelerindeki ROS miktarlarını gösteren akış sitometri diyagramları	75
Şekil 4.21 PM'lerin ROS üretimine etkileri (%).....	76
Şekil 4.22 PM uygulamasının hücrelerdeki <i>Bcl-2</i> gen ifadesi üzerine etkisi.....	77
Şekil 4.23 PM uygulamasının hücrelerdeki <i>CCNE1</i> gen ifadesi üzerine etkisi.....	78
Şekil 4.24 PM uygulamasının hücrelerdeki <i>CCND1</i> gen ifadesi üzerine etkisi	78
Şekil 4.25 PM uygulamasının hücrelerdeki <i>Kaspaz-3</i> gen ifadesi üzerine etkisi	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Meme kanserinde kullanılan biyobelirteçler.....	25
Çizelge 2.2 Kansere neden olan bakteri genotoksinleri ve metabolitleri.....	34
Çizelge 2.3 Postbiyotik mediatörlerin meme kanseri üzerindeki etkisi.....	42
Çizelge 3.1 Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal malzeme, kit ve cihaz bilgileri	45
Çizelge 3.2 qPCR analizinde kullanılan genler ve primerlerin dizileri	54
Çizelge 4.1 Hücre akış sitometri analizleri neticesinde elde edilen veriler	61



1. GİRİŞ

Her yıl yüz binlerce insanın ölümüne neden olan kanser, tedavi edilmesi oldukça zor bir küresel sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir. Dünya çapında kansere bağlı meydana gelen morbidite ve mortalite nedenlerinden biri olan meme kanseri ise kadınlar arasında en sık tanı konulan hastalıkların başında gelmektedir. Meme kanseri tedavisi amacıyla uygulanan en yaygın yöntemler kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahaleleri kapsamaktadır (So ve El-Nezami 2017). Ancak, mevcut tedavi yöntemleri kanser hücreleri ile birlikte çevredeki sağlıklı hücreleri de etkilemekte ve yan etkilere sebebiyet verebilmektedir. Dolayısıyla, kanseri tedavi etmek veya önlemek için daha güvenilir ve doğal biyolojik yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda mikrobiyota-konak ilişkisini keşfetmeye yönelik gerçekleştirilen çalışmalar oldukça önemli kabul edilmektedir. Mikrobiyota-kanser araştırmalarından elde edilen veriler ise tanı ve tedaviye yönelik farklı bir bakış açısı sunmaktadır. Mikrobiyota, konak üzerinde ya da içinde farklı nişlere lokalize ve adapte olmuş mikroorganizmalar için kullanılan genel bir terimdir. İnsan bağırsağında, vücudun hücre sayısından daha fazla olmak üzere 100 trilyondan fazla simbiyotik mikroorganizma bulunmaktadır (Sanders vd. 2019). Mikrobiyotayı oluşturan bu mikroorganizmalar konak için oldukça önemli faydalar sağlamaktadır. Zararlı maddelerin detoksifikasyonu, K vitamini ve B vitaminleri gibi çeşitli vitaminler başta olmak üzere önemli metabolitlerin üretilmesi, patojen gelişiminin önlenmesi ve bağışıklık sisteminin modüle edilmesi gibi önemli roller üstlenmektedirler. Dengeli bir mikrobiyotada bulunan mevcut bakterilerin bazıları konak sağlığı üzerinde önemli ve olumlu etkiler sergilerken, bazıları olumsuz koşullar altında aşırı çoğalarak bireyin sağlık durumu üzerinde olumsuz etkiler sergileyebilmektedir. Dengeli mikrobiyotanın bozulması olarak nitelendirilen disbiyoz durumu ise kanserle ilişkilendirilmektedir (Chuah vd. 2019). Dolayısıyla, kanser oluşumunda konakçı-mikrobiyota etkileşimlerini çözmek ve bu tür bilgileri kanser teşhisi ve tedavi süreçlerine uyarlamak son yıllarda oldukça önemli kabul edilmektedir. Güncel bilimsel çalışmalar, spesifik mikrobiyota üyelerinin meme kanseri tedavisinde uygulanabileceğine işaret etmektedir (Nejman vd. 2020). Mikrobiyota kaynaklı faydalı mikroorganizmalar tarafından üretilen postbiyotik mediatörler ise kanser hücre çoğalmasını inhibe etme,

apoptozu düzenleme ve otofajik hücre ölümünün aktivasyonunu teşvik etme gibi özellikler sergilemeleri nedeniyle potansiyel anti-kanser ajan olarak umut vaat etmektedirler.

Bu tez çalışmasının amacı, bugüne kadar gerçekleştirilen analizler neticesinde tek bir spontan tümör gelişimi vakası kaydedilmemiş olan, deneysel olarak indüklenen karsinogeneze direnci ile önemli bir model organizma olarak kabul edilen ve eşsiz biyolojik karakteristikleri ile dikkat çeken kör köstebek faresi *Spalax spp.*'nin bağırsak mikrobiyotasından izole edilen *Ligilactobacillus animalis* bakterisi tarafından üretilen postbiyotik mediatörlerin meme kanseri tedavisindeki potansiyel etkinliklerini *in vitro* koşullarda belirlemektir.

2. KURAMSAL TEMELLER

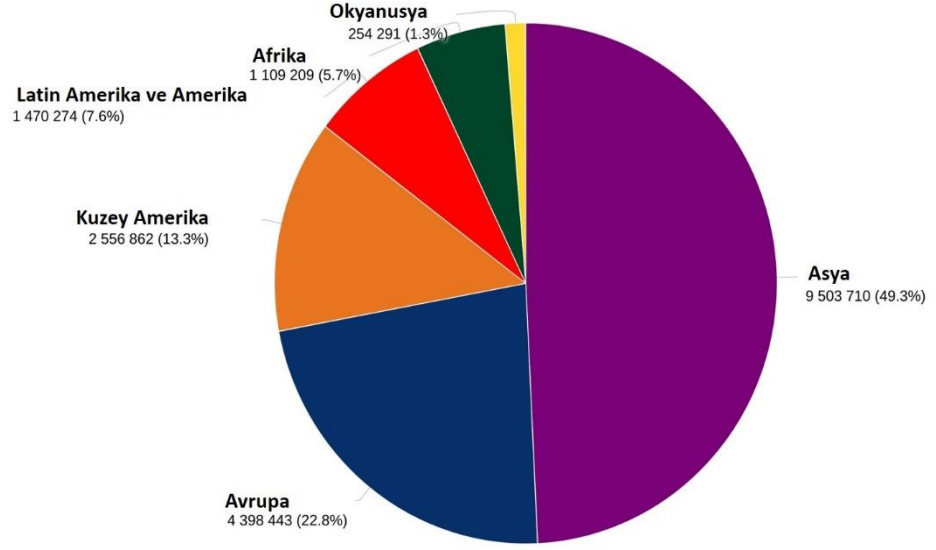
2.1 Kanser

Kanser, bir grup hücrenin kontrolsüz bir şekilde bölünmelerini sürdürmeleri neticesinde meydana gelen önemli bir hastalık grubu olarak tanımlanmaktadır (Hejmadi 2013). Normal hücreler devamlı olarak bölünme, farklılaşma veya ölümü belirleyen sinyallere maruz kalmaktayken kanser hücreleri bu sinyallere karşı kontrolsüz büyüme ve çoğalmaya yönelik özerklik geliştirmektedir. Kontrolsüz çoğalmanın devam ettiği ve vücudun diğer dokularına yayıldığı durumlarda ise hastalığın ölümle sonuçlanma ihtimali yüksek olmaktadır.

Günümüzde önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilen ve küresel bir hastalık olarak nitelendirilen kanser, tüm dünya genelinde kalp damar hastalıklarından sonra ikinci önde gelen ölüm nedeni olarak rapor edilmektedir (Wang vd. 2016). 2020 yılına ait GLOBOCAN verileri, dünya genelinde 19,3 milyon kanser vakası ve 10 milyon kansere bağlı ölüm meydana geldiğini bildirmektedir (Sung vd. 2021). Her iki cinsiyet için 2020 yılına ait kanser insidans ve mortalite oranlarının dünya çapındaki coğrafik dağılımı Şekil 2.1’de sunulmaktadır. Meydana gelen vakaların yarısının ve kanser ölümlerinin % 58,3’ünün Asya’da meydana geldiği tahmin edilmektedir. Kanser vakalarının % 22,8’ini ve kansere bağlı ölümlerin % 19,6’sını ise Avrupa temsil etmektedir. Avrupa’yı takiben, Amerika Birleşik Devletleri dünya çapındaki insidansın % 20,9’unu, mortalitenin ise % 14,2’sini içermektedir.

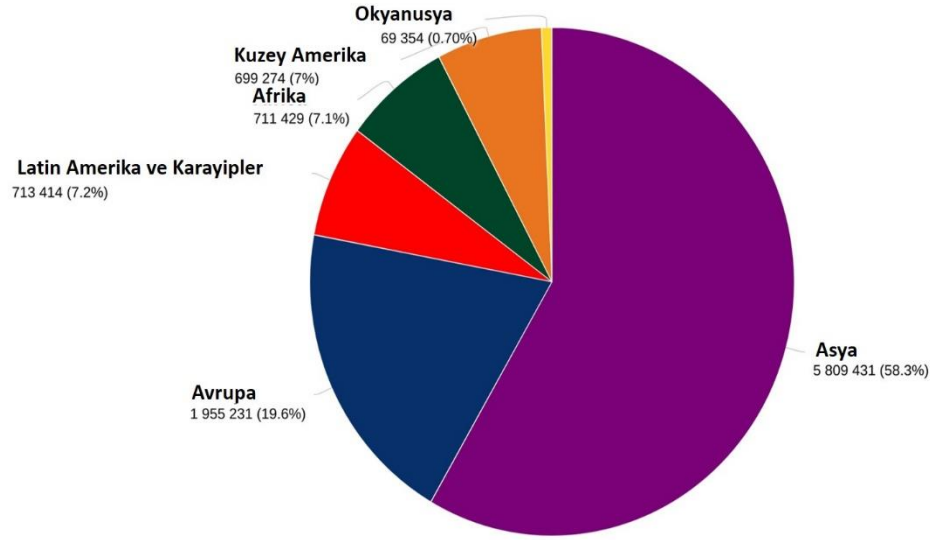
Kanser vakaları arasında en sık tanı konan kanser türleri; meme kanseri, akciğer kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri ve mide kanseri olarak sıralanmaktadır. Her iki cinsiyet için gözlemlenen kanser çeşitlerine ait 2020 yılı insidans ve mortalite oranları Şekil 2.2’de sunulmaktadır. Erkeklerde en sık akciğer kanserine rastlanırken, kadınlarda en sık meme kanseri gözlemlenmektedir. En yüksek ölüm oranlarına ise akciğer, meme ve kolorektal kanserde rastlanmaktadır (GLOBOCAN 2020).

a.



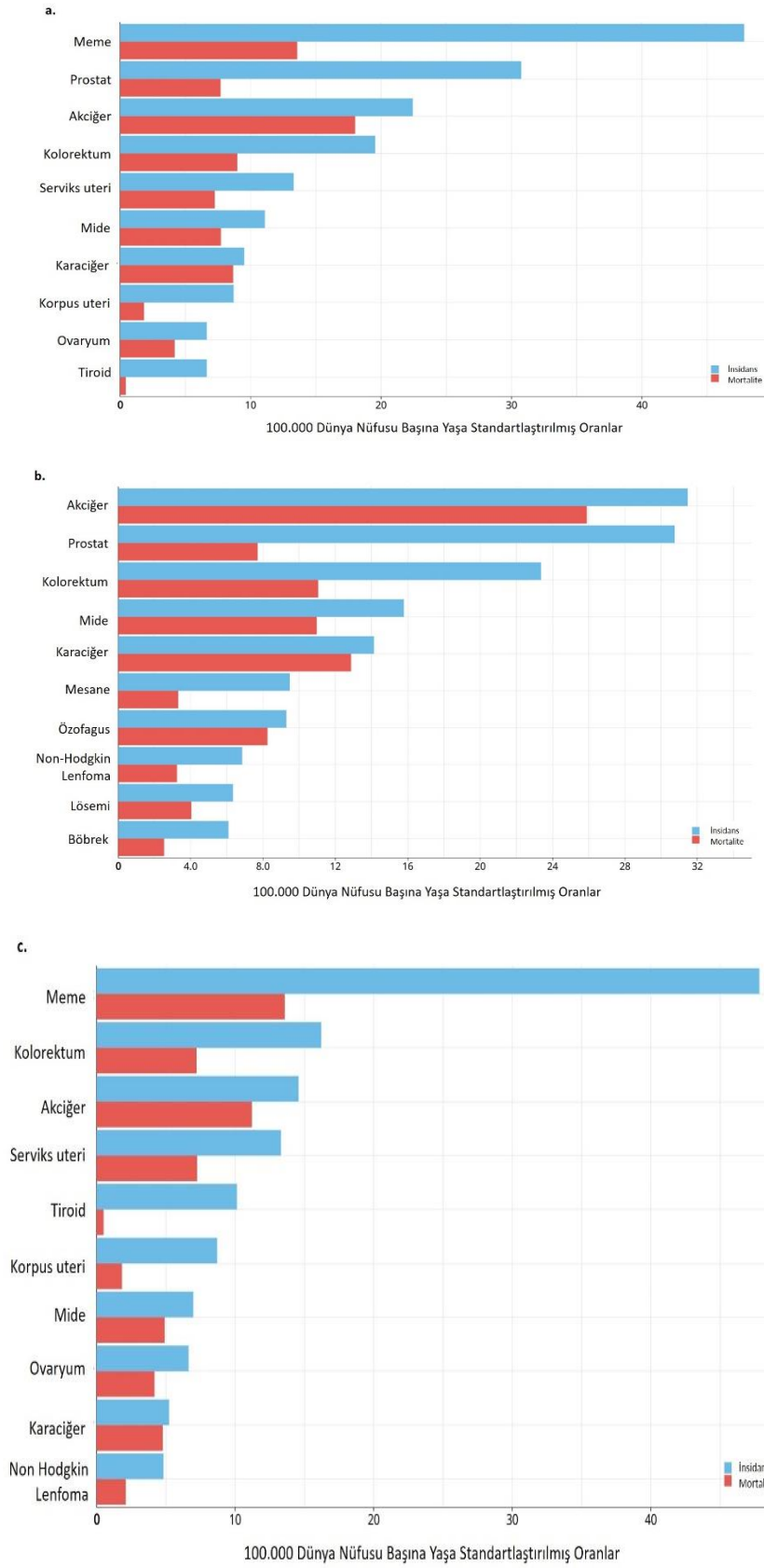
Toplam: 19 292 789

b.



Toplam: 9 958 133

Şekil 2.1 Her iki cinsiyet için 2020 dünya kanser insidans (a) ve mortalite (b) oranlarının bölgelere göre dağılımı (GLOBOCAN 2020)



Şekil 2.2 Her iki cinsiyet (a), erkekler (b) ve kadınlar (c) arasında 2020 yılında en sık görülen ilk 10 kanser çeşidi için vaka ve ölüm oranları (GLOBOCAN 2020)

Kanser olgusu vücuttaki farklı hücre türlerinden herhangi birinin kontrolsüz çoğalması sonucunda meydana gelebildiğinden dolayı, davranışları ve tedaviye yanıtları bakımından birbirinden farklılık sergileyebilen birçok farklı kanser çeşidi bulunmaktadır. Temel olarak tümörler iyi huylu ve kötü huylu olmak üzere iki kategoride incelenmektedir. İyi huylu tümörler meydana geldiği konumda sınırlı olup vücudun uzak bölgelerine yayılım göstermezken, kötü huylu tümörler çevrede bulunan sağlıklı dokuyu istila edebilmekte ve dolaşım veya lenfatik sistemler aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine yayılım gösterebilmektedir. Kaynaklandıkları hücre tipine göre değerlendirildiklerinde ise karsinom, sarkom ve lösemi/lenfoma olmak üzere üç ana kanser tipi bulunmaktadır. Kanserlerin büyük bir çoğunluğunu oluşturan karsinomlar epitelial hücrelerden kaynaklanmaktadır. Sarkomlar ise kas, kıkırdak, kemik ve fibröz doku gibi bağ dokularından kaynaklanan katı tümörleri kapsamaktadır. Diğerlerine kıyasla daha az meydana gelen lenfoma ise kan oluşturan hücrelerden ve bağışıklık sistemi hücrelerinden kaynaklanmaktadır (Cooper 2000).

Normal bir hücrenin tümör hücresine dönüşmesi ve çoğalarak bir kitle oluşturması olarak tanımlanan karsinogenez sürecinde, normal hücreler aşamalı olarak neoplastik bir duruma evrimleşmekte ve ayırt edici yetenekler kazanmaktadır. 2000’li yıllarda kanser hücreleri için altı temel ayırt edici özellik olduğu belirtilmiştir (Hanahan ve Weinberg 2000). Ancak son yıllarda, bu özelliklere hücresel metabolizmanın düzenlenmesi ve bağışıklık tahribatının önlenmesinin eklenmesiyle sekiz temel ayırt edici özelliğin önemine dikkat çekilmektedir (Hanahan ve Weinberg 2011). Güncel olarak rapor edilen bu sekiz temel ayırt edici özellik; proliferatif sinyalleşmeyi sürdürmek, replikatif ölümsüzlüğü sağlamak, vaskülasyonu indüklemek/erişmek, istila ve metastazı aktive etmek, hücreli metabolizmayı yeniden programlamak, büyüme baskılayıcılardan kaçınmak, hücre ölümüne direnmek ve bağışıklık tahribatını önlemek için edinilen yetenekleri içermektedir (Şekil 2.3). Günümüzde kanser kavramsallaştırmasının temel bileşenlerine dahil edilmek üzere birkaç olası yeni özellik de sunulmaktadır (Hanahan 2022). Bu olası özellikler ise; fenotipik plastisitenin kilidini açma, mutasyonel olmayan yeniden epigenetik programlama, polimorfik mikrobiyomlar ve yaşlanan hücreleri içeren parametreler olarak bildirilmektedir.



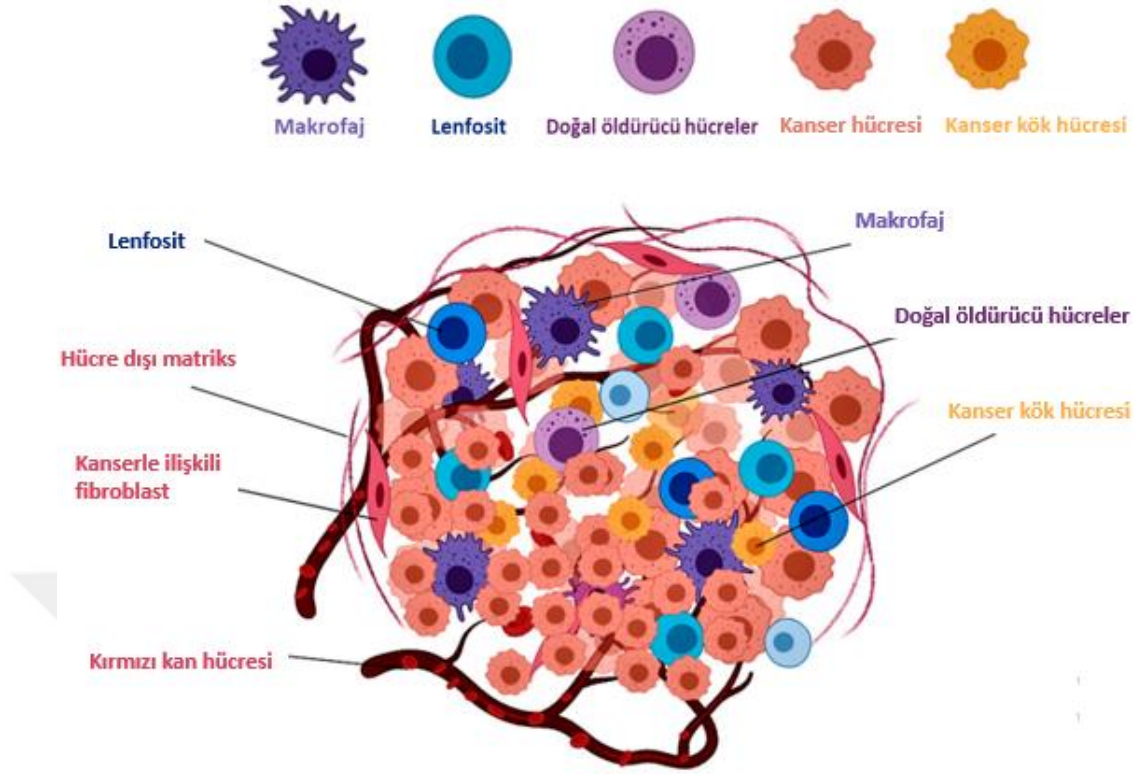
Şekil 2.3 Kanser hücrelerinin ayırt edici ve destekleyici özellikleri (Hanahan 2022)

Sağlıklı hücreler, hücre büyümesini ve bölünmesini yönlendiren büyüme tetikleyici sinyallerin üretimini ve salınımını dikkatlice kontrol ederken kanser hücreleri bu sinyalleri bozmakta ve kontrolsüz büyüme göstermektedir. Kanser hücreleri, büyüme faktörü ligandları üreterek veya tümör destekleyici stromadaki normal hücrelerin büyüme faktörleri salgılamasını uyarak proliferatif sinyalleşmeyi sağlamaktadırlar (Bhowmick vd. 2004). Tümör hücrelerinde gözlemlenen çoğu mutasyonda, reseptörlerin büyüme faktörleri tarafından uyarılması sonucunda proliferasyon tetiklenmektedir. Örneğin, Raf proteininin mutasyona uğraması sonucunda MAP-kinaz sinyalleşme yolu uyarılmaktadır. Benzer şekilde, PI3-kinaz da gerçekleşen bir mutasyon, PI3-kinaz sinyalleşmesini hiperaktif hale getirmektedir (Yuan ve Cantley 2008, Jiang ve Liu 2009, Davies ve Samuels 2010). Bazı kanser hücrelerinde ise mTOR inaktivasyonu ile PI3-kinaz sinyalleşmesi aktif hale gelmektedir (O'Reilly vd. 2006, Sudarsanam ve Johnson 2010). Kanser hücrelerinde en sık görülen genetik değişikliklerden bir tanesi de tümör baskılayıcıların kaybıdır. Örneğin; hücrelerin apoptozunu veya proliferasyonunu belirlemede büyük role sahip olan p53 ve Rb gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu sıklıkla görülmektedir (Kohno ve Yokota 1999). Bununla birlikte, kanser

hücreleri apoptoz mekanizmasını bozarak hücre ölümünden kaçabilme potansiyeline sahiptir. Hücre ölümünün önlenmesi için Bcl-2 proteininin (anti-apoptotik) yukarı regülasyonu ve BH3 proteininin (pro-apoptotik) kaybı gerçekleşmektedir (Adams ve Cory 2007, Yip ve Reed 2008).

Normal hücreler gibi kanser hücreleri de canlılığını sürdürebilmek ve çoğalabilmek için besine ve oksijene ihtiyaç duymaktadır. Dolayısıyla dolaşım sistemine erişebilmek için kan damarlarına yakın olmaları gerekmektedir. Bu nedenle, kanser hücreleri önceden var olan bir damarı sahiplenme veya pro-anjiyogenik sinyallerle yeni damar oluşumunu indüklemeye gibi mekanizmaları kullanmaktadır (Hanahan ve Folkman 1996, Kuczynski vd. 2019). Kanser hücrelerinin sahip olduğu en tehlikeli özelliklerden bir tanesi de metastaz özelliğidir. Metastaz, tümör hücrelerinin meydana geldiği dokudan başka bir dokuya yayılması ve orada yeni bir tümör oluşturma durumu olarak tanımlanmaktadır (Van Denderen ve Thompson 2013). Metastaz durumu kanser nedenli ölümlerin başlıca nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir.

Tümörün hayatta kalma durumu ve fonksiyonu tümör mikro-çevre (TMÇ) tarafından düzenlenmekte ve/veya desteklenmektedir (Wang vd. 2023). Kanser hücresinin hayatta kalmasını, lokal istilayı ve metastatik yayılımını desteklemek için TMÇ bileşenleri (Şekil 2.4) ile kanser hücreleri arasında dinamik bir ilişki bulunmaktadır. Kanser kök hücreleri, anjiyogenezi tetiklemesine ek olarak büyüme faktörlerini ve hücre dışı matriks bileşenlerini salgılaması sonucunda tümörün büyümesini ve/veya nüksetmesini destekleyen fibroblastlar ve endotel hücreler gibi farklı hücre fenotiplerini üretebilmektedir (Huang vd. 2015, Nair vd. 2017, Kulsum vd. 2019). Kanser hücrelerinin göçünde ve ilerlemesinde, kanserle ilişkili fibroblastlar ve tümör hücre dışı matriks önemli bir rol oynamaktadır (Erdoğan vd. 2017, Barrett ve Pure 2020). Ayrıca, tümör TMÇ'sinde bol miktarda bulunan makrofaj, lenfosit ve miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (Lee vd. 2018, Lin vd. 2019, Mackey vd. 2019) tümör oluşumu üzerinde olumlu ya da olumsuz etkilere sahip olmakta ve türlerine bağlı olarak iyi ya da kötü prognozla ilişkilendirilebilmektedir (Yu ve Fu 2006, Gajewski vd. 2013). Tümörle ilişkili M2 makrofajlarının büyüme teşvik ettiği ve immüno-supresyonu tetiklediği bilinmektedir (Ngambenjawong vd. 2017).



Şekil 2.4 Tümör mikro-çevrenin şematik gösterimi (Hassan ve Seno 2020)

Kanserin tedavisi amacıyla en çok uygulanan geleneksel tedavi seçenekleri arasında tümörün cerrahi rezeksiyonu, radyoterapi ve kemoterapi yer almaktadır (Arruebo vd. 2011). Bu tedavi yöntemleri arasındaki en etkili olanı erken evrede kanserin cerrahi rezeksiyonudur. Radyoterapide radyasyon aracılığıyla kanser hücrelerini apoptoza, nekroza ve/veya yaşlanmaya sürükleyen DNA hasarı oluşturulması hedeflenmektedir (Wang vd. 2018). Ancak, tümörü çevreleyen normal hücrelerin de hasar görmesi radyoterapinin kullanımını sınırlamaktadır. Kemoterapi ilaçları genotoksisite yoluyla tümör hücrelerini büyük ölçüde yok eden reaktif oksijen türleri (ROS) üretmektedir (DeVita ve Chu 2008). Üretilen ROS kaçınılmaz bir şekilde sıradan hücrelere de zarar vermekte ve hastada yorgunluk, bulantı, kusma ve saç dökülmesi gibi doza bağlı çeşitli yan etkilere neden olmaktadır (Aslam vd. 2014). Ayrıca, anti-kanser ilaç ile baskılanan kanser hücrelerinin kullanılan ilaca karşı direnç geliştirmesi de kemoterapinin diğer dezavantajları arasında yer almaktadır (Shapira vd. 2011). İlaç direncine bağlı olarak dozaj seçiminde yaşanan zorluklar, ilacın düşük spesifikliği, hızlı ilaç metabolizması ve oluşabilecek zararlı yan etkiler kemoterapinin kullanılabilirliğini sınırlamaktadır.

(Panigrahi ve Rahman Khuda-Bukhsh 2014). Dolayısıyla günümüzde doğal ve etkili alternatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2 Meme Kanseri

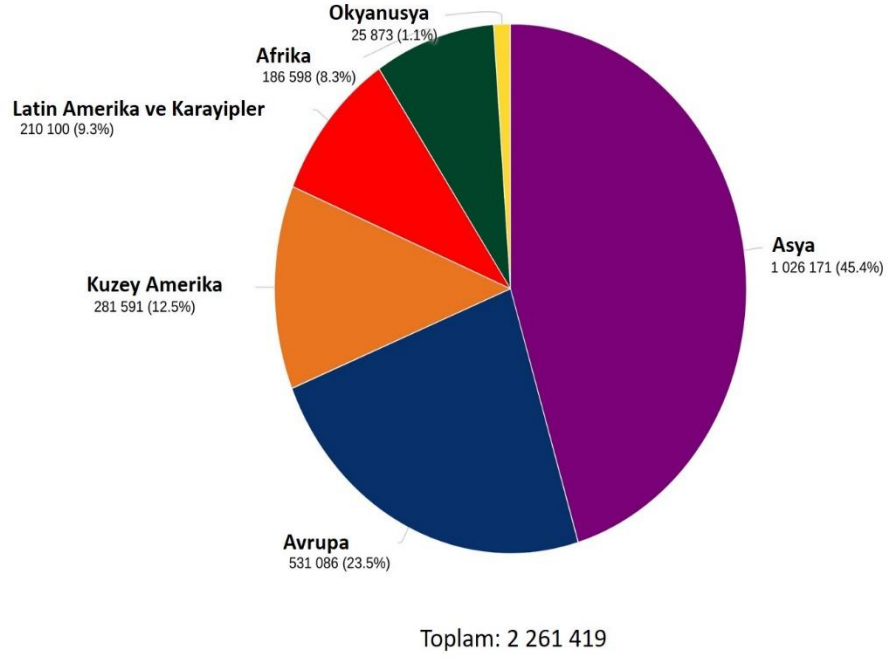
2.2.1 Epidemiyolojisi

Meme kanseri, yüksek mortalite ve morbidite oranına sahip olmasıyla birlikte özellikle kadınlarda rastlanan önemli bir sağlık sorunu olarak dikkat çekmektedir. Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı'nın sunduğu 2020 yılı istatistik verilerine göre meme kanseri, her iki cinsiyette meydana gelen toplam 2,3 milyon yeni vaka (% 11,7) ile en sık tespit edilen kanser türlerinin başında yer almaktadır (Sung vd. 2021). Özellikle kadınlarda, 2020 yılında en sık teşhis konulan kanser çeşidi olarak rapor edilmektedir (Heer vd. 2020). 2020 yılında 685.000 kadında meme kanseri nedeni ölüm meydana geldiği bildirilmektedir. Bu da kadınlarda ölümlerin % 16'sına veya her 6 ölümden % 1'ine karşılık gelmektedir (Anderson vd. 2021). Bu rakamların gelecek yıllarda özellikle gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde ve dünyanın birçok yerinde giderek artacağı düşünülmektedir. Amerikan Kanseri Derneği'ne göre meme kanseri vaka sayısının, 2020 yılına kıyasla yaklaşık % 47 artış göstererek, 2040 yılında 28,4 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Sung vd. 2021).

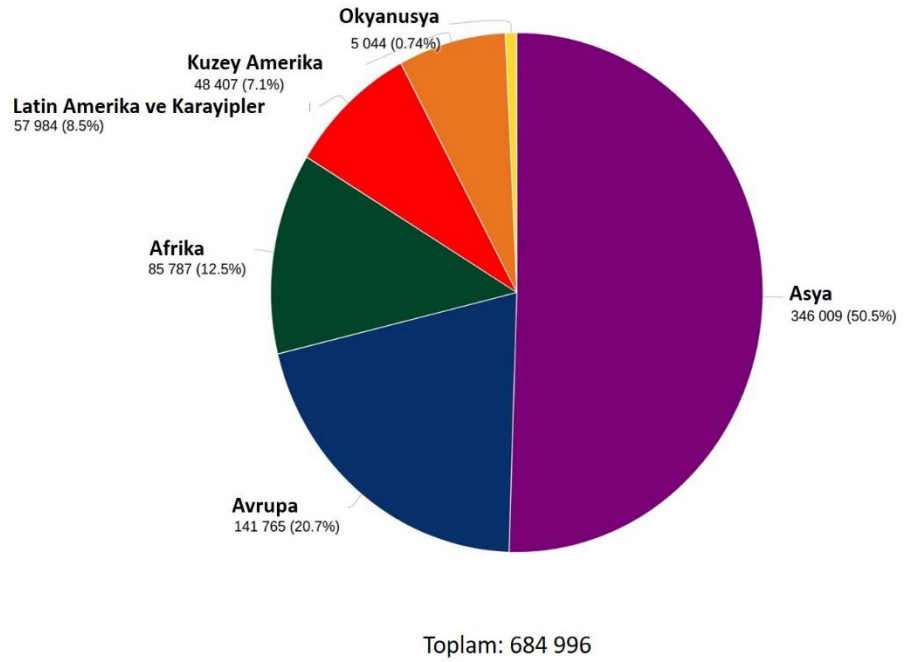
Ülkelerdeki eğitim düzeyi, ekonomik durum, çevre koşulları, beslenme alışkanlıkları ve yaşam tarzı gibi faktörlerden kaynaklanan farklılıklar nedeniyle dünya genelindeki meme kanseri insidans ve mortalite oranları (Şekil 2.5) değişiklik göstermektedir (Anderson ve Jakesz 2008, Sung vd 2021). En yüksek meme kanseri insidans oranları Avustralya/Yeni Zelanda, Batı Avrupa, Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'da gözlenirken, en düşük oranlar Orta Amerika, Doğu ve Orta Afrika ile Güney-Orta Asya'da gözlenmektedir. En yüksek ölüm oranları ise Melanezya, Batı Afrika ve Mikronezya/Polinezya'da bulunurken, dünyanın diğer bölgelerinde bu oranlar farklılık göstermektedir. GLOBOCAN 2020 verilerine göre, tüm meme kanseri vakalarının dörtte birinin gözlemlendiği Doğu Asya'yı takiben sırasıyla Kuzey Amerika (% 12,5), Güney-Orta Asya (% 11,3) ve Batı Avrupa (% 7,5) yüksek vaka sayılarıyla dikkat çekmektedir. Meme

kanseri kaynaklı ölümlerinin neredeyse yarısı Doğu, Güney Orta ve Güneydoğu Asya'da gözlemlenirken, ölüm oranları açısından Kuzey Amerika (% 7,1) ve Batı Avrupa (% 6,4) 5. ve 6. sırada yer almaktadır. Ülkemizde ise her yıl meme kanseri insidans ve mortalite oranları artış göstermektedir (Ferlay vd. 2019). Her 4 kadından birine meme kanseri tanısı konmakta ve tanı yaşı giderek erken yaşlara düşmektedir (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2017). Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı Kanser Kayıt Birimi kayıtları 2015 yılında 17.183 kadına meme kanseri tanısı konulduğunu bildirmektedir (Özmen vd. 2015). 2018 yılında ise yeni tanı alan kişi sayısının 22.345'e ulaşırken (Ferlay vd. 2018), 2020 yılında bu rakamların daha da artarak 24.175'e ulaştığı rapor edilmektedir (GLOBOCAN 2020). Diğer ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de kanser görülme sıklığı coğrafya, ekonomi, sosyal ve kültürel faktörlerden dolayı farklılık göstermektedir. Buna bağlı olarak, erken menarş (ilk adet görme), genç menapoz, 30'dan büyük olan ilk doğum yaşı, normalden az emzirme gibi birçok faktörü kapsayan batılaşmış yaşam tarzı nedeniyle Türkiye'nin batı kesiminde meme kanseri görülme sıklığının (50/100.000), Türkiye'nin doğu kesiminden daha fazla (20/100.000) olduğu belirtilmektedir (Özmen 2013).

a.



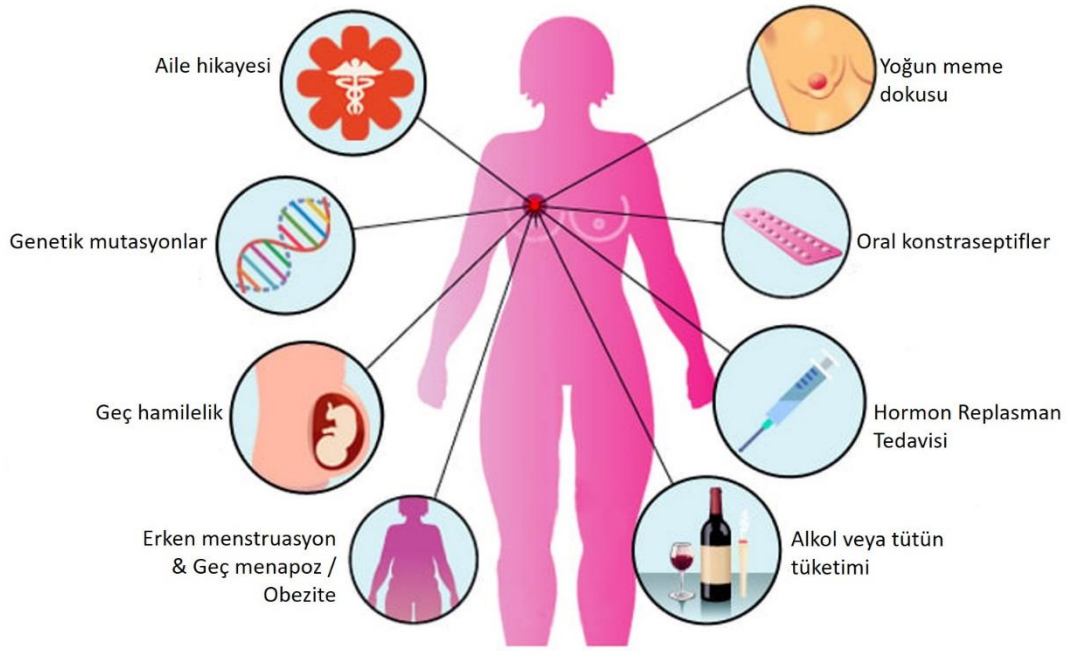
b.



Şekil 2.5 Dünya genelinde meme kanseri insidans (a) ve mortalite (b) oranları

2.2.2 Risk faktörleri

Meme kanseri gelişiminde rol oynayan çeşitli risk faktörleri Şekil 2.6’da sunulmaktadır. Bu risk faktörleri arasında cinsiyet, yaş, hormonal faktörler, beslenme alışkanlığı, alkol tüketimi, genetik durum ve radyasyona maruziyet bulunmaktadır.



Şekil 2.6 Meme kanseri risk faktörleri (Tharu 2023)

Meme kanseri vakalarının büyük bir çoğunluğu kadınlarda görülmektedir. Özellikle, meme dokusunun yoğun olduğu kadınlarda daha yüksek meme kanseri riski olduğu belirtilmektedir (Kim vd. 2020). Kötü huylu tümör vakalarının yalnızca % 1’i erkeklerde rapor edilmektedir. Neoplazma olgusuna az rastlanmasına rağmen, epidemiyolojik veri analizleri erkeklerde meydana gelen meme kanseri oluşumunda önemli bir artış olduğuna işaret etmektedir (Speirs ve Shaaban 2009, Gnerlich vd. 2011). Meme kanseri tanısı konan erkek hastalardan elde edilen doku örneklerinin detaylı histopatolojik analizleri, özellikle Bcl-2 proteininin aşırı ifadesi ile ilişkilendirilen östrojen ve progesteron reseptörlerinde önemli derecede artış olduğunu göstermektedir. Meme kanserine neden olan diğer faktörler arasında her iki cinsiyette gözlemlenen obeziteye bağlı östrojen

seviyesindeki artış ve erkeklerde testislerin hormonal fonksiyon bozukluğu veya Klinefelter sendromu yer almaktadır (Weiss vd. 2007). Cinsiyetin yanı sıra yaş da meme kanserinde birincil risk faktörlerinden bir olarak kabul edilmektedir. Meme kanseri görülme sıklığı yaşlanma ile birlikte artış göstermektedir. 2016 yılında Amerika’da meme kanserine bağlı ölümlerin yaklaşık olarak % 99,3’ünün 40 yaşından % 71,2’sinin ise 60 yaşından büyük kadınlarda meydana geldiği bildirilmektedir (Siegel vd. 2017). Bu nedenle 40 yaş ve üzeri kadınlarda sıklıkla mamografi taramasının yapılması önerilmektedir.

Hormonal durumla ilgili faktörlerin meme kanserine yakalanma riski üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır. Özellikle, östrojene maruz kalma süresiyle orantılı olarak meme kanserine yakalanma riski artmaktadır. Östrojene maruziyet, erken adet görme durumu, geç menopoza, ilk doğum yaşı ve doğum sayısına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Örneğin, 15 yaş ve sonrasında meydana gelen menarş ile 12 yaşından önceki ilk adet görme karşılaştırıldığında meme kanseri riskinde % 23’lük bir azalma olduğu rapor edilmektedir (Brinton vd. 1988). Buna bağlı olarak meme kanseri riski, menarştaki her bir yıllık gecikmede % 5 ve her doğumda % 10 azalmaktadır (Washbrook 2006, Horn 2017, Dall ve Britt 2017). Hiç doğum yapmamış veya ilk hamilelik yaşı 30 yaşın üzerinde olan kadınlarda ise meme kanseri meydana gelme riski 2-5 kat daha fazla olmaktadır. Tamamlanmamış gebeliklerde (spontan ve yapay düşükler) ise meme kanserine karşı koruyucu bir etki görülmemesinin yanında gebeliğin ikinci evresinde artan ve koruyucu etkisi olmayan progesteron nedeniyle risk artışı gözlenmektedir (Cohain vd. 2017). Ayrıca, menopoza girmemiş kadınların aynı yaştaki menopoza sonrası kadınlara kıyasla meme kanserine yakalanma riskinin daha yüksek olduğu, aynı zamanda geç menopozun steroid ifade edilen meme kanserinin gelişmesine yatkınlık yarattığı bilinmektedir (Hamajima vd. 2012). Östrojen maruziyetine neden olan diğer faktörler ise oral kontraseptiflerin kullanımı ve hormon replasman tedavisidir (HRT). HRT; menopozal veya menopoza sonrası kadınlarda ekzojen östrojen veya birçok çeşitli hormon uygulanmasını içeren bir tedavi çeşidi olarak tanımlanmaktadır. Gerçekleştirilen meta-analizler, östrojen ve progesteron içeren HRT’nin, özellikle progesteronların günlük olarak alınması durumunda meme kanseri riskini büyük ölçüde etkilediğini ve her yıl % 2,7 oranında arttırdığını göstermektedir (Group vd. 1997). Uzun süreli (≥ 5 yıl) hormonal

kontrasepsiyon tedavisi gören kadınlarda, meme kanserine yakalanma riskinin, hormonal kontrasepsiyonun sona ermesinden sonraki 5 yıl boyunca arttığı bildirilmektedir (Mørch vd. 2017). Bu tedavi yönteminin 60 yaşın üzerindeki bireylerde kullanıldığında ise hastalığın gelişme riskinin bir miktar azaldığı belirtilmektedir. Dolayısıyla, ileri yaşlardaki kadınlara uygulanması daha uygun kabul edilmektedir (Cohain vd. 2017).

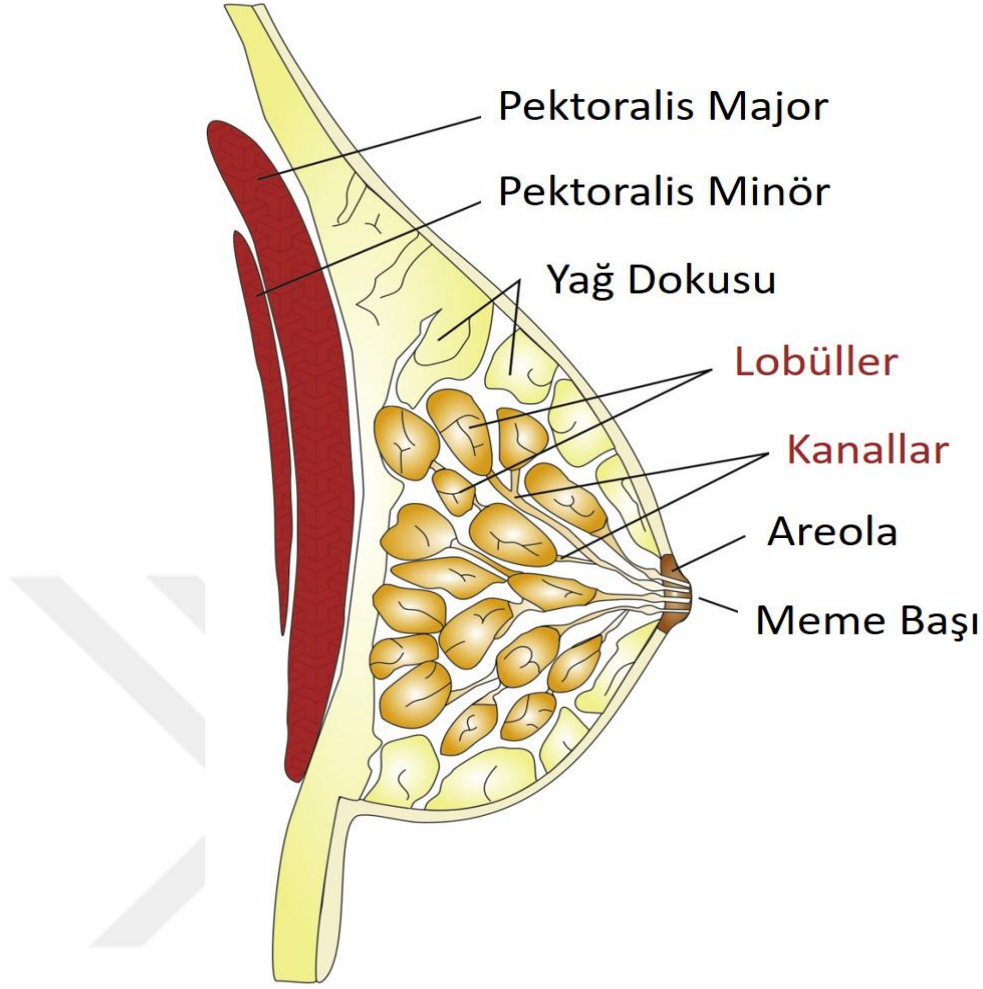
Meme kanserine ait vakaların büyük bir çoğunluğu aile öyküsüyle ilişkilendirilmektedir. Anne veya kız kardeş gibi birinci dereceden meme kanseri akrabası olan kadınların, olmayan kadınlara kıyasla daha fazla hastalık riski taşıdığı bilinmektedir (Brewer vd. 2017). Bu ilişki epigenetik değişikliklerden ve potansiyel tetikleyici olarak etkinlik gösteren çevresel faktörlerden kaynaklanmaktadır. Buna bağlı olarak, malign meme veya yumurtalık kanseri oluşma riskinin artışı ile ilişkili fonksiyon bozukluklarına neden olan en önemli genler, hücredeki tümör baskılayıcı genlerin işlevini yerine getiren BRCA1 ve BRCA2 genleri olarak tanımlanmaktadır (Antoniou 2003). BRCA proteinleri, tümör oluşumunu engellemeye yönelik DNA hasarını onarmaya dayalı bir tümör baskılama mekanizmasında yer almaktadır. Dolayısıyla, BRCA genlerindeki delesyon ve/veya fonksiyon kaybına yönelik mutasyonları, DNA onarım etkinliğinin azalmasına neden olmakta ve kanserli hücrelerin artışına yol açarak meme kanserine yakalanma riskini beş ile altı kat oranında arttırmaktadır (Kuchenbaecker vd. 2017).

Alkol tüketimi, sigara kullanımı ve kötü beslenme alışkanlığı gibi yaşam tarzına yönelik faktörler de meme kanseri gelişimi açısından önemli risk faktörleri olarak kabul edilmektedir. Aşırı alkol tüketimi, kanda bulunan östrojen ilişkili hormon seviyesinin yükselmesine ve östrojen reseptör yollarının indüklenmesine bağlı olarak meme kanseri oluşumunu teşvik etmektedir. Gerçekleştirilen çalışmalar, 35-44 gram günlük alkol alımının, meme kanseri riskini % 32 oranında arttırdığını, ilave her 10 gram alkol alımının ise bu oranda % 7,1'lik bir artışa sebebiyet verdiğini rapor etmektedir (Hamajima vd. 2002, Jung vd. 2016). Tütün içerisindeki bazı maddelerin ise kanserojen özellikler sergilediği bilinmektedir. Benzopiren; DNA metilasyonunda bozulmalara, gen ifadesinin düzensizleşmesine ve genomik bütünlüğün kaybına neden olmaktadır. 4-aminobifenil ise DNA eklentilerinin oluşumunda rol oynayarak meme kanseri oluşumunu desteklemektedir (Sadikovic ve Rodehiser 2006, Sheikh vd. 2017).

Beslenme alışkanlığı ise meme kanseri gelişiminde önemli rol alan bir diğer faktör olarak belirtilmektedir. Doymuş yağlar ve şeker açısından zengin olan yüksek kalorili besinlerin aşırı tüketimi ve ω -3 yağ asitleri, doğal antioksidanlar, lif içeren sağlıklı gıdaların az tüketimiyle karakterize edilen hareketsiz yaşam tarzı obeziteye neden olmaktadır. Oluşan mevcut metabolik durum ise, yağ dokusu iltihabının artmasına katkıda bulunmakta ve meme kanseri gelişimi ve ilerlemesi için uygun koşullar sunan mikro-çevreye neden olmaktadır. Doymuş yağlar, karbonhidratlar ve işlenmiş et ürünlerinin aşırı tüketimi endojen östrojen, insülin benzeri büyüme faktörleri ve pro-inflamatuvar sitokinlerin dolaşımdaki seviyelerini arttırmakta ve buna bağlı olarak meme kanseri için potansiyel risk oluşturmaktadır. Buna karşılık lif, ω -3 çoklu doymamış yağ asitleri, C ve E vitaminleri, meyve ve sebzeler ise oksidatif stresi ve kronik inflamasyonu azaltarak koruyucu bir etki sergilemektedir (Skouroliaou vd. 2018). Dolayısıyla kilo kontrolü ve kaliteli beslenmeyi de içeren sağlıklı bir yaşam tarzı, meme kanseri gelişim riskini azaltabilmek ve tanı sonrası tedavi sonuçlarını olumlu yönde etkilemek için gerekli kabul edilmektedir.

2.2.3 Gelişimi ve metastazi

Meme kanseri, meme dokusu orijinli hücrelerin düzensiz büyümesi ve çoğalması sonucunda meydana gelmektedir (N'Da vd. 2010). İnsan memesi, stromal doku ve glandüler doku olmak üzere iki tip dokudan oluşmaktadır. Stromal dokular memenin lifli ve yağlı bağ dokularını içerirken, glandüler dokular lobülleri yani süt üreten bezleri ve süt taşıyan kanalları kapsamaktadır (Şekil 2.7). Meme ayrıca hücrel sıvıları ve atıkları giden lenfatik bağışıklık sistemi bileşenlerini de içermektedir.



Şekil 2.7 İnsan memesinin anatomik yapısı (Feng vd. 2018)

Gelişiminin çoğu menarş ile menopoz arasındaki doğum sonrası dönemde gerçekleşen meme dokusu, benzersiz ve dinamik bir organdır (Ingthorsson vd. 2022). Ergenlik, hamilelik ve emzirmeyle bağlı dönemlerde steroid hormonu ve büyüme faktörü reseptör sinyalleşmesi nedeniyle büyüklük, şekil ve işlev açısından zamanla değişikliğe uğrayabilmektedir (Huebner ve Ewald 2014). Meme gelişim süreci, farklı hücre tipleri (kök hücreler, epitelyal ve stromal hücreler), hormonlar (östrojenler, progesteron ve prolaktin), otokrin ve parakrin faktörler arasındaki çeşitli etkileşimleri içermektedir (Ingthorsson vd. 2022, Berliere vd. 2023). Bu süreçte, özellikle meme bezinin gelişimini anlamak meme kanserinin oluşumunu kavramak için oldukça önemlidir. Meme bezi, karmaşık yapıdaki stromada gömülü ve oldukça dallanmış bir epitelyal tüp ağından oluşmaktadır. Meme epiteli embriyonik gelişim sırasında epidermal plakoddan farklılaşmaktadır (Huebner ve Ewald 2014). Bu plakodlar, altta yatan mezenkimin içine

inerek doğumda mevcut olan bezin gelişmemiş duktal yapısını oluşturmaktadır (Macias ve Hinck 2012, Huebner ve Ewald 2014). Meme epiteli arasında kök ve progenitör hücrelerden oluşan bir hiyerarşi mevcuttur (Visvader ve Stingl 2014, Inman vd. 2015). Epitelyal bölme içindeki bu hücrelerde meydana gelen mutasyonlar meme kanserinin hücre kökeni ile bağlantılı olmaktadır. Bu mutasyonlara sıklıkla *TP53*, *PIK3CA*, *MYC*, *PTEN*, *CCND1*, *FGFR1* ve *GATA3* genlerinde rastlanmaktadır (Nik-Zainal vd. 2016). Bu genler p53, siklin D1, MYC, HER2, FGFR1 ve PTEN gibi hücre döngüsü modülatörlerini kodlamaktadır (Yates ve Desmedt 2017). Genlerdeki hipometillenme durumu gen aktivasyonunu, onkogenlerin yukarı regülasyonunu ve kromozomal instabilitiyi indüklemektedir. Bunun aksine lokusa özgü hipermetillenme durumu DNA onarımının susturulmasına yönelik genin baskılanmasına ve genetik dengesizliğe neden olmaktadır. Bunlara ek olarak, nükleozomal yeniden yapılanmayı ve gen ifadesini susturmak amacıyla kromatin yapısında değişiklik yaratan DNA metilasyonu aracılı histon kuyruğu modifikasyonlarını içeren epigenetik mekanizmalar da bulunmaktadır (Ediriweera vd. 2019).

Kanser kök hücre ve klonal evrim modeli köken hücre düzeyinde meme kanseri gelişimini açıklamaktadır (Libow ve Neufeld 2008). Klonal evrim modelinde meme epitel hücrelerinde rastgele mutasyonların birikmesi sonucunda epigenetik değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişikliklerden sonra “en uygun” hücreler tümörün ilerlemesine katkıda bulunmak üzere hayatta kalmaktadır. Kanser kök hücre modelinde ise yalnızca öncü kanser hücrelerinin başlattığı ve ilerlemeyi sürdürdüğü bir kanser gelişim mekanizması savunulmaktadır. Ayrıca, iki model arasında dinamik bir bağlantı sağlanarak kanser kök hücrelerinin klonal evrime uğrayabileceği öne sürülmüştür. Normal gelişim ile kanserin moleküler düzeyde ilerlemesi arasında paralellikler bulunmaktadır (Macias ve Hinck 2012, Huebner ve Ewald 2014). Normal gelişim sürecinde, hücrelerin birbirleri arasındaki ve çevreleriyle sürdürdüğü iletişim oldukça karmaşık olup sinyal yolları tarafından düzenli bir şekilde kontrol edilmektedir (Hunter 2007). Tümörigenezde ise bu sinyal yolları birçoğu kanser hücreleri ve kanser kök hücreleri tarafından düzensizleştirilmekte veya ele geçirilmektedir (Sever ve Brugge 2015). Normal ve sağlıklı bir meme bezinin gelişim sürecinde kritik role sahip olan ve işlevinin bozulması sonucunda meme kanseri kök hücre fonksiyonlarını düzenleyen

sinyal yollarından en önemlileri östrojen reseptörü (ER), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ve kanonik Wnt sinyal yollarıdır.

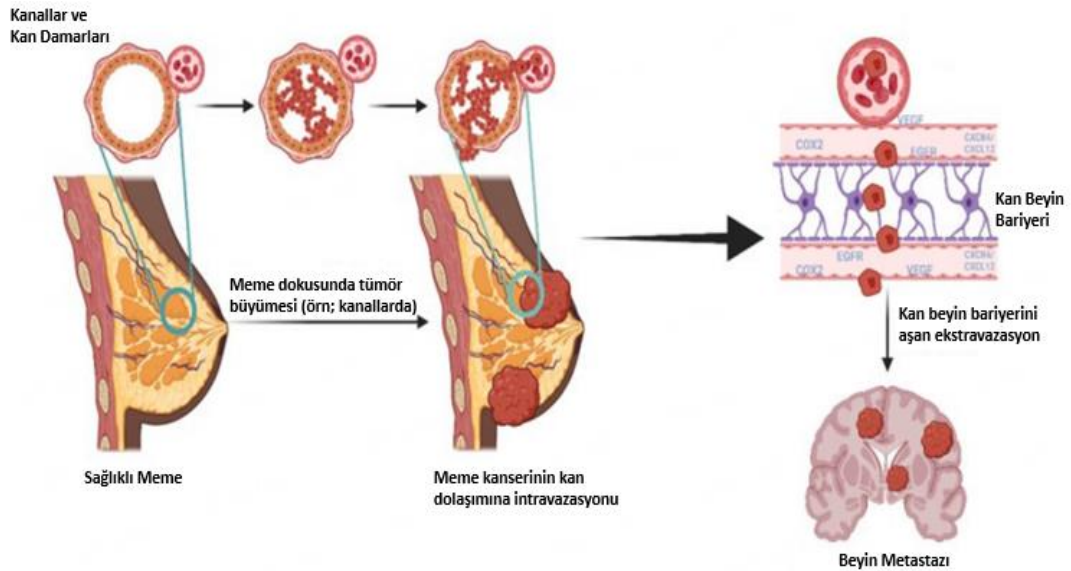
Meme kanserlerinin büyük bir kısmı östrojene bağımlı olarak gelişmekte ve ER ifade etmektedir. ER α , meme epitelinde bulunan ER alt tipi olup meme kanserinin ilerlemesinde kritik bir rol oynamaktadır (Hewitt vd. 2000). Östrojenin ER α 'ya bağlanması üzerine, aktifleşen ER α çekirdeğe doğru ilerlemekte ve hedef gen promotor bölgesindeki duyarlı elemente bağlanarak gen transkripsiyonunu uyarmaktadır (McKenna vd. 1999). ER α 'nın memede tümör gelişimini teşvik ettiği mekanizmalardan biri, siklin D1 ifadesinin indüklemesine dayanmaktadır (Said vd. 1997, Zwijssen vd. 1997 ve Cicatiello vd. 2004). Siklin D1, çoğu kanser hücresinde hücre döngüsünün G1'den S fazına ilerlemesini kontrol eden sikline bağımlı kinaz 4 ve 6'nın önemli bir aktivatörüdür (Lundberg ve Weinberg 1999).

Normal dokularda düşük düzeyde HER2 membran proteini ifade edilirken meme kanserinde HER2'nin aşırı ifadesi gözlemlenmektedir. HER2 sinyal yolu, membran reseptörü ve ligandları, protein kinazları ve çeşitli hücresel fonksiyonları etkileyen düzenleyici genlerden oluşan karmaşık bir sinyalleşme ağına sahiptir. HER1, HER2, HER3 ve HER4 olmak üzere dört transmembran reseptörü arasından HER2 meme kanserindeki en baskın tirozin kinaz reseptörü olarak kabul edilmektedir (Normanno vd. 2005). Ligand aracılığıyla aktif hale gelen HER2; hücre proliferasyonunu, hücrenin hayatta kalmasını ve transkripsiyon yollarının sinyal çevriminin ve aktivatörünün etkinliğini arttırmaktadır (Serra vd. 2011).

Meme kanserinin önemli bir kısmında Wnt aktivitesinin yukarı regülasyonu rapor edilmektedir. Buna bağlı olarak meme kanserlerinin % 60'ı yüksek seviyelerde β -katenin ifadesi ile karakterize edilmektedir (Howe ve Brown 2004). Wnt sinyal yolağı, plazma zarındaki hücre-hücre bağlantılarının yapısal bir bileşeni veya çekirdekdeki transkripsiyonun bir düzenleyicisi olabilen iki işlevli bir protein olan β -katenin'in stabilizasyonuna neden olmaktadır. Normal koşullar altında, serbest halde sitoplazmada bulunan β -katenin, APC, Axin ve GSK3 β kinazını içeren çoklu protein kompleksinin etkisiyle parçalanmaktadır (Behrens 1999). Ancak, bu mekanizmanın bir Wnt ligandı ile

uyarılması sonucunda bu protein kompleksinin aktivitesi inhibe edilmektedir. Buna bağlı olarak, sitozolde bulunan β -katenin seviyeleri yükselmekte ve β -katenin'in çekirdeğe girişi artmaktadır. Çekirdeğe ilerleyen β -katenin çeşitli spesifik hedef genlerin ifadesini uyarmaktadır. Transkripsiyonel hedef genler arasında *siklin D1* ve *c-Myc* gibi onkogenlerin varlığı ise kanserde aşırı Wnt sinyalleşmesinin zararlı etkilerini anlamak için bir çerçeve sunmaktadır (Hamada 2009, Giles vd. 2003).

Meme kanseri, başta kemik, akciğerler, karaciğer ve beyin olmak üzere birçok organa metastaz yapabilmektedir (Wang vd. 2019). Ardışık bir dizi aşamadan oluşan metastaz (Şekil 2.8), primer tümör kökenli hücrelerin çevredeki konak dokuyu lokal invazyonu ile başlamakta ve kan veya lenfatik damarların içine sızması ile devam etmektedir (Hunter vd. 2008, Talmadge ve Fidler 2010). Kan ve lenfatik damar yolu aracılığı ile uzak organlara yayılabilen tümör hücreleri hedef organın parankimine sızmadan, çoğalmadan ve organ içindeki anjiyogenezi teşvik etmeden önce, hücre döngüsünü durdurmakta ve hedef organ içindeki kılcal yataklara yapışmaktadır. Bu adımları gerçekleştirirken tümör hücrelerinin canlılığını sürdürebilmesi için konağın bağışıklık tepkisinden ve apoptotik sinyallerden kaçması gerekmektedir (Hunter vd. 2008). Bu adımların başarılı bir şekilde tamamlandığı durumda, “metastaz metastazı” olarak bilinen ikincil metastaz tekrarlanabilmektedir (Poste ve Fidler 1980, Talmadge ve Fidler 2010).



Şekil 2.8 Meme kanseri kaynaklı beyin metastazı (Klaas vd. 2023)

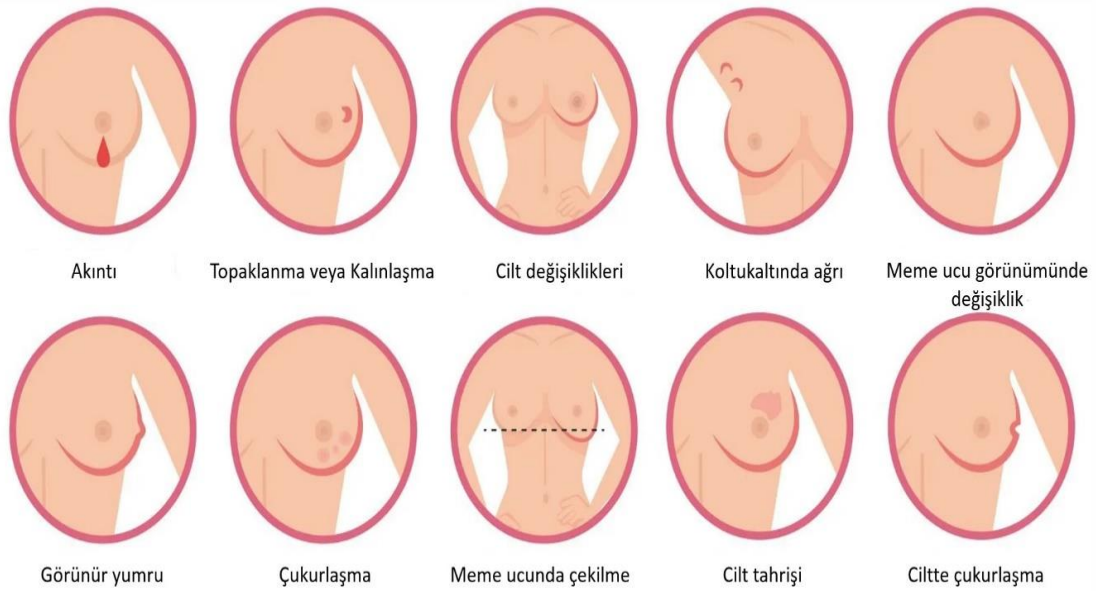
İnvazyon öncesinde tümör hücrelerinin hücre dışı matrikse (HDM) bağlanma şekillerini değiştirmeleri gerekmektedir. Bu bakımdan hücreler arası yapışmayı artıran kaderin ailesi, meme kanseri metastazı ile ilişkilendirilmektedir (Meirson vd. 2020). E-kaderinin aşağı regülasyonu, epitelyal meme kanseri hücreleri ile diğer epitelyal hücreler arasındaki yapışmanın kaybına yol açarken, N-kaderindeki ve diğer mezenkimal kaderinlerdeki artış ise tümör hücrelerinin stromal hücrelere yapışmasına ve ardından tümör hücrelerinin stromaya yayılmasına izin vermektedir (Cavallaro ve Christofori 2004). İnvazyon sırasında, HDM bozularak doku sınırlarının istila edilmesine olanak sağlamaktadır. Tümör hücreleri, integrinler (fibronektin, laminin, kollajen, fibrinojen ve vitronektin gibi HDM bileşenleri üzerinde bulunan transmembran reseptörleri) aracılığı ile HDM'ye bağlanmaktadır (Mego vd. 2010, Li ve Feng 2011). HDM'nin bozulmasına ise metaloproteinazlar ve ürokinaz plazminojen aktivatör sistemi (UPA) aracılık etmektedirler (Egeblad ve Werb 2002, Danø vd. 2005). Dolayısıyla, hasta UPA seviyeleri uzak metastaz gelişiminin güvenilir bir göstergesi kabul edilmektedir (Harbeck vd. 2004).

İnvaziv bir fenotip elde etmek için tümör hücrelerinin meydana geldiği birincil bölgeden göç etmesi gerekmektedir. Bu bağlamda tümör hücreleri tek tek veya koordineli olarak göç edebilmektedirler (McSherry vd. 2007). Toplu göç eden tümör hücreleri HDM boyunca kollajen lifleri bölünmüş bir şekilde tüp benzeri mikro kanallar oluşturmaktadır. Diğer yandan tek tek göç eden tümör hücreleri, proteaza bağımlı mezenkimal hareket veya proteazdan bağımsız amipoid hareket ile göç etmektedirler. Ayrıca, TMÇ'nin metastazı etkilediği düşünülmektedir (Wang vd. 2020). Fibroblastları, bağışıklık hücrelerini, endotel hücrelerini ve HDM'yi içeren mikro-çevre, tümör büyümesini düzenlemektedir (Kiehn ve Car 2017). TMÇ ile etkileşimler *in situ* meme kanserinin metastatik meme kanserine ilerlemesine neden olmaktadır (Cordeiro 2014). Örneğin, mikro-çevrede toplanan makrofajların invaziv olmayan meme tümör hücrelerinde anjiyogenezi indüklediği ve malign transformasyonu teşvik ettiği bilinmektedir (Lin ve Pollard 2007). Aynı zamanda bilimsel kanıtlar tümör hücrelerinin hedef organlara yönlendirilmesinde kemokinlerin rol oynadığını göstermektedir. Buna bağlı olarak, meme kanseri dokusunda kemokin reseptörü 4'ün yüksek oranda ifade edilirken kemokin ligandı 12'nin daha çok lenf düğümleri, akciğer, karaciğer ve kemik iliğinde yüksek oranda ifade edildiği; ince bağırsak, böbrek, beyin, deri ve iskelet kasında ise az ifade

edildiği bilinmektedir (Müller vd. 2001). Anjiyogenez de metastaz gelişiminde önemli role sahip faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Farhat vd. 2009). Tümör hücreleri, sahip olduğu anormal kan damar yapısı nedeniyle, tümör hipoksisine neden olan oksijen kıtlığına maruz kalmaktadır (Jain 2005). Bu durum tümör hücrelerini daha fazla pro-anjiyogenik faktör üretmeye teşvik etmesiyle anormal damar yapısında artış meydana gelmektedir. Bu döngünün neden olduğu şiddetli hipoksik mikro-çevreden kaçmak için invazif ve metastatik programlar devreye girmektedir (Leite De Oliveira vd. 2011).

2.2.4 Tanı yöntemleri ve belirteçleri

Meme kanseri tanısı, görüntüleme teknikleri ve ağrı veya ele gelen kitle gibi semptomların izlenmesi ile konulabilmektedir (Şekil 2.9). Tanısal görüntüleme teknikleri ve görüntü klavuzluğunda gerçekleştirilen iğne biyopsileri, meme kanserli hastaların tanısında, kanserin evrelendirilmesinde ve tedavi planlamasında merkezi bir rol oynamaktadır.



Şekil 2.9 Meme kanseri semptomları

Mamografi, meme kanseri tespitinde uygulanan temel diyagnostik yaklaşımlar arasında ilk sıralarda yer almaktadır (Smetherman 2013). Memenin X-ray görüntüsü olan tanısal

mamogramlar, ele gelen bir kitle veya başka bir meme hastalığı semptomu olan ve önceki 5 yıl içinde meme kanseri öyküsü olan veya anormal bir tarama mamografisi nedeniyle ek görüntüleme için geri çağrılan kadınlarda uygulanmaktadır. Tanısal mamogramlar, meme dokusunun bir bölgesinin fokal olarak sıkıştırılmış ve büyütülmüş görüntülerini sunmaktadır. Karsinomlar; kitleler, asimetrliler ve kalsifikasyonlar şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bu kitlelerin şekli yuvarlak, oval, lobüler veya düzensiz kenar sınırları belirsiz ve spikülerdir. Kalsifikasyonlar iyi huylu hastalıklarda büyük ve kaba bir görünüme sahipken karsinomlarda kümelenmiş amorf, belirsiz, pleomorfik veya ince, doğrusal veya dallanan bir yapıya sahiptir.

Manyetik rezonans görüntüleme (MRG), radyasyon uygulanmasına ihtiyaç duymadan yüksek çözünürlüklü görüntü sunan bir görüntüleme sistemidir. MRG zayıf seçicilik ve kontrast madde kullanımı nedeniyle bazı özel durumlarda tanısal mamografiye yararlı bir yardımcı olarak uygulanmakta olup rutin olarak kullanılmamaktadır (Van Goethem vd. 2006, Kerlikowske vd. 2011). Memenin MRG'si intravenöz kontrast madde enjeksiyonu sonrasında lezyonların kontrastlanmasına dayanmaktadır. Manganez, demir ve gadolinyumun geniş aralıktaki paramanyetik metal iyon kompleksleri MRG kontrast maddeleri olarak kullanılmaktadır. Bu kontrast maddelerinin kullanımı birçok yan etki ve dezavantajla ilişkilendirilmektedir. Örneğin, galadyumun transmetilasyona uğrayarak önemli toksisitelere neden olduğu bilinmektedir (Nounou vd. 2015).

Meme ultrasonografisi, elle hissedilen bulgularda ve diğer görüntüleme tekniklerinde gözlemlenen anormallikler veya şüpheli durumlarda uygulanmaktadır. Kistik kitleleri katı kitlelerden kolaylıkla ayırt edebilmeyi sağlamak ve katı kitlelerin şüpheli ve biyopsi gerektirecek özelliklerini göstermektedir (Athanasίου vd. 2009, Shetty 2011). Bu teknik, yoğun meme dokusu için yararlı bir tanı yöntemi olarak kabul edilmekte ve mamografide gizlenen meme kanserlerini tespit etmeye olanak sağlamaktadır (Bae vd. 2014).

Moleküler meme görüntüleme (MMG), memenin yüksek çözünürlüklü fonksiyonel görüntülerini sağlamak için mamografik konfigürasyonda küçük yarı iletken tabanlı γ kameralarının kullanıldığı nükleer bir tıp tekniğidir (O'Connor vd. 2009). MMG

görüntüleme ajanı enjeksiyonundan 5 dakika sonra meme iki dedektör arasında hafifçe sıkıştırılarak görüntü elde edilmektedir. MMG özellikle küçük meme lezyonlarını saptanmayı ve yoğun meme dokusuna sahip hastalarda tanıyı kolaylaştırmaktadır.

Meme kanseri tanısı için en kesin yöntem meme biyopsisidir. Meme biyopsisinin birkaç farklı türü bulunmaktadır (Palmer ve Tsangaris 1993). Bunlardan en bilinenleri “İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi” ve “Çekirdek İğne Biyopsisi”dir. İnce İğne Aspirasyon Biyopsi tekniğinin prensibi, memeye ince ve içi boş bir iğne batırılarak şüpheli lezyondan analiz edilmek üzere hücre toplamaya dayanmaktadır (Chaiwun ve Thorner 2007). Çekirdek İğne Biyopsisinde ise daha büyük bir iğne kullanılmakta ve patolojik analiz için yaklaşık bir pirinç tanesi büyüklüğünde çekirdek olarak isimlendirilen birkaç küçük doku parçası çıkarılmaktadır (Neal vd. 2014). Bahsedilen tanı yöntemleri göz önünde bulundurulduğunda tanısal doğruluğu arttırmak ve mümkün olduğunca yanlış negatif sonucu ortadan kaldırmak amacıyla klinik meme muayenesine ek olarak meme görüntüleme ve biyopsinin eş zamanlı olarak gerçekleştirilmesi önerilmektedir.

Görüntüleme tekniklerinin yanı sıra, biyokimyasal biyobelirteçlerin kullanımı da meme kanseri hastalarında tanı ve tedavi araçları olarak kullanılmaktadır. Biyobelirteç, dokularda veya kan gibi vücut sıvılarında bulunan ve vücutta meydana gelen normal sürecin sinyali veya hastalıkla bağlantılı olan herhangi bir molekül olarak tanımlanmaktadır (Moar vd. 2023). Çeşitli biyobelirteçlerin (Çizelge 2.1) kullanılması, meme kanseri tanısı ve takibi için önem taşımaktadır (Duffy vd. 2017).

Uygun biyobelirteçler, meme kanseri patogenezinde yer alan hücrel ve moleküler yolların daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır. Buna bağlı olarak, etkin ve spesifik biyobelirteçler meme kanserli hastalarda uygulanmak üzere etkili terapötik yaklaşımların tasarlanmasına ve tedaviye yanıtın izlenmesine olanak sağlamaktadırlar. Çeşitli bilimsel çalışmalar, proteinler (örn., Her2, ER ve Ki67), mRNA’lar (örn., ER α , ER β ve ERR γ), enzimler (örn., CEA ve TSGF) ve mikroRNA’lar (örn., miR-10b, miR-21, miR-145 ve miR-155) dahil olmak üzere çeşitli biyokimyasal biyobelirteçlerin meme kanseri hastalarının tespiti ve izlenmesi için tanı amacıyla kullanılabilir olduğunu göstermektedir (Kuroki-Suzuki vd. 2007, Duffy vd. 2017).

Çizelge 2.1 Meme kanserinde kullanılan biyobelirteçler (Neves Rebello Alves vd. 2023)

Biyobelirteç	Meme Kanserindeki Rolü	Kaynak
Ki-67	Protein ifadesi, hücre çoğalması ve daha yüksek protein seviyeleri ile ilişkilendirilmektedir.	(Menon vd. 2019, Rakha vd. 2022)
ER	Ligandla aktive olan ve transkripsiyon faktörü fonksiyonuna sahip nükleer reseptörüdür. Ana izoformu, hücre sağkalımı ve çoğalması ile ilişkili olan ER α 'dır.	(Mills vd. 2018, Fuentes Silveyra 2019)
PR	Ligandla aktive olan ve transkripsiyon faktörü fonksiyonuna sahip nükleer reseptörüdür. Hücre döngüsü, farklılaşması ve proliferasyonu ile ilgili genlerin ifadesi ile ilişkilendirilmektedir.	(Hilton vd. 2018, Cenciarini ve Proietti 2019)
HER2	Reseptör sinyali; tümör büyümesine ve çoğalmasına, yapışmasına, hücre sağkalımına ve metastaza yol açmaktadır.	(Nicolini vd. 2018, Harbeck vd. 2019)
P53	Hücre döngüsü durması, farklılaşma, yaşlanma, apoptoz, hücre büyümesi ve DNA onarımında rol oynayan tümör baskılayıcı proteindir. İşlevinin bozulması tümör oluşumu, ilerlemesi ve metastazı ile bağlantılıdır.	(Shahbandi vd. 2020, Xu et vd. 2021)
BRCA1/BRCA2	DNA onarımında temel olan tümör baskılayıcı genlerdir. İşlev kaybı, verimsiz DNA onarımı, artan mutasyon oranları ve tümör gelişimine katkıda bulunmaktadır.	(Ben Ayed-Guerfali vd. 2021)
PTEN	Hücre döngüsü ilerlemesi, hücre büyümesi ve hayatta kalma ile ilgili tümör baskılayıcı gendir. Gendeki mutasyonlar proliferasyon, invazyon ve metastaz ile ilişkilendirilmektedir.	(Carbognin vd. 2019, Chen vd. 2022)
CHEK2	Hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre proliferasyonunun inhibisyonu, DNA onarımının aktivasyonu ve apoptoz ile ilişkili tümör baskılayıcı gendir. DNA hasarı onarımında rol oynayan serin/treonin CHK2 kinaz proteinini kodlamakla sorumludur.	(Kleiblova vd. 2019, Greville-Heygate vd. 2020, Boonen vd. 2022)

Çizelge 2.1 Meme kanserinde kullanılan biyobelirteçler (devamı)

ATM	DNA çift iplik kopma onarım mekanizması ile ilişkili gendir. DNA onarımına ve hücre döngüsünün düzenlemesine katılan proteinleri kodlamaktadır.	(Cunha vd. 2021, Toss vd. 2021, Moslemi vd. 2021)
PALB2	PALB2'yi kodlayan, BRCA2 nükleer lokalizasyonundan ve DNA hasarı onarımından sorumlu tümör baskılayıcı gendir.	(Nepomuceno vd. 2017)
BRIP1	BRCA1 ile etkileşime girerek hasarlı DNA'nın onarılmasına yardımcı olan RecQ DEAH helikaz ailesine ait bir proteini kodlayan tümör baskılayıcı gendir.	(Moyer vd. 2020, Khan ve Khan 2021)
CDH1	Tümör hücrelerinin göçünü önleyen, kanserin ilerlemesini ve metastazlarını önleyen E-kaderin hücre-hücre yapışma proteinini kodlayan tümör baskılayıcı gendir.	(Bücker ve Lehmann 2022)
BARD1	BRCA1- DNA hasarı onarımıyla ilgili bağlayıcı proteindir. Yüksek ifadesi daha kötü prognozla ilişkilidir.	(Zhu vd. 2018, Zheng vd. 2021)
PIK3CA	Proliferasyon ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan gendir. PI3K proteini, protein sentezi, hücre çoğalması, hayatta kalma, glikoz homeostazı ve DNA onarımı gibi çeşitli hücresel olaylarda rol oynamaktadır.	(Thorpe vd. 2015, Venetis vd. 2020, Reinhardt vd. 2022)

2.2.5 Sınıflandırılması ve evreleri

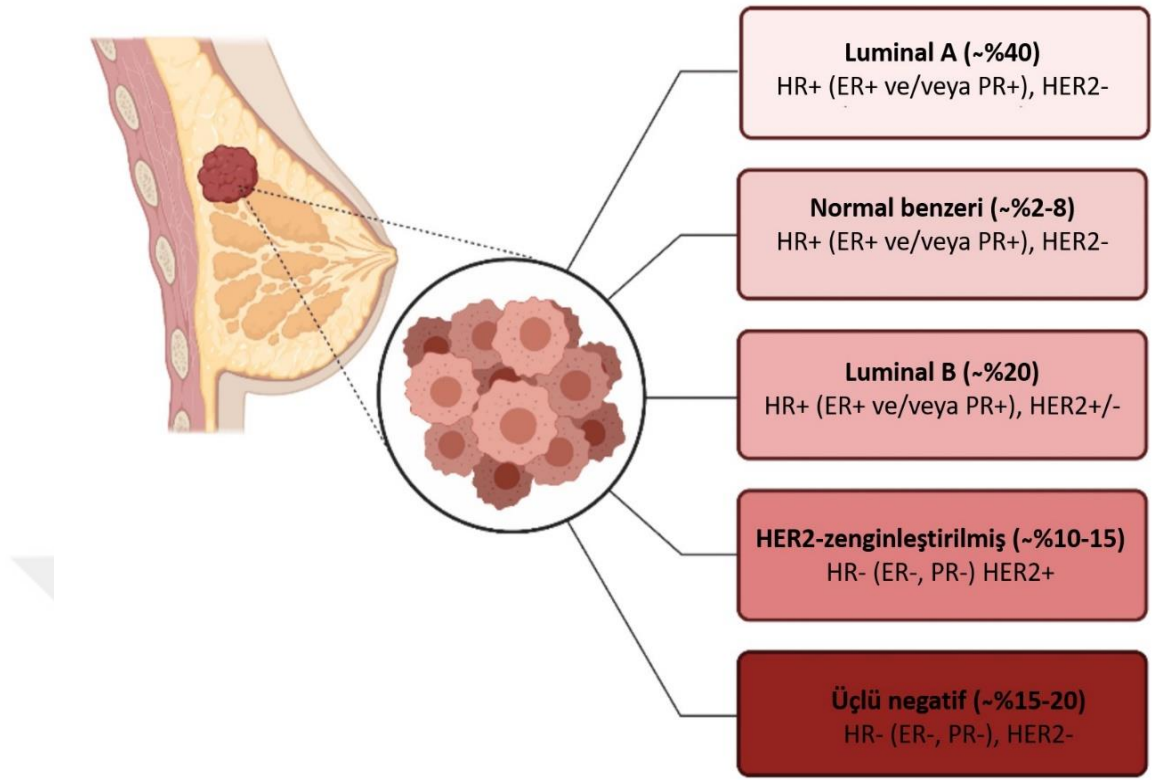
Meme kanserinin kanallar, lobüller veya aradaki dokular olmak üzere memenin farklı bölgelerinde ortaya çıkabilen birçok çeşidi bulunmaktadır. Meme kanserinin türü meydana geldiği ve gelişim gösterdiği hücre kökenine bağlı olarak belirlenmektedir. Hücre kökeni göz önünde bulundurulduğunda meme kanseri; sarkomlar ve karsinomlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Karsinomlara kıyasla daha nadir rastlanan bir meme kanseri çeşidi olan sarkomlar, memenin miyofibroblastlar ve kan damarı hücrelerini içeren stromal bileşenlerinden köken almaktadır. Karsinomlar ise süt yapımından sorumlu lobülleri ve terminal kanalları kaplayan hücrelerden oluşan memenin epitelyal

bileşeninden kaynaklanmaktadır. Meme kanserlerinin çoğunu kapsayan karsinom grubunun, birincil tümör bölgelerine kıyasla invazivlik derecelerine göre birçok farklı türü bulunmaktadır. Her bir meme kanseri türünün farklı prognozu ve tedavi sonucu olduğundan, farklı alt tipler arasında kesin ve doğru bir ayırım yapabilmek oldukça önemli kabul edilmektedir. Patolojik özelliklerine ve invazivlik derecelerine göre, yaygın olarak rastlanan meme kanserleri invaziv olmayan (*in situ*) ve invaziv meme kanserleri olarak değerlendirilmektedir.

İnvaziv olmayan (*in situ*) meme kanseri bulunduğu lobül veya kanallardan uzaklaşmamış kanser türüdür (West vd. 2017). İnvaziv olmayan meme kanseri, *in situ* duktal karsinoma, süt kanallarında meydana gelmekte ve dokunun çevresine veya dışına yayılım göstermemektedir. Gelişim gösteren atipik hücreler her ne kadar lobüllerin veya kanalların dışındaki dokulara yayılmamış olsalar bile ilerleyen zamanda yayılım göstererek invaziv meme kanserine dönüşebilmektedirler. Benzer şekilde, lobüllerde gözlemlenen *in situ* lobüler meme karsinomu da lobüllerin dışına yayılım göstermemesi nedeniyle invaziv olmayan kanser türü olarak kabul edilmektedir.

İnvaziv meme kanserinde ise tümör hücreleri lobüllerin veya süt kanallarının içinde meydana gelmekte ve yakınındaki dokulara yayılmaktadır (Harris vd. 2016). Bu kanser türü kadınlarda en sık görülen karsinom çeşiti olarak rapor edilmektedir (Prabhakaran vd. 2017). Meme kanserlerinin % 10 ile % 15'ini oluşturan infiltrate lobüler karsinoma veya invaziv lobüler karsinoma (İLK), memenin süt bezlerinden kaynaklanmakta ve vücudun diğer bölgelerine yayılmaktadır (N'Da vd. 2010). İnfiltratif duktal karsinoma veya invaziv duktal karsinoma (İDK), memenin süt kanallarından kaynaklanmakta ve kanalların duvarına kadar uzanmasıyla birlikte meme yağ dokularını ve vücudun diğer kısımlarını istila etmektedir (Somari vd. 2003). İDK, meme kanseri teşhislerinin % 80'ini oluşturan en yaygın meme kanseri türü olarak kabul edilmektedir (N'Da vd. 2010). İnvaziv meme kanserinin vücudun farklı organlarına yayılması metastatik meme kanseri türüne işaret etmektedir (Stevanovic vd. 2006). Meme kanseri vakalarının hemen hemen % 90-95'ini İDK ve İLK oluşturmalarına rağmen medüller karsinom, müsinöz karsinom, tübüler karsinom, fillod tümörü, memenin paget hastalığı ve inflamatuvar meme kanseri gibi nadir görülen meme kanseri türlerine de rastlanmaktadır (N'Da vd. 2010).

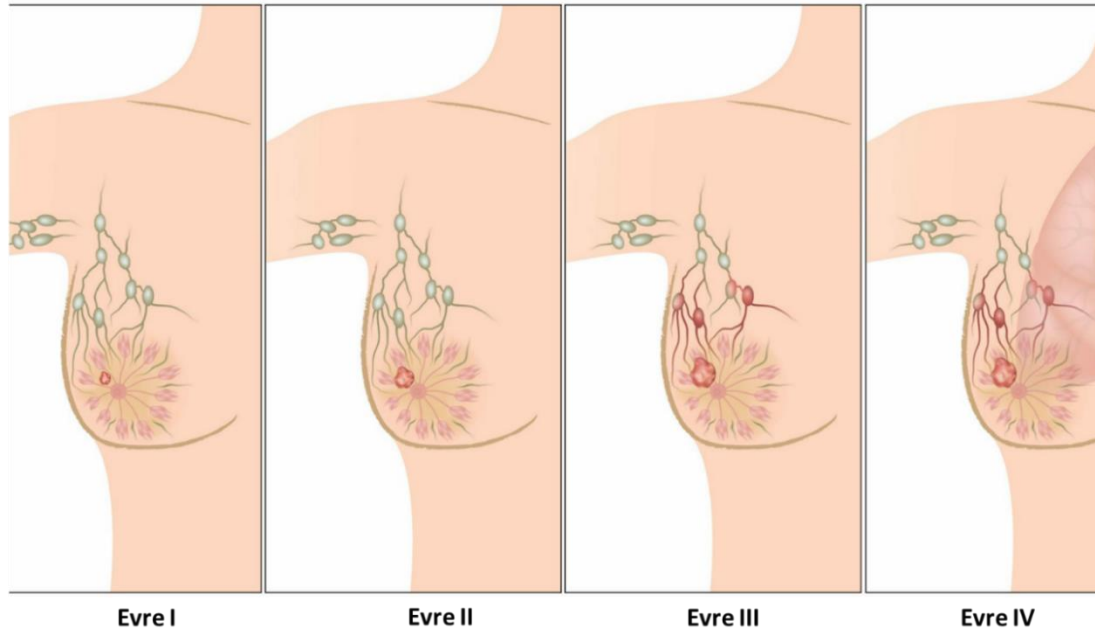
Meme kanseri, biyolojik ve fenotipik olarak heterojen bir hastalık olması nedeniyle tedaviye yanıt vermede farklılıklar sergilemektedir. Dolayısıyla yalnızca morfolojik sınıflandırma (nükleer derece, tübüler derece, mitotik indeks, histolojik derece ve mimari özellikler) ve klinik patolojik parametreleri (tümör boyutu, lenf nodu tutulumu, metastaz), meme tümörünün patofizyolojisini ortaya koymakta yetersiz kalmaktadır. Dolayısıyla, tümörleri sınıflara ayırmak amacıyla meme kanserinin moleküler niteliklerini analiz etmek oldukça önemli kabul edilmektedir. Küresel gen ifade profillemeye çalışmalarına göre 5 moleküler meme kanseri alt tipi (Şekil 2.10) bulunmaktadır (Perou vd. 2000). Bunlar HER2'yi aşırı ifade eden, Luminal A, Luminal B, Triple negatif, bazal benzeri meme kanserleri ve normal benzeri tümörlerdir. En yüksek ölüm oranına sahip olan triple negatif meme kanseri, yüksek bir histolojik dereceye ve proliferasyon oranına sahiptir (Foulkes ve Reis-filho 2010). Ayrıca, duktal histoloji ile karakterize edilmekte ve ER, progesteron reseptörü (PR) ve HER2 ifade eksikliği ile ilişkilendirilmektedir. Luminal A tipi tümörler, ER ve/veya PR'nin bulunması, HER2'nin bulunmaması ve hücre çoğalma işaretçisi olan Ki-67'nin düşük ifade seviyesi ile tanımlanmaktadır (Roy vd. 2023). Klinik olarak düşük dereceye sahip Luminal A tümörleri yavaş büyüme göstermekte ve daha az nüks etme potansiyeline sahiptir. Luminal B tümörleri ise, Luminal A'ya nispeten daha yüksek dereceli olmakta ve daha kötü prognoz sergilemektedirler. ER pozitif ve PR negatif olabilen Luminal B tümörleri yüksek Ki-67 ifadesine sahiptirler. HER2 ve bazal benzeri tümörler tipik olarak daha agresif davranışla ilişkilendirilmektedir. Bu kanser türlerinde HER2'nin aşırı ifadesi mevcuttur (Perou vd. 2000). Bir kısmı ER'yi de ifade etmekte ve luminal B olarak sınıflandırılmaktadır (Bernard vd. 2009). HER2 pozitif tümörlerin önemli bir kısmı ER pozitifdir ve luminal B alt grubuyla kümelenmektedir. Normal benzeri tümörler ise, luminal ve bazal benzeri kanserler arasında orta bir prognoz sunmakta ve yağ dokusunun gen özelliklerini ifade etmektedir.



Şekil 2.10 Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması (Wawruszak vd. 2021)

Meme kanseri tanısı konulduktan sonra uygun tedavinin ve prognoz belirlenebilmesi için kanserin evrelendirilmesi gerekmektedir. Meme kanserinin evreleri (Şekil 2.11) tümörün boyutuna, türüne ve tümör hücrelerinin meme dokularına ne kadar yayılım gösterdiğine bağlı olarak belirlenmektedir (Heim vd. 1997). Evre 0, invaziv olmayan tümörü tanımlarken, evre I-IV, invaziv tümörleri içermektedir. Evre 0, kanser hücresi olan ve kanser hücresi olmayan hücrelerin tamamının memede tümörün gelişim gösterdiği sınırlar içerisinde bulunduğunu ve çevre dokularda herhangi bir invazyonun gerçekleşmediğini gösteren aşama olarak kabul edilmektedir (Moos vd. 1998). *In situ* duktal karsinoma bu evre için örnek olarak gösterilmektedir. I. evre invaziv meme karsinomunda ise mikroskobik invazyon gözlemlenmektedir (Segal vd. 2001). Tümör çapının büyüklüğüne ve lenf düğümünün dahil olup olmamasına bağlı olarak IA ve IB olmak üzere iki alt kategoride ele alınmaktadır. Evre IA, 2 cm çap boyutuna kadar olan ve lenf düğümlerinin karsinogenez sürecine katılmadığı evredir. Evre IB ise, lenf düğümlerinde gözlemlenen 0,2 mm çapından büyük olan tümörlerin bulunduğu evre olarak tanımlanmaktadır. II. evre, tümörün koltuk altı lenf düğümlerinde veya sentinel

lenf düğümlerinde bulunduğu ancak memede bulunmadığı evre olarak kabul edilmektedir (Moran vd. 2014). IIA evresindeki tümörler 2 cm'den küçük 5 cm'den fazla olamazken IIB evresindekiler daha büyük olabilmektedir. III. evre meme kanseri ise IIIA, IIIB ve IIIC olmak üzere üç alt kategoride incelenmektedir (Jacquillat C. 1989). IIIA, memede tümör bulunmadığı ancak 4-9 aksiller lenf düğümünde veya sentinel lenf düğümlerinde bulunduğu evre olarak nitelendirilmektedir. IIIB evresinde, herhangi boyutta olabilen tümörler memenin 9 koltukaltı lenf düğümüne ya da sentinel lenf düğümlerine yayılabilmektedir. IIIB evre kanseri ciltte şişlik veya ülser nedeniyle olabilen inflamatuvar meme kanseri olarak kabul edilebilmektedir. IIIC evresi ise, 10 ve/veya 10'dan fazla koltuk altı lenf düğümlerine ve klavikula bölgesindeki lenf düğümlerine doğru yayılım gösteren tümörlerin sürece dahil olduğu evredir. IV. evre ise kanserin ileri ve metastatik evresidir. Bu evrede memede gelişim gösteren tümör akciğer, kemik, karaciğer, beyin gibi vücudun diğer organlarına yayılım göstermektedir (Neuman vd. 2010).



Şekil 2.11 Meme kanseri evreleri (American College of Surgeons)

2.2.6 Tedavi yöntemleri ve sınırlılıkları

Cerrahi rejeksiyon, radyasyon tedavisi, kemoterapi, endokrin (hormon) tedavisi ve hedefe yönelik tedavi meme kanserinin ana tedavi stratejileri arasında yer almaktadır (Dhankhar

vd. 2010). Genel olarak uygulanan standart meme cerrahisi yaklaşımları mastektomi yani memenin tamamen çıkarılması veya meme tümörünün çevredeki normal doku sınırıyla birlikte eksizyonunu gerektiren lumpektomidir (Schnitt vd. 2020). Ameliyat sırasında görülemeyen kanser hücreleri nedeniyle kanserin lokal tekrarlama riskini azaltmak amacıyla radyasyon tedavisi uygulanmaktadır. Radyasyon tedavisi, kanser hücrelerinin doğrudan yüksek düzeyde radyasyona maruz bırakması neticesinde tümörü küçültmeyi hedeflemektedir. Ancak radyasyon tedavisi meme dokusunda veya koltuk altında his azalması, bölgesel ağrı, kaşıntı, soyulma veya kızarıklık gibi cilt sorunlarını ortaya çıkarmaktadır (Dormand vd. 2005). Radyoterapinin en önemli yan etkilerinden birinin de kardiyotoksikite olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla kalp ve akciğerlerin radyasyona maruziyetinin en aza indirilmesi kritik öneme sahiptir (Cheng vd. 2017). Ayrıca, gelişmiş invaziv meme kanserlerinde radyasyon tedavisi direncinin gelişimi tedaviyi güçleştirmektedir (Delaney vd. 2005).

Meme kanserinde kemoterapi uygulamaları; alkilleyici ajanlar, antimetabolitler ve tübülün inhibitörleri dahil olmak üzere çeşitli sitotoksik ilaçların kullanımını içermektedir (Hernandez-Aya ve Hortobagyi 2010). Bu sitotoksik ilaçlar farklı mekanizmalar aracılığıyla kanser hücrelerinin apoptozuna neden olmaktadır. Kemoterapide sıklıkla kullanılan siklofosfamid, kanser hücrelerindeki DNA ipliklerinin kırılmasına neden olmaktadır (Penel vd. 2012). Doksorubisin, daunorubisin, epirubisin ve idarubisin gibi antrasiklinler ise DNA interkalasyonu aracılığıyla kanser hücrelerindeki makromolekülerin biyosentezini inhibe etmektedir (Gewirtz 1999). Docetaxel ve paclitaxel'i de içeren taksanlar ise mikrotübüllerin parçalanmasını önleyerek hücre döngüsünün durmasına ve kanser hücrelerinin apoptoza girmesine neden olmaktadır (Moos vd. 1998). Kemoterapi, adjuvan kemoterapi veya neoadjuvan kemoterapi olarak iki şekilde değerlendirilmektedir. Neoadjuvan kemoterapi, büyük kanserleri küçültmek ve lumpektomi ile kolayca alınabilmelerini sağlamak için ameliyat öncesi uygulanırken, adjuvan kemoterapi tespit edilemeyen meme kanseri hücrelerini tedavi etmek için ameliyat sonrası hastalara verilen sistemik bir tedavi türü olarak uygulanmaktadır. Lenf nodu metastazı olan veya tedavi sonrası kanser nüks ihtimaline sahip meme kanseri hastalarında adjuvan kemoterapi sıklıkla uygulanmaktadır (Albain vd. 2012). Kemoterapinin en büyük dezavantajlarından biri ise ortaya çıkan yan etkileridir. 0-6 aylık

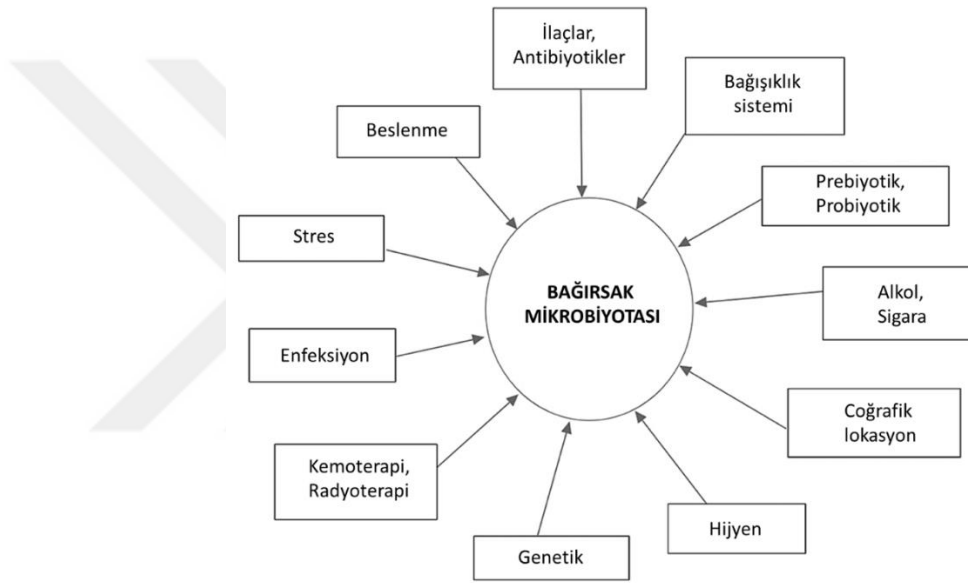
tedavi sonrasında gözlemlenen yan etkiler arasında yorgunluk, alopesi (saçkıran), sitopeni (normal kan hücrelerinin sayısında azalma), kas ağrısı, nörobilişsel işlev bozukluğu ve periferik nöropati, kardiyomiyopati, ikinci kanserler, erken menopoz ve kısırlık yer almaktadır (Wolff 2015). Ayrıca, kullanılan kemoterapi ajanlarının her biri meme kanseri hastalarında direnç neden olabilmektedir (Coley 2008).

Endokrin tedavisi, HR pozitif olan meme kanseri hastaları için önerilen bir diğer önemli yaklaşımdır. Kanser hücrelerinin büyümesini önlemek amacıyla meme kanserine neden olan östrojen ve progesteron düzeylerini bloke etmek veya azaltmayı hedefleyen hormon tedavisi gerektirmektedir (Dhankhar vd. 2010). Tedavi amacıyla menopoz öncesi ve sonrası kadınlar için tamoksifen kullanılırken postmenopozal kadınlar için letrozol, eksemestan ve letrozol gibi ilaçlar kullanılmaktadır (Burstein vd. 2014). Ancak, bu ilaçların kullanımı ile birçok yan etki meydana gelmektedir. Sıcak basması, artralji, miyalji ve vajinal kuruluk bu yan etkilerden bazıları arasında yer almaktadır. Bununla birlikte, tamoksifen kullanımı venöz tromboemboli ve rahim kanseri riskini de artırmaktadır. Letrozol, eksemestan ve letrozol gibi ilaçların kullanımı ise osteoporoz ve osteopeniyi hızlandırabilmekte ve kas-iskelet sistemi ile ilişkili semptomların meydana gelmesine neden olabilmektedir.

2.3 Mikrobiyota ve Kanser İlişkisi

Mikrobiyota; belirli bir habitatta bulunan komensal ve fırsatçı patojenik mikroorganizmaları (bakteri, arkeler, mantarlar, virüsler ve protozoalar) tanımlanırken, mikrobiyom mikrobiyota genomlarının tamamını ifade etmektedir (Sirishinha 2016 ve Fernández vd. 2018). Büyük bir kısmı bağırsakta bulunan mikrobiyota, vücut için birçok yararlı fonksiyona sahiptir (Dekaboruah vd. 2020). Sindirilmemiş karbonhidratları parçalama, kısa zincirli yağ asitlerini ayrıştırma, vitamin sentezi, magnezyum, kalsiyum, demir gibi minerallerin emilimini kolaylaştırma, bağırsak homeostazını düzenleme, epitel proliferasyonu ve farklılaşmayı kontrol etme temel fonksiyonları arasında yer almaktadır. Bununla beraber, mikrobiyotadaki yararlı üyeler çeşitli antimikrobiyal bileşikler üreterek patojenlerin yol açtığı hastalıkların önüne geçilmesine de yardımcı olmaktadır.

Denge halinde bulunan mevcut mikrobiyota topluluğu bileşiminin bozulması disbiyoz olarak ifade edilmektedir (Clemente vd. 2012). Bağırsak mikrobiyota kolonizasyonu birçok farklı faktör (Şekil 2.12) tarafından etkilenerek disbiyozla uğramaktadır (N. Wang vd. 2021). Disbiyoz durumu ise kansinomların gelişimine katkı sağlayan önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir (Sheflin vd. 2014). Örneğin, uzun süreli antibiyotik kullanımının bazı bakteri topluluklarının biyolojik çeşitliliğini ve bolluk miktarını azalttığı (Huse vd. 2008 ve Jakobsson vd. 2010) ve kanser riskiyle ilişkili olarak bağırsak mikrobiyomunun dengesini bozduğu rapor edilmektedir (Kilkinen vd. 2008).



Şekil 2.12 Mikrobiyota bileşimini etkileyen faktörler (Ruo vd. 2021)

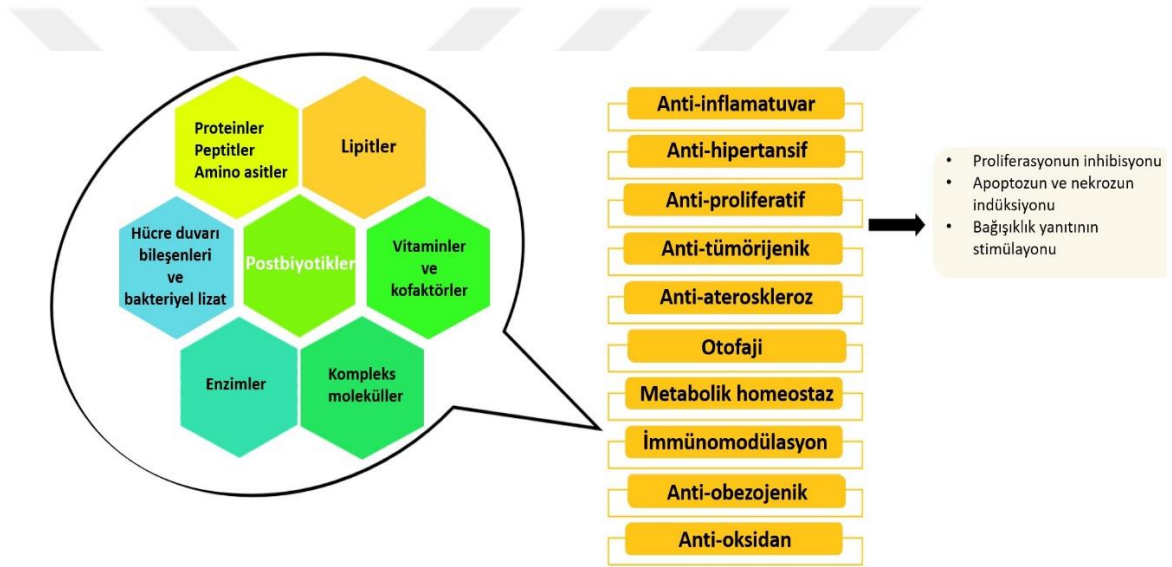
Disbiyoz durumunda, bağırsak koruyucu bakterilerin kaybı/azalması gerçekleşmektedir. Bunun neticesinde ise, hücre çoğalmasının indüklenmesi, anjiyogenez ve/veya apoptoz kaybı gibi kanserle ilişkili işlevleri destekleyen patojenik bakterilerin mikrobiyotada arttığı gözlemlenmektedir (Dulal ve Keku 2014). Bu patojenlerden en yaygın olanlarının; *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium septicum* ve *Salmonella enterica* olduğu belirtilmektedir (Francescone vd. 2014, Bhatt vd. 2017). Disbiyoz neticesinde mikrobiyotada popülasyonları artan bu bakteriler ürettikleri genotoksinler ve metabolitler aracılığıyla çeşitli hücresel yollara dahil olarak kanser oluşumunu indüklemektedir (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2 Kansere neden olan bakteri genotoksinleri ve metabolitleri

Toksin/Metabolit	Mekanizması	Bakteri türleri	Kaynaklar
FadA	β -katenin'i aktive ederek inflamatuvar süreci destekleme	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Garrett 2015
CagA	β -katenin'i aktive ederek hücre çoğalmasını indüklemeye	<i>Helicobacter pylori</i>	Garrett 2015
Trimetilamin-N-oksit	TMAO üretimi için l-karnitin kullanımı	<i>Clostridium sp.</i>	Faith vd. 2013
Cdt	Genomik instabilite	<i>Epsilonproteobacteria sp.</i>	Gagnière vd. 2016
Btf	ROS seviyesinin artışına bağlı DNA'da hasar oluşumu	<i>Bacteroides fragilis</i>	Boleij vd. 2015
Bütirat	Hücrel proliferasyonun teşviki ve apoptotik hücre ölüm indüksiyonu	<i>Bifidobacterium sp.</i>	Belcheva vd. 2014
Deoksikolik asit	β -katenin aracılı sinyal kaskadlarının aktivasyonu	<i>Clostridium sp.</i>	Ha ve Park 2010
Fragilizin	B-katenin aracılı sinyal kaskadlarının aktivasyonu	<i>Bacteroides fragilis</i>	Sears 2009
Litokolik asit	Tümör metastazının indüksiyonu	<i>Bacteroides fragilis</i>	Baek vd. 2010

Mikrobiyotada meydana gelen disbiyoz durumunun tümörigeneze neden olmasının yanı sıra dengeli bir mikrobiyotanın da tümör baskılayıcı özellik sergilediği rapor edilmektedir. Mikrobiyotanın kanser de tedavisini değiştirme veya müdahale etme potansiyeli ise günümüzde oldukça önemli bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Kanser ve kontrol mikrobiyotasının karşılaştırıldığı çalışmalardan elde edilen önemli sonuçlar, anti-kanserojenik etkinin mikrobiyota kaynaklı bakteriler tarafından salgılanan ve postbiyotik mediatörler (PM) olarak tanımlanan metabolitlerden kaynaklanabileceğine işaret etmektedir. Probiyotikler, prebiyotikleri besin kaynağı olarak kullanarak konak üzerinde sağlığa faydalı etkiler sergileyen canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Batista vd. 2020). Postbiyotik ise Yunanca'da sonra anlamına gelen "post" ve yaşam anlamına gelen "bios" kelimelerinden türetilmiş bir terim olup "biyotik" terimler ailesinin (probiyotikler, prebiyotikler, sinbiyotikler) en yeni üyesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Postbiyotik terimi, genel olarak mikroorganizmalar tarafından fermentasyon sürecinde üretilen veya salgılanan maddelere atıfta bulunan şemsiye bir terimdir (Vinderola vd.

2022). Farklı yolları düzenlemelerinden dolayı mediatör olarak nitelendirilmektedirler. Metabiyotikler, biyojenikler veya basitçe metabolitler olarak konakçıya fizyolojik faydalar sağlayan PM'ler arasında bakteriyosinler, enzimler, vitaminler, amino asitler, nörotransmitterler, kısa zincirli yağ asitleri, nitrik oksit, organik asitler, ekzopolisakkaritler, hücre lizatları, teikoik ve lipoteikoik asitler ve peptidoglikan türevli muropeptidler gibi maddeler yer almaktadır (Rad vd. 2020, Homayouni Rad vd. 2021). Son yıllarda gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, PM'lerin önemli anti-kanser etkilerini hücre döngüsünü düzenleme, farklılaşmayı uyarma ve farklı kanser hücrelerinde pro-apoptotik yolları yukarı düzenleme gibi fonksiyonel rolleri ile gerçekleştirdiğini rapor etmektedir (Şekil 2.13) (Sharma ve Shukla 2016).



Şekil 2.13 Postbiyotik mediatörlerin potansiyel anti-kanser etkileri (Kvakova vd. 2022)

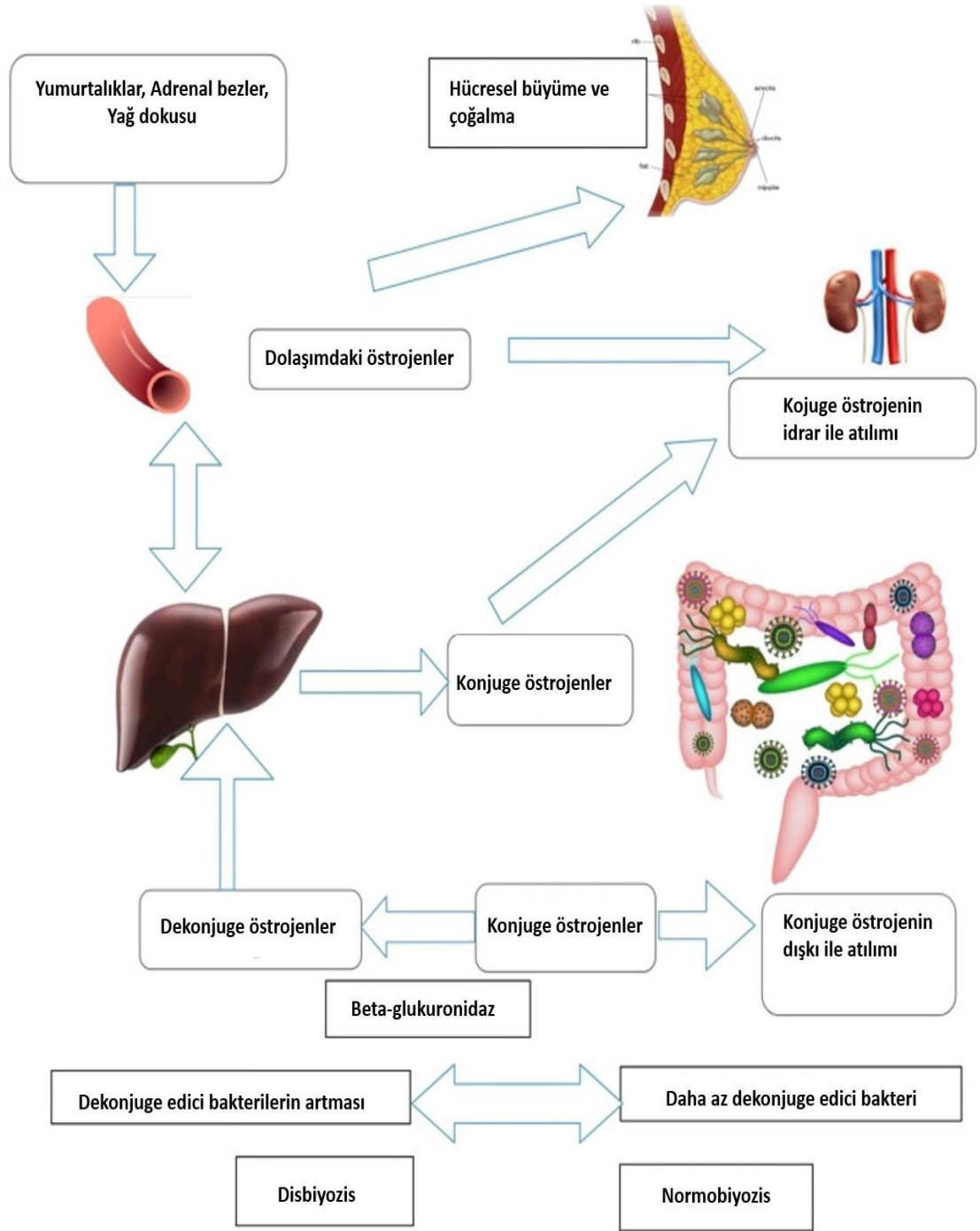
PM'lerin komşu hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerini apoptoza sürüklemesi kanser tedavisinde yeni bir alternatif yaklaşım sunmaktadır. PM'ler hem mitokondriye bağımlı hem de ölüm reseptörlerine bağımlı apoptozu düzenlemektedir (Şekil 2.14). PM'lerin anti-kanser etkinliğini gösteren bir çalışmada, anne sütünden izole edilen *Lactobacillus rhamnosus* kaynaklı PM'lerin, insan rahim ağzı kanseri hücreleri olan HeLa üzerinde Bad, Bax, kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9'un yukarı regülasyonu ve Bcl-2 genlerinin aşağı regülasyonu ile apoptozu indüklediği bildirilmektedir (Riaz Rajoka vd. 2019). Wang ve arkadaşlarının (2015) gerçekleştirmiş olduğu bir çalışmada ise *L. plantarum* YW32 tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin kolon kanseri HT-29 hücre

kolon kansinomu) LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümünü arttırdığı, p62/SQSTM1 ifadesini azalttığı ve asidik veziküler organel oluşumu sonucunda otofajiyi indüklediği rapor edilmektedir (Tang vd. 2011). Ayrıca, *L. acidophilus*'a ait ekzopolisakkaritlerin HT-29 kolon kanseri hücrelerinde doğrudan Beclin-1 ve GRP78'in gen ifadesini uyarma yoluyla otofajiyi desteklediği de belirtilmektedir (Kim vd. 2010). Elde edilen ön veriler, PM'lerin kanser üzerinde potansiyel bir etkiye sahip olabileceğine ve tedaviye yönelik doğal yaklaşımlar olarak kullanılabileceğine işaret etmektedir.

2.4 Mikrobiyota ve Meme Kanseri İlişkisi

Mikrobiyal yük ve çeşitlilik açısından zengin olan bağırsak mikrobiyotası (Mowat ve Agace 2014) metabolitlerin, hormonal ara ürünlerin ve immünolojik sitokinlerin üretimi yoluyla vücudun hem lokal hem de distal bölgelerinde önemli rollere sahiptir (Fomby ve Cherlin, 2011). En önemli fonksiyonel rollerinden biri dolaşımdaki östrojenlerin ana düzenleyici olarak faaliyet göstermesidir (Baker vd. 2017). Bu nedenle bağırsak mikrobiyotasında meydana gelen olası bir disbiyoz, östrojen metabolizmasının bozulmasına neden olabileceği için östrojen metabolizmasına ilişkin homeostazı da bozabilmekte ve meme kanseri riskini arttırmaktadır. Karaciğerde konjuge hale gelen östrojen önce safraya oradan da vücuttan uzaklaştırılmak üzere bağırsağa taşınmaktadır. Bağırsakta bulunan bazı bakteriler ise bu östrojenleri dekonjuge ederek serbest hale getirmekte ve reseptörlere bağlanmalarını sağlayan beta-glukuronidazı salgılamaktadır (Alizadehmohajer vd. 2020). Serbest hale gelen östrojenler enterohepatik dolaşım yoluyla yeniden emilmekte ve meme gibi uzak dokulara ulaşmaktadır (Şekil 2.14) (Fernández vd. 2018). Dolayısıyla disbiyoz neticesinde östrojeni dekonjuge eden bakterilerin mikrobiyotada artış göstermesi östrojen miktarının artışına neden olabileceğinden meme kanseri gelişimine sebebiyet verebilmektedir. Bununla birlikte, bağırsakta bulunan bazı mikroorganizmalar, sindirilemeyen diyet polifenollerini aktif östrojen benzeri metabolitlere parçalayabilmekte ve estromedin gibi östrojenle indüklenebilir büyüme faktörlerinin sentezlemesi neticesinde meme kanseri gelişimine katkıda bulunmaktadır (Fernández vd. 2018, Parida ve Sharma 2019). Ayrıca, mitokondrideki östrojen reseptörlerinin aktivasyonu ile mitokondriyal oksidasyonu indüklemekte ve bu sayede kanser gelişimini teşvik eden mitokondriyal serbest radikal üretiminin artışına neden

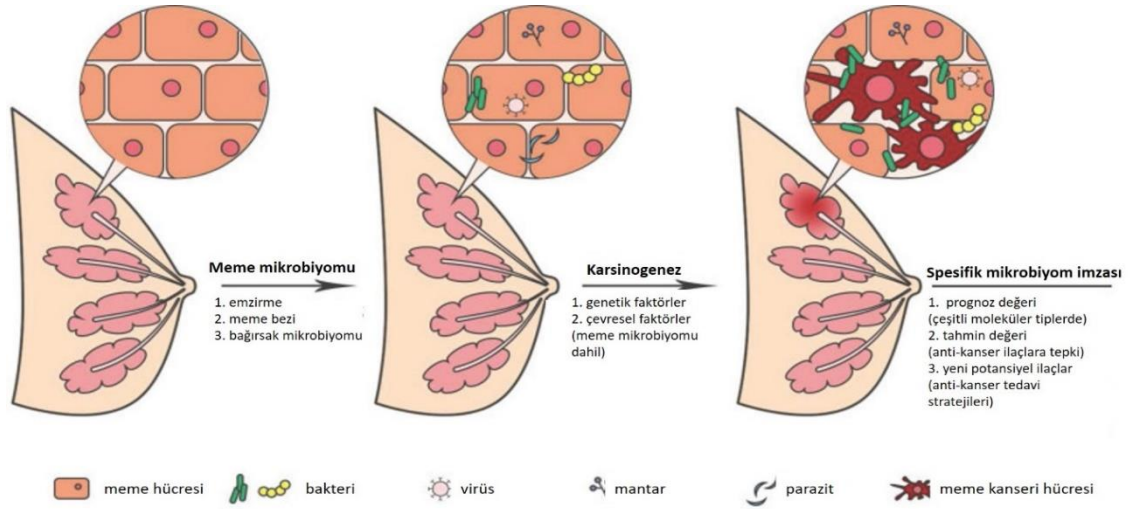
olmaktadır (Mikó vd. 2019).



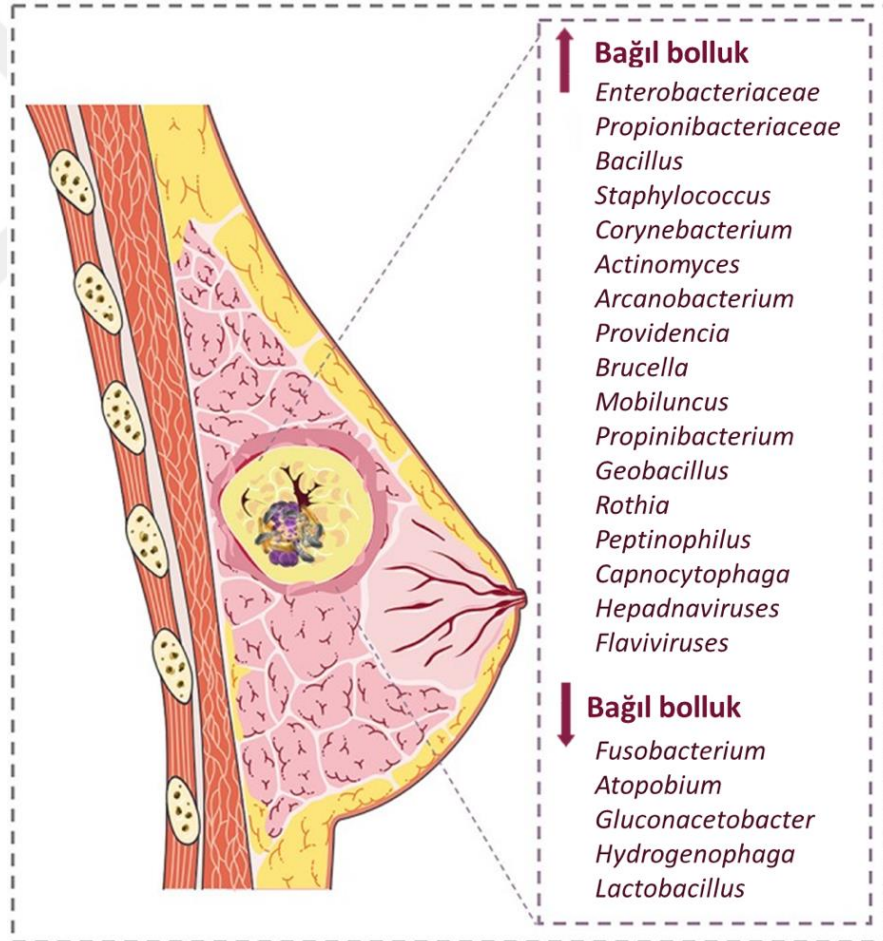
Şekil 2.15 Bağırsak mikrobiyotasının metabolizmaya etkisi ve östrojenin enterohepatik döngüsü (Ruo vd. 2021)

Tüm bu etkilerinin yanı sıra, mikrobiyotada gerçekleşen disbiyozun konakçının bağışıklık sistemini negatif yönde etkilediği bilinmektedir. Disbiyoz neticesinde meydana gelen mikrobiyal topluluktaki değişiklik meme kanserli hastalarda hayatta kalmayı zorlaştırmaya yönelik lenfosit sayısında azalmaya ve nötrofil sayısında artışa neden olmaktadır (Chace 2015). Bağırsak mikrobiyotasının meme kanser gelişiminde temel bir role sahip olması önleyici ve tedavi edici yaklaşımların alternatif bir parçası olarak terapötik amaçla hedeflenmesi gerektiğine işaret etmektedir.

Güncel literatür çalışmaları, bağırsak mikrobiyotasının dolaylı etkilerinin yanı sıra meme mikrobiyotasının da kanser üzerinde doğrudan etkilere sahip olduğunu vurgulamaktadır. Öncesinde steril olduğu düşünülen meme dokusunun artık bağırsak gibi diğer dokulardan farklı ve kendine özgü bir mikrobiyotaya sahip olduğu bilinmektedir (Urbaniak vd. 2014). Geniş damar yapısı ve lenfatik drenaja sahip yağ dokusu nedeniyle meme, bakterilerin büyümesi için uygun bir ortam oluşturmaktadır (O'Connor vd. 2018). Meme mikrobiyotası emzirme sırasında deriden meme ucu-areolar yolu aracılığıyla, meme ucu-ağız temasıyla veya bağırsaktan bakteriyel translokasyonu gibi farklı yollarla şekillenmektedir (Hieken vd. 2016). Genetik ve çevresel faktörlere ilaveten meme mikro-çevredeki spesifik bir mikrobiyobiyota bileşiminin de memede karsinogenezi desteklediği düşünülmektedir (Şekil 2.16). Meme mikro-çevredeki spesifik mikrobiyobiyota bileşiminin karsinogenezi destekleyen mikrobiyal imzaları ise biyobelirteç olarak kullanılmak üzere umut vaat etmektedir (Şekil 2.17). Örneğin, DNA kırılmasına neden olan *Enterobacteriaceae*, *Bacillus* ve *Staphylococcus* spp.'nin göreceli bolluğunun meme kanserli hastalarda daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Urbaniak vd. 2016). Xuan ve arkadaşları (2024) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada *Sphingomonas*'ın normal meme dokusunda *Methylobacterium*'un ise meme kanseri dokusunda bol miktarda bulunduğunu bildirmektedir. Elde edilen sonuçlar, ER pozitif meme kanseri dokusunun yaklaşık üçte ikisinin *Methylobacterium* tarafından kolonize edildiğine işaret etmektedir (Xuan vd. 2014).



Şekil 2.16 Meme mikrobiyotası ve karsinogenez (N. Wang vd. 2021)



Şekil 2.17 Meme kanserinde mikrobiyota değişimi (Eslami-S vd. 2020)

Meme tümörü örnekleri incelendiğinde tümörlü dokunun tümöre komşu normal meme dokusuna veya normal meme örneklerine göre daha düşük bakteri çeşitliliğine sahip olduğu rapor edilmektedir (Nejman vd. 2020). Bununla beraber, mikrobiyal genomik biyoinformatik veri analizleri mikrobiyota topluluğu bileşiminin farklı meme kanseri hastalarında da farklılık gösterdiğini bildirmektedir (Parida ve Sharma 2019). Benzer şekilde benign ve malign meme dokusunda ve meme kanseri alt tiplerinde de farklılıklar gözlemlenmektedir. Bu bağlamda, spesifik mikrobiyota bileşimi ve çeşitliliği, meme kanserli hastalar için faydalı tanısal ve prognostik bilgiler sunma potansiyeline sahip olup yeni tedavi stratejilerinin tasarımı için ışık tutmaktadır.

İnsan mikrobiyotası ile meme kanseri arasındaki ilişki kanserin prognozu ve tedavisi için yeni alternatif yaklaşımlar sunmaktadır. Bu nedenle günümüzde mikrobiyotayı hedef alan terapötik birçok çalışma yapılmaktadır. Bağırsakta bulunan bazı mikroorganizmaların meme tümörü oluşumunu önleyebilme potansiyeli ürettikleri çeşitli metabolitlerin sahip olduğu anti-kanser aktiviteleri ile ilişkilendirilmektedir. Örneğin, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Escherichia* ve *Proteus* cinsi üyeleri tarafından üretilen bir metabolit olan kadaverinin kanser hücrelerinin migrasyonunu, invazyonunu ve epitelyalden mezenkimal geçişini bloke ederek meme kanseri oluşumunu engellediği belirtilmektedir (Sampsel vd. 2020). Buna ilişkin gerçekleştirilen bir çalışmada, üçlü negatif meme kanseri modeli olan 4T1 meme tümör hücrelerini barındıran BALB/c farelerinde, kadaverin tedavisinin ardından tümör kütlelerinde ve metastazda bir azalma rapor edilmektedir (Kovács vd. 2019). Bununla birlikte; asetat, bütirat ve propiyonat gibi kısa zincirli yağ asitlerinin meme karsinomu hücre özelliklerini modüle etme potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir (Salimi vd. 2017, Thirunavukkarasan vd. 2017). Örneğin, sodyum propiyonat, JAK2/STAT3 yolunu aktif olarak bloke ederek hücre döngüsünün durdurulmasını tetiklemekte, aynı zamanda ROS üretimini ve p38 MAPK'nin fosforilasyonunu teşvik etmektedir. Bu sayede apoptoz indüklenmekte ve meme kanseri hücrelerinde tümör büyümesini önlemektedir (Park vd. 2021). *L. lactis* tarafından üretilen ve bağırsakta baskın olarak bulunan bir bakteriyosin olan nisinin, MCF-7 hücreleri üzerinde doksorubisin ile birlikte uygulandığı farklı bir çalışmada ise umut verici sinerjistik anti-tümör etkisinin olduğuna işaret etmektedir (Avand vd. 2018). Literatürde

farklı PM'lerin meme kanseri üzerindeki anti-tümör etkinliklerinin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda araştırıldığı bazı çalışmaların özeti ise çizelge 2.3'de sunulmaktadır.

Çizelge 2.3 Postbiyotik mediatörlerin meme kanseri üzerindeki etkisi

<i>In vitro</i>				
Postbiyotik Üreticisi	Postbiyotikler	Hücre Hattı	Etki	Kaynak
<i>Brevibacillus</i>	Bakteriyosin	MCF-7	Apoptoz	Baindara vd. 2017
<i>Escherichia coli</i>	Hücre içermeyen süpernatant	MCF-7	Apoptoz	Bigdeli vd. 2020
<i>Escherichia coli</i> KUB-36	Kısa zincirli yağ asidi	MCF-7	Anti-inflamatuvar	Nakkarach vd. 2021
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Isı ile öldürülmüş hücre, hücresiz ekstrakt	MCF-7	Apoptoz	El-Deeb vd. 2018
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KP94283, <i>Lactobacillus plantarum</i> KP894100	Hücre içermeyen ekstrakt	MCF-7	Hücre sitotoksitesitesi	Grange vd. 2008
<i>Lactobacillus acidipiscis</i> ITA44, <i>Lactobacillus pentosus</i> ITA23	Isı ile öldürülen hücre	MDA-MB-231	Hücre sitotoksitesitesi	Shokryazdan vd. 2017
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Isı ile öldürülen hücre	MCF-7, ZR-75-1	Apoptoz	Ghoneum ve Gollapudi 2004
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Isı ile öldürülen hücre, Hücre içermeyen süpernatant	MDA-MB-231	Apoptoz	Ghoneum vd. 2008
<i>In vivo</i>				
Postbiyotik Üreticisi	Elde Edilen postbiyotikler	Hayvan Modeli	Etkisi	Kaynak
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Hücresiz fraksiyonlar	BALB/c fareler	Apoptoz	de Moreno de LeBlanc vd. 2006
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Hücre debris ve süpernatant	Wistar sıçanlar	Tümör boyutunda küçülme ve apoptoz	Fatemi vd. 2019
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Sonifikasyon ile öldürülmüş hücreler	BALB/c fareler	Anti-proliferatif	Nazari vd. 2022

2.5 *Spalax* ve Kanser

Spalax; Anadolu, Balkanlar, Doğu Akdeniz ve Kuzey Afrika’da yaşayan, *Spalaciadae* familyasına ait ve *Spalax ehrenbergi*, *Spalax leucodon* ve *Spalax nehringi* gibi süper türlere sahip kapalı yeraltı tünellerinde yaşayan yabani bir kemirgen olarak tanımlanmaktadır (Nevo vd. 2001, Macdonald ve Norris 2001). Kapalı yeraltı tünel sistemleri *Spalax* sp. için zorlu iklim koşullarından, patojenlerden ve yırtıcılardan korunaklı, yetersiz havalandırılmış ve karanlık bir yaşam alanı sunmaktadır. Aşırı hipoksik koşullar altında yaşayan *Spalax* sp. yiyecek toplamak, çiftleşmek, bölgelerini onarmak ve genişletmek için hayatlarını yoğun bir şekilde kazı yaparak sürdürmektedir. Bu nedenle *Spalax* sp. türleri aşırı hipoksi ve hiperkapni koşullarında hayatta kalabilmek adına benzersiz adaptif mekanizmalar geliştirmiştir (Nevo vd. 2001). Sahip olduğu hipoksi toleransı, solunumla ilgili genlerin morfolojik ve fizyolojik mekanizmalarına ve bu mekanizmaların düzenlenmesine dayanmaktadır. Buna bağlı olarak *Spalax* sp. oksijen taşınımı için diğer kemirgenlere kıyasla daha kısa difüzyon mesafesine ve yüksek düzeyde aktiviteye neden olan kan damar yoğunluğuna sahiptir (Shams vd. 2004, Avivi vd. 2005, Malik vd. 2016). Hipoksi/reoksijenasyon döngüleri sonucunda oksidatif strese ve DNA’da hasara yol açan ROS türlerinde artış gerçekleşmektedir (Guzy ve Schumacker 2006). Buna rağmen *Spalax* üzerinde yapılan tüm araştırmalar, spontan tümör oluşumu meydana gelmediğini göstermektedir. Sahip olduğu DNA onarım ve düzenleme mekanizmasının yüksek onarım kapasitesinin ve yüksek ifadesinin kanserin önlenmesinde önemli bir faktör olduğu kabul edilmektedir (Fang vd. 2014, Malik vd. 2016, Schmidt vd. 2017). Kanser önlenmesini sağlayan başka bir mekanizmanın ise, hücre dışı matriks bozulmasını, tümör büyümesini ve metastazını engelleyen heparanazın alternatif bir varyantının varlığından kaynaklanabileceği de belirtilmektedir (Nasser vd. 2009). Ayrıca, *Spalax* fibroblastlarının kanser hücrelerinin büyümesini inhibe edebildiği ve apoptoza yönlendirdiği, hücre döngüsünün ilerlemesini ise durdurduğu bilinmektedir. Transkriptomik değerlendirmeler ve gen ifade verileri kanser direnci, apoptoz, anjiyogenez yolları ve hipoksi toleransı ile örtüşen genlerin *Spalax*’daki zenginliğini ortaya koymaktadır (Malik vd. 2011, Malik vd. 2012). Doğal olarak kansere dirençli olan bu kemirgenin kanser çalışmalarında model olarak kullanılması, artan kanser vakalarıyla baş etmek ve etkili tedavi yaklaşımlarının gelişimi için umut vaat etmektedir.

Spalax sp. mikrobiyotasına ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ülkemizde gerçekleştirilen bir çalışmada, 16S rRNA metabar kodlamasını kullanılarak *Spalax* bağırsak mikrobiyotası karakterize edilmekte ve daha önce incelenen diğer birkaç *Spalax* popülasyonunun ve diğer kemirgen türlerinin mikrobiyom özellikleriyle karşılaştırılmaktadır (Solak vd. 2023). Elde edilen 16S rRNA barkod verileri, *Spalax* bağırsak mikrobiyotasının yaklaşık % 90'ının *Firmicutes* ve *Bacteroidota* filumlarından oluştuğunu göstermektedir. İlaveten, *Spalax* sp. bağırsak mikrobiyotasının yüksek miktarda performans ve uzun ömürlülüğe bağlı bakteri ailelerine sahip olduğu da rapor edilmektedir.

Güncel literatür verileri *Spalax* sp. mikrobiyota bileşiminin ve içeriğinin özellikle memeli sağlığı ve uzun yaşam konusunda önemli bir kaynak olabileceğine işaret etmektedir. Ancak, kanser araştırmaları için mükemmel bir model olarak kabul edilen *Spalax* sp.'ye ait mikrobiyota-kanser ilişkisine odaklanan ve *Spalax* sp. mikrobiyota üyeleri ile mikrobiyota tarafından üretilen metabolitleri prognostik, tanısal biyo-belirteç ve/veya terapötik ajan olarak tasarlamaya yönelik veriler içeren herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı, daha önce ekibimiz tarafından *Spalax* sp. bağırsak mikrobiyotasından izole edilerek *Ligilactobacillus animalis* olarak tanımlanan bakteriye ait PM'lerin meme kanseri üzerindeki anti-kanser etkilerini belirlemektir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

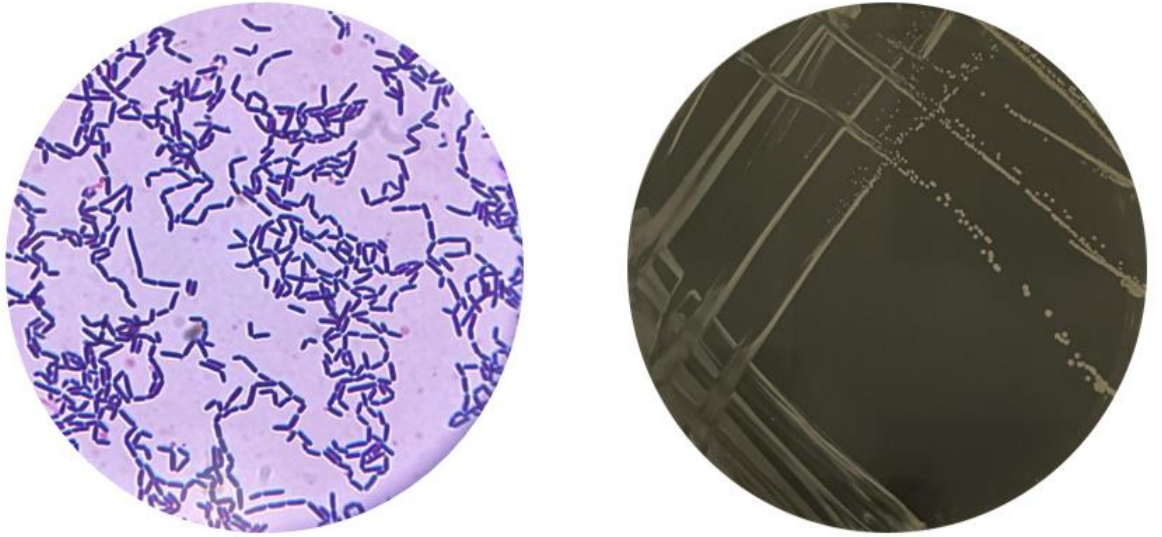
Tez çalışması kapsamında kullanılan malzeme, kit ve cihaz bilgileri çizelge 3.1’de sunulmaktadır.

Çizelge 3.1 Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal malzeme, kit ve cihaz bilgileri

Kimyasal Malzemeler ve Kitler	Marka
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, ABD
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Serva, ABD
Fetal Sığır Serum (FBS)	Biological Industries, İsrail
Penisilin-Streptomisin	Sartorius, Almanya
L-glutamin	Sartorius, Almanya
10X Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	Sartorius, Almanya
Tripsin-EDTA	Sartorius, Almanya
Tripan mavisi	Sartorius, Almanya
3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür (MTT)	Sigma, ABD
RNase	Sigma, ABD
PureZOL	BioRad, ABD
Propidyum İyodür (PI)	BioLegend, ABD
Anneksin V-FITC Apoptoz Tespit Kiti	BioLegend, ABD
Hücrel ROS Test Kiti / Reaktif Oksijen Türleri Test Kiti	Abcam, Birleşik Krallık
iScript cDNA Kiti	BioRad, ABD
RT-PCR SYBR Green Kiti	BioRad, ABD
Cihazlar	Marka
Liyofilizatör	Buchi, İsviçre
CO ₂ ’li İnkübatör	Nüve, Türkiye
Santrifüj	Nüve, Türkiye
Sıcak su banyosu	Nüve, Türkiye
Hücre sayım cihazı	BioRad, ABD
Inverted mikroskop	Olympus, Japonya
Mikroplaka okuyucu	BioTech, ABD
C1000 Touch Thermal Cyclers	BioRAD, ABD
Hücre Akış Sitometrisi	NovoCyte, ABD

3.1.1 Bakteri kültürünün hazırlanması

Tez çalışması kapsamında PM üreticisi olarak, kansere dirençli kör köstebek faresi *Spalax* sp. bağırsak mikrobiyotasından izole edilen *Ligilactobacillus animalis* EIR/SpX-1 suşu kullanılmıştır. -80 °C’de gliserol stoklarında saklanan bakteri suşu MRS-B besiyerine inoküle edilmiş ve 37 °C’de kültüre edilmiştir. Bakterilerin gelişimi için ihtiyaç duyduğu anaerobik koşullar anaerobik kit (Sigma, Almanya) içeren jar kullanımı ile sağlanmıştır. Kültüre edilen bakterinin saflığı çizgi ekim, morfolojisi ise Gram boyama neticesinde kontrol edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 *Ligilactobacillus animalis* bakterisine ait Gram boyama ve çizgi ekim görüntüleri

3.1.2 Sterilizasyon

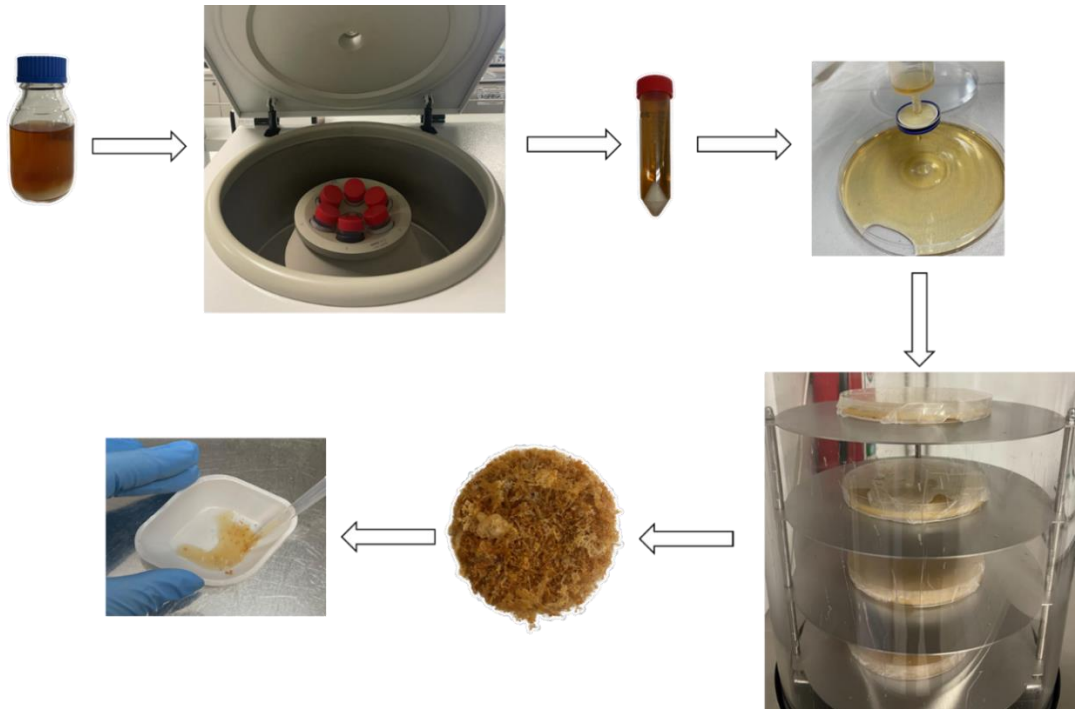
Çalışmalarda kullanılan tüm malzemeler 121 °C sıcaklıkta 15 dakika süreyle otoklav kullanılarak sterilize edilmiştir. Bakteri kültürü için kullanılan MRS-B besiyeri ise 118 °C sıcaklıkta 15 dakika süren bir protokol ile steril hale getirilmiştir. Otoklavlanmaya uygun olmayan sıvı malzemelerin sterilizasyonu ise 0.22 µm çapına sahip nitroselüloz membran filtreler (Sartorius, Almanya) kullanılarak sağlanmıştır.

Mikrobiyolojik çalışmalarda meydana gelebilecek herhangi bir kontaminasyonun önüne geçebilmek amacıyla deneysel çalışmalarının tamamı Class II güvenlik kabinde gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü temelli çalışmalar ise steril koşulların sağlandığı Class II A-2 laminar akışlı kabin içerisinde tamamlanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Postbiyotik mediatörlerin (PM) hazırlanması

MRS-B besiyerinde 37 °C’de 24 saat boyunca anaerobik koşullar altında geliştirilen *Ligilactobacillus animalis* EIR/SpX-1 kültürü inkübasyonu takiben 8.500 rpm’de 20 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz (süpernatant) toplanmıştır. Üst faz steril membran filtreden (0.22 µm) geçirilerek hücrelerinden tamamen uzaklaştırılmıştır. Ardından, sırasıyla -20 °C ve -80 °C’de dondurulmuş ve liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Toz formda elde edilen PM’ler steril distile su ile çözünmüş, membran filtre (0.22 µm) kullanılarak sterilize edilmiş ve sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -80 °C’de saklanmıştır (Şekil 3.2).

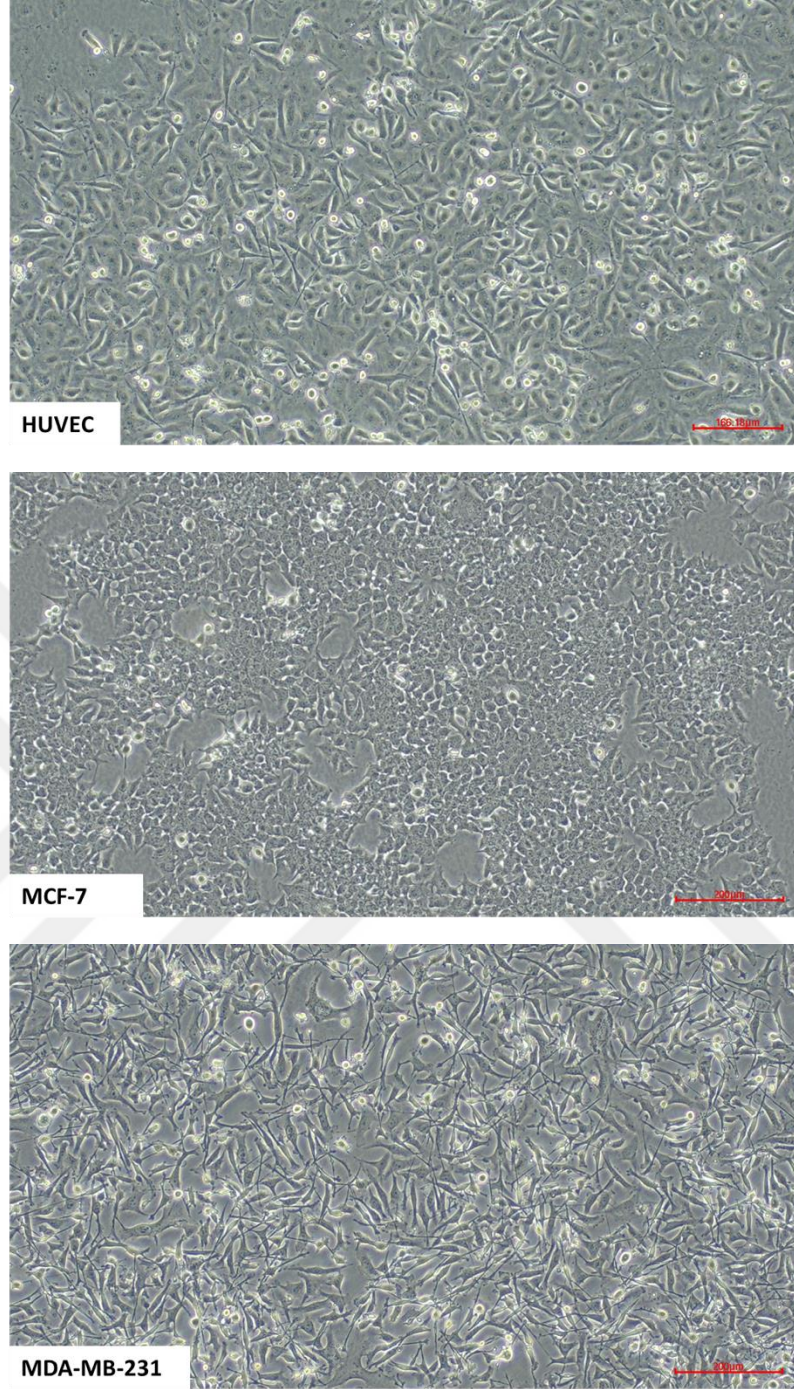


Şekil 3.2 PM'lerin hazırlanma aşamaları

3.2.2 PM'lerin anti-kanser etkilerinin belirlenmesi

3.2.2.1 Hücre kültürü

PM'lerin anti-kanser etkilerinin belirlenmesi amacıyla sağlıklı kontrol hücre grubu olarak HUVEC hücre hattı (İnsan göbek damarı endotel hücreleri), meme kanseri hücre grubu olarak da insan adenokarsinomu MCF-7 ve duktal karsinomu MDA-MB-231 hücre hatları kullanılmıştır (Şekil 3.3). MCF-7 hücreleri ER ve PR pozitif (Shirazi vd. 2011) olmasıyla birlikte luminal A kanser tipi olarak sınıflandırılmaktadır (Done 2011). Metastatik potansiyeli zayıf olan MCF-7 (Shirazi vd. 2011) düşük agresifliğe sahip invazif olmayan bir hücre hattı olarak kabul edilmektedir (Gest vd. 2013). MDA-MB-231 hücreleri ise, zayıf farklılaşmaya ve mezenkimal fenotipe sahip, invazif üçlü negatif bir hücre hattı olarak literatürde yer almaktadır (Thompson vd. 1992).



Şekil 3.3 Çalışma kapsamında kullanılan hücrelerin mikroskop görüntüleri

Hücreler % 1 penisilin/streptavidin ve % 10 fetal sığır serumu içeren DMEM besiyeri içerisinde 37 °C sıcaklıkta ve % 5 CO₂ ile % 95 bağıl nem içeren kültür ortamında geliştirilmiştir. Kültür kabında yeterli yoğunluğa ulaşan hücrelerin kaldırılması için tripsin-EDTA kullanılmış ve belli yoğunluklarda pasajlanmak üzere T-25 kültür kabından T-75 kültür kabına aktarılmıştır. Canlı hücre sayısının belirlenmesi amacıyla Tripan

mavisi kullanılarak otomatik hücre sayım cihazında ölçüm yapılmıştır. Tez çalışması kapsamında mikoplazma kontaminasyonu açısından negatif ve 10-20 pasaj numarasına sahip hücreler kullanılmıştır.

3.2.2.2 Sitotoksite analizleri

PM'lerin farklı dozlarının (100-2000 µg/mL) HUVEC, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre canlılığına olan etkisini belirlemek amacıyla MTT hücre canlılık analizi gerçekleştirilmiştir. MTT hücre canlılığı testi, MTT'nin mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından mor renkli formazan kristallerine dönüştürülmesine dayanmaktadır (Van Merloo vd. 2011). 96 kuyulu mikrolakalara kuyu başına 10.000 hücre ekilmiş ve tutunmaları için 37 °C sıcaklık, % 5 CO₂, % 95 bağıl nem koşullarında 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben besiyeri uzaklaştırılan kuyulara farklı dozlarda PM içeren besiyeri eklenmiştir. PM içermeyen besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 24 ve 48 saat süren inkübasyonun ardından kuyulara 5 mg/mL MTT solüsyonundan 10 µL eklenmiş ve 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. Oluşan mor renkli formazan kristalleri 100 µL DMSO kullanılarak çözünmüş ve açığa çıkan rengin sahip olduğu optik yoğunluk mikrolaka okuyucuda 570nm dalga boyunda okuma alınarak belirlenmiştir (Denizot vd. 1986). Bu aşamada, kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etki sergileyen ancak kontrol hücre hattında sergilemeyen PM dozları seçilmiş ve sonraki aşamalara dahil edilmiştir.

3.2.2.3 Apoptoz analizleri

PM ile muamele sonrası HUVEC, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin apoptoz durumu, üreticinin talimatlarına uygun olacak şekilde Anneksin V-FITC Apoptoz Tespit Kiti kullanılarak akış sitometrisi ile değerlendirilmiştir. 6 kuyulu hücre plakalarına kuyu başına 500.000 hücre ekilmiş ve tutunmaları için 37 °C sıcaklık, % 5 CO₂, % 95 bağıl nem koşullarında 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben besiyeri uzaklaştırılan kuyulara bir önceki aşamada seçilen dozlarda PM içeren besiyeri eklenmiştir. PM içermeyen besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 48 saat süren inkübasyonun ardından kuyulardaki üst faz uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkama yapılmıştır.

Hücreler tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmış ve 200xg'de 5 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Elde edilen hücrelerin PBS ile yıkaması yapılmış ve 150 µL Annexin V Binding Buffer eklenerek hücreler süspanse hale getirilmiştir. Ardından, süspanse haldeki hücrelerin üzerine 5 µL FITC-Annexin V ile 1 µL propidyum iyodür (PI) solüsyonu karanlık ortamda eklenmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben, akış sitometrisi kullanılarak apoptoz analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.4 Hücre döngüsü analizleri

PM'lerin HUVEC, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre döngüsü dağılımındaki etkisi PI kullanılarak hücre akış sitometrisi ile tespit edilmiştir. 6 kuyulu hücre plakalarına kuyu başına 500.000 hücre ekilmiş ve tutunmaları için 37 °C sıcaklık, % 5 CO₂, % 95 bağıl nem koşullarında 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben besiyeri uzaklaştırılan kuyulara bir önceki aşamada seçilen dozlarda PM içeren besiyeri eklenmiştir. PM içermeyen besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 48 saat süren inkübasyonun ardından kuyulardaki üst faz uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücreler tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmış ve 200xg'de 5 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Elde edilen hücrelerin PBS ile yıkaması yapılmış ve % 70 etanol ile muamele edilerek 4 °C'de 30 dakika fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fiksasyon sonrası hücreler 200xg'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz uzaklaştırılmıştır. Etanolün tamamen arındırılması amacıyla iki kez PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve hücrelerin üzerine 50µL RNaseA (200 µg/mL) eklenmiştir. 15 dakika boyunca 37 °C'de inkübasyonun ardından 200 µL PI boyası (50 µg/mL) ile karanlık ortamda muamele gerçekleştirilmiş ve 30 dakika 37°C'de inkübasyon sonrası hücre akış sitometri cihazı ile hücre döngüleri analiz edilmiştir.

3.2.2.5 Hücre göçü analizi

PM'lerin HUVEC MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre göçü (migrasyonu) üzerine olan etkileri yara iyileşme deneyi yapılarak belirlenmiştir (Liang vd. 2007) Kuyu başına 500.000 hücre olacak şekilde 6 kuyulu plakalara hücreler ekilmiş ve konfluent olana kadar inkübe edilmiştir. İstenilen yoğunluğa ulaşıldığında steril p1000 pipet ucu

kullanılarak yara alanı oluşturulmuş ve kültür ortamı uzaklaştırılmıştır. Ayrılan hücreler ve hücre kalıntıları, PBS ile hafifçe yıkama yapılarak uzaklaştırılmıştır. Ardından test gruplarına PM içeren besiyeri, negatif kontrol gruplarına ise PM içermeyen besiyeri eklenerek hücrelerin boşluğa doğru hareketi her 3 saatte bir inverted mikroskop kullanılarak incelenmiştir. Yara alanının iki kenarı arasında kalan mesafe ImageJ (NIH, ABD) yazılımı kullanılarak analiz edilmiş ve yara kapanma yüzdeleri aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Buachan vd. 2014). A: Yaranın 0. saatteki genişliği, B: Yaranın belirli saatteki genişliği

$$Kapanma\ yüzdesi\ (\%) = \frac{(A - B) \times 100}{A}$$

3.2.2.6 Koloni oluşum testi

PM'lerin HUVEC, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri koloni oluşturma potansiyeline olan etkileri koloni oluşum testi ile belirlenmiştir. 6 kuyulu hücre plakalarına kuyu başına 500 hücre ekilmiş ve tutunmaları için 37 °C sıcaklık, % 5 CO₂, % 95 bağıl nem koşullarında 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben besiyeri uzaklaştırılan kuyulara bir önceki aşamada seçilen dozlarda PM içeren besiyeri eklenmiştir. PM içermeyen besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 48 saat süren inkübasyonun ardından kuyulardaki üst faz uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkama yapılarak PM içermeyen taze besiyeri eklenmiştir. 7 gün boyunca hücrelerin büyümesi takip edilmiş ve besiyeri her 2 günde bir yenilenmiştir. 7. günün sonunda kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Ardından, hücreler -20 °C'de 30 dakika boyunca % 100 metanol içerisinde fikse edilmiştir. Koloni boyaması amacıyla, % 25 metanol ile hazırlanan % 0,5 kristal viyole ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca muamele edilmiş ve fazla boya su ile yıkama yapılarak uzaklaştırılmıştır (Buranrat Booth 2019). Yıkama ve kurutmanın ardından kolonilerin morfolojik görüntüleri fotoğraflanmış ve 50'den fazla hücreden oluşan koloniler, Image J yazılımı (NIH, Bethesda, MA, ABD) kullanılarak otomatik olarak sayılmıştır. Koloniler sayıldıktan sonra kaplama verimliliği (PE) ve hayatta kalma oranı (SF) aşağıdaki denklemler kullanılarak hesaplanmıştır (Franken vd. 2006).

$$PE = \frac{\text{Oluşan Koloni Sayısı}}{\text{Ekilen Hücre Sayısı}} \times \% 100$$

$$SF = \frac{\text{Tedavisi sonrası oluşan koloni sayısı}}{\text{Ekilen Hücre Sayısı} \times PE} \times \% 100$$

3.2.2.7 Reaktif oksijen giderim testi

PM'lerin HUVEC, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre içi ROS üretimine olan etkisi 2, 7-diklorofloresein diasetat (DCFDA) boyası kullanılarak belirlenmiştir. 6 kuyulu hücre plakalarına kuyu başına 500.000 hücre ekilmiş ve tutunmaları için 37 °C sıcaklık, % 5 CO₂, % 95 bağıl nem koşullarında 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben besiyeri uzaklaştırılan kuyulara bir önceki aşamada seçilen dozlarda PM içeren besiyeri eklenmiştir. PM içermeyen besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 48 saat süren inkübasyonun ardından kuyulardaki üst faz uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücreler tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmış ve 200xg'de 5 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Elde edilen hücreler 100 µL 25 µM DCFDA boyası ile karanlık ortamda muamele edilmiş ve 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından, ROS oluşumunun niteliksel analizi için akış sitometrisi kullanılmıştır.

3.2.2.8 Gen ifade analizleri

PM'lerin HUVEC, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre gen ifadeleri üzerine olan etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla kantitatif PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. 6 kuyulu hücre plakalarına kuyu başına 500.000 hücre ekilmiş ve tutunmaları için 37 °C sıcaklık, % 5 CO₂, % 95 bağıl nem koşullarında 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben besiyeri uzaklaştırılan kuyulara bir önceki aşamada seçilen dozlarda PM içeren besiyeri eklenmiştir. PM içermeyen besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 48 saat süren inkübasyonun ardından kuyulardaki üst faz uzaklaştırılmış ve 1 mL PureZOL solüsyonu kullanılarak hücreler kaldırılmıştır. 200xg'de 5 dakika santrifüj işlemini

takiben toplanan üst faz 200 µL soğuk saf kloroform ile 5 dakika boyunca muamele edilmiş ve santrifüj sonrası pellet toplanmıştır. Pellet üzerine 500 µL soğuk saf izopropanol eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından santrifüj ile üst faz uzaklaştırılmış ve 1 mL % 75 soğuk etanol eklenerek örnekler vortekslenmiştir. Santrifüj işlemi neticesinde elde edilen pellet kurumaya bırakılmıştır. 30 µL PCR suyu ile çözünen RNA örneklerinin saflığı ve miktarları 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülerek kontrol edilmiştir.

Elde edilen RNA örnekleri, 4 µL 5x iScript reaksiyon mix, 1µL transkriptaz enzimi ve total hacmi 20 µL'ye tamamlayacak miktarda ddH₂O ile karıştırılmış ve 25 °C derecede 5 dakika, 46 °C derecede 20 dakika ve 95 °C derecede 1 dakika reaksiyonu takip eden termal döngü cihazında cDNA'ları elde edilmiştir. Seçilen her bir gen bölgesinin (Kaspaz 3, Bcl-2, CCND1, CCNE1) ifade seviyesinin belirlenebilmesi için ayrı ayrı olmak üzere PCR reaksiyonu hazırlanmıştır. 10 µL olarak hazırlanan reaksiyon içeriğine 5 µL 1x SYBR Green Master mix, 1 µL primer ve 1 µL cDNA eklenmiş ve reaksiyon 40 döngüde tamamlanmıştır. qPCR analizlerinde β-aktin kontrol geni olarak kullanılmış ve gen ifade seviyesi eşik döngüsü (CT) değerleri dikkate alınarak $2^{-\Delta CT}/(\text{ortalama } (2^{-\Delta CT}))$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.2 qPCR analizinde kullanılan genler ve primerlerin dizileri

Gen	İleri 5' → 3'	Geri 5' → 3'
<i>Kaspaz 3</i>	ACTGGACTGTGGCATTGAGA	GCACAAAGCGACTGGATGAA
<i>Bcl-2</i>	CAGAATAACCAGAACTAAGGGTATGAAGGA	CCAAACGGAGCTGCACT
<i>CCND1</i>	TCTGCGAGGAACAGAAGTGC	GAAATCGTGCGGGGTCATTG
<i>CCNE1</i>	TGAGCAACACCCTCTTCTG	TCGCCATATACCGGTCAAAGA
<i>β-actin</i>	CCT GGC ACC CAG CAC AAT	GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT

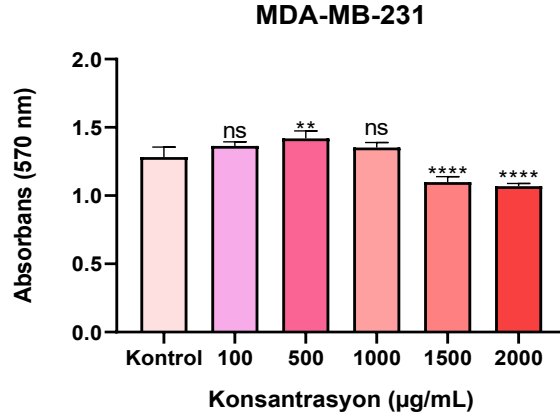
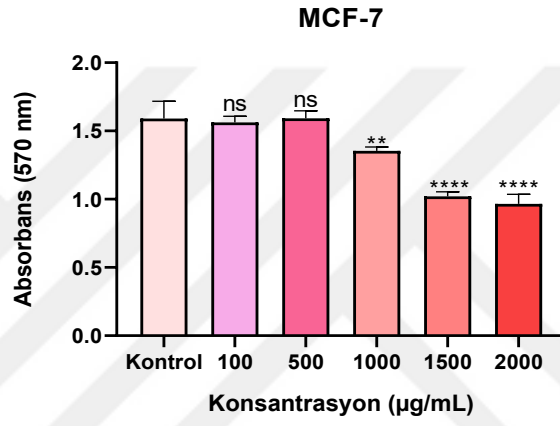
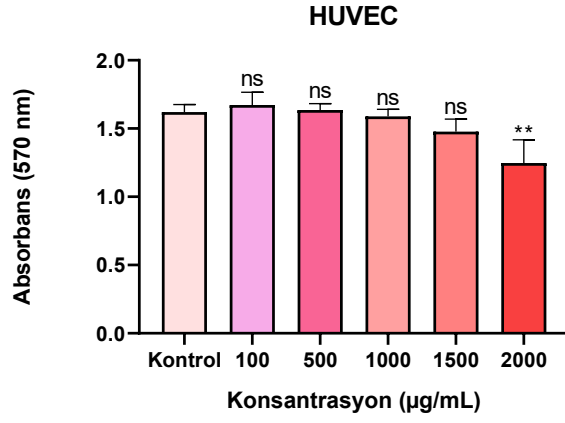
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 PM'lerin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

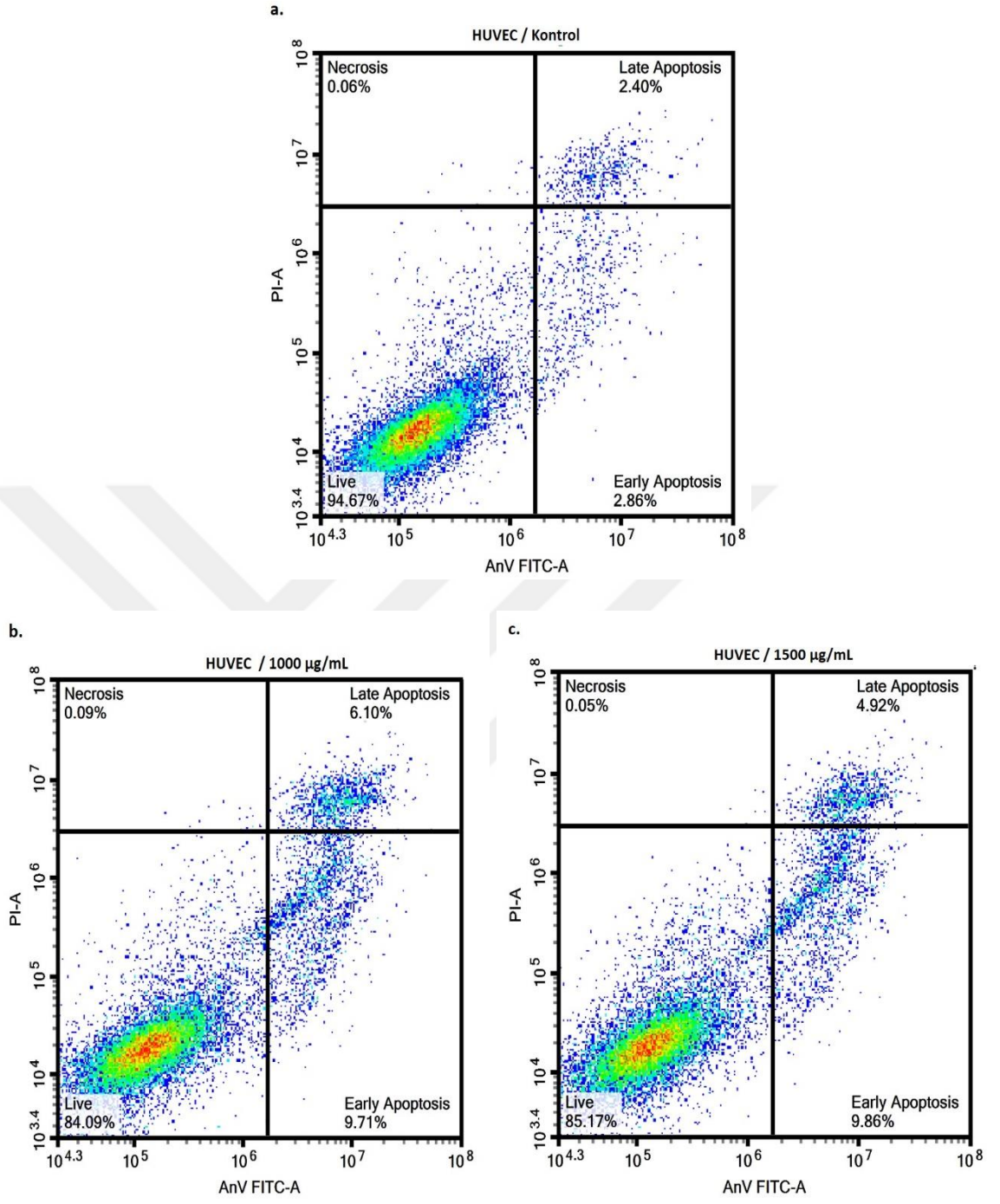
PM'lerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi MTT analizi neticesinde değerlendirilmiştir (Şekil 4.1). Elde edilen veriler, PM'lerin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri ile 48 saat muamelesini takiben hücre canlılığını doza bağlı olarak azalttığını göstermiştir. Kontrol hücrelerinde ise 2000 µg/mL PM dozu dışında diğer dozların hücre ölümüne neden olmadıkları belirlenmiştir (Şekil 4.1). Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, 48 saat inkübasyonu takiben meme kanseri hücreleri üzerinde seçici sitotoksik etki sergileyen en yüksek iki doz (1000 µg/mL ve 1500 µg/mL) ile çalışmaya devam edilmesine karar verilmiştir.

4.2 PM'lerin Apoptoz İndüksiyonuna Etkileri

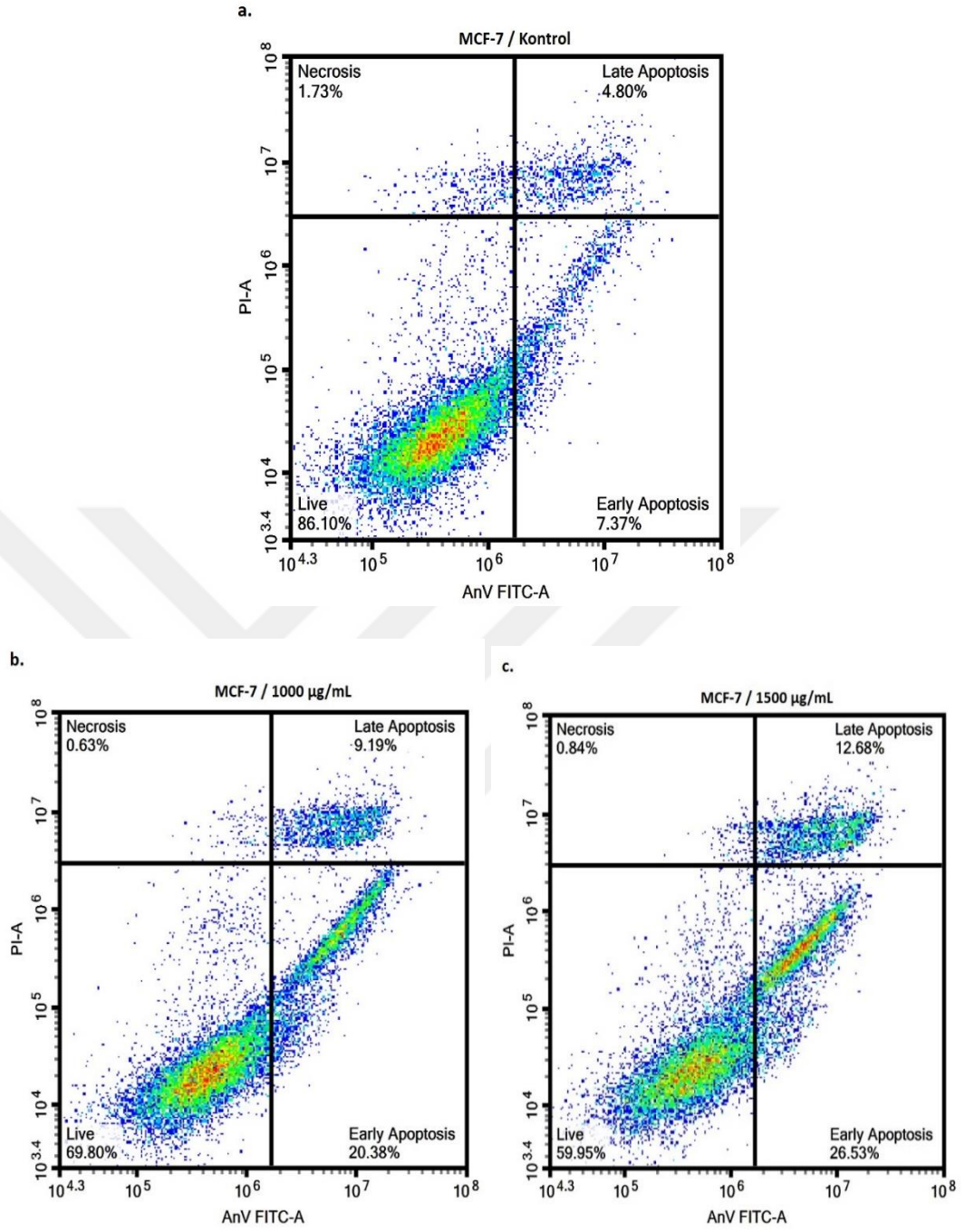
PM (1000 µg/mL ve 1500 µg/mL) uygulamasını takiben meme kanseri hücrelerine ve sağlıklı hücrelere ait apoptoz durumu Annexin V-FITC/PI ile yapılan boyama neticesinde hücre akış sitometrisi kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler neticesinde, canlı ile nekroz ve apoptoza uğrayan hücrelerin % dağılımları tespit edilmiştir. Elde edilen veriler, sağlıklı hücrelerin PM uygulamasından sonra en fazla % 15 oranında apoptoza girdiğini göstermiştir (Şekil 4.2). PM'ler ile 48 saat muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin ise PM dozuna bağlı olarak sağlıklı hücrelere kıyasla daha fazla oranda apoptoza girdiği tespit edilmiştir. 1000 µg/mL ve 1500 µg/mL konsantrasyon ile mumale edilen MCF-7 hücrelerinde % 30 ve % 39 (Şekil 4.3), MDA-MB-231 hücrelerinde ise % 22 ve % 23 (Şekil 4.4) oranında apoptoz gözlemlenmiştir. Tüm verilere ait yığın grafikleri ise şekil 4.5'de sunulmuştur.



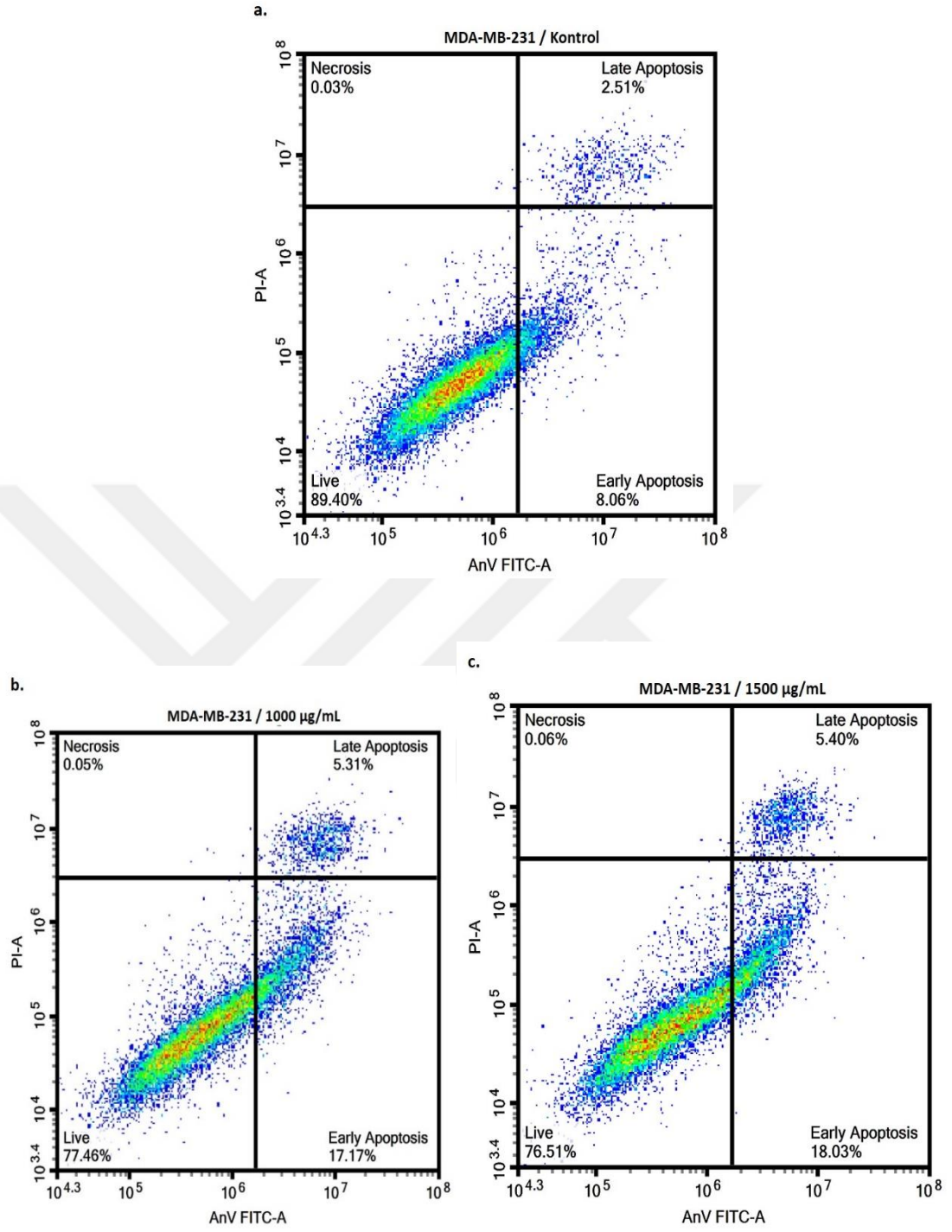
Şekil 4.1 PM'lerin 48 saat süren inkübasyon sonrası hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi (ns: anlamlı değil; **: $p < 0.01$; ****: $p < 0.0001$)



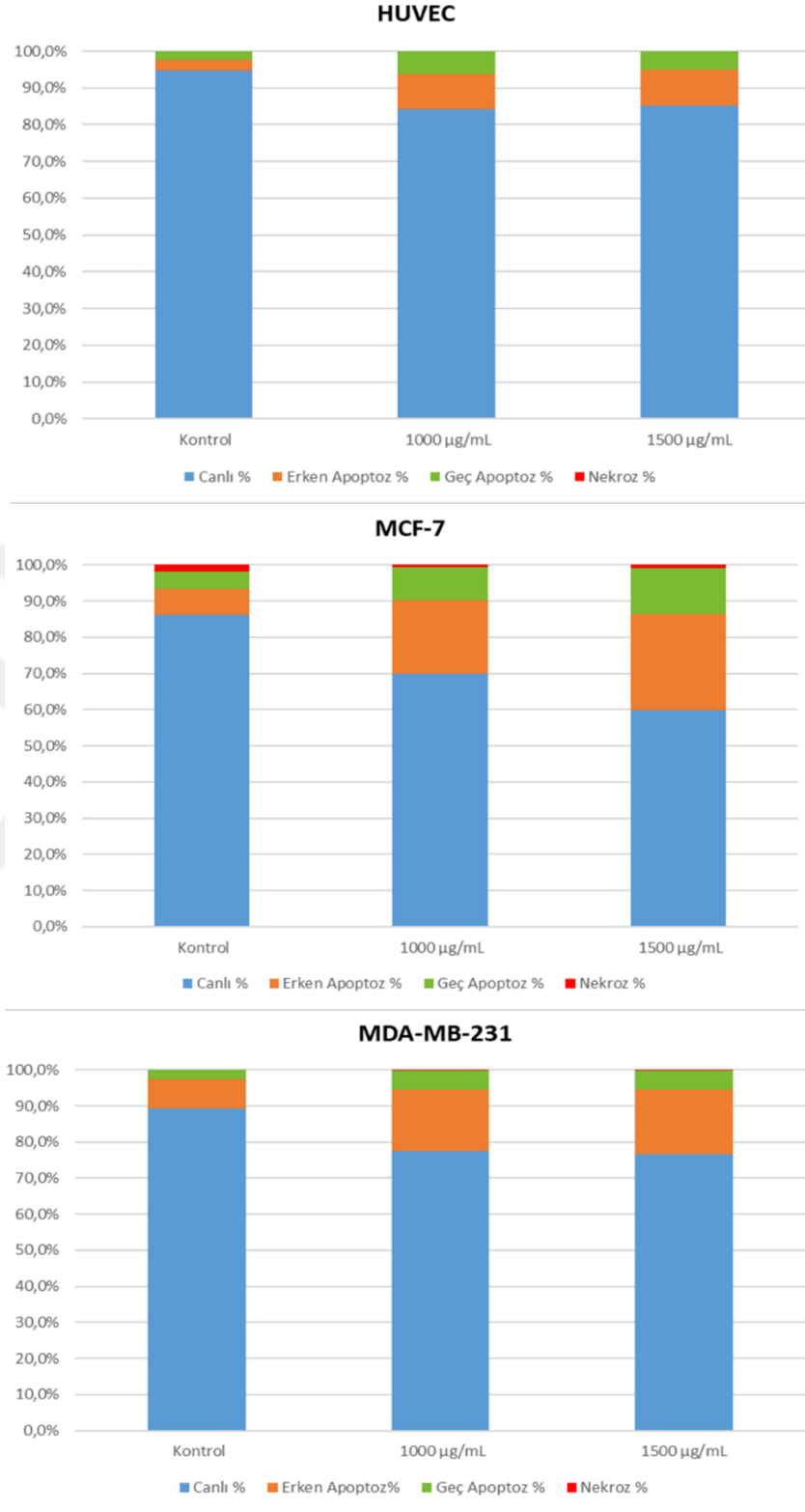
Şekil 4.2 HUVEC hücrelerindeki apoptoz durumu (a) PM uygulaması yapılmayan kontrol grubu, (b) 1000 µg/mL ve (c) 1500 µg/mL PM uygulaması yapılan test grupları



Şekil 4.3 MCF-7 hücrelerindeki apoptoz durumu (a) PM uygulaması yapılmayan kontrol grubu, (b) 1000 µg/mL ve (c) 1500 µg/mL PM uygulaması yapılan test grupları



Şekil 4.4 MDA-MB-231 hücrelerindeki apoptoz durumu (a) PM uygulaması yapılmayan kontrol grubu, (b) 1000 µg/mL ve (c) 1500 µg/mL PM uygulaması yapılan test grupları



Şekil 4.5 Apoptoz analiz sonuçlarını içeren yığın grafikleri

4.3 PM'lerin Hücre Döngüsü Dağılımındaki Etkileri

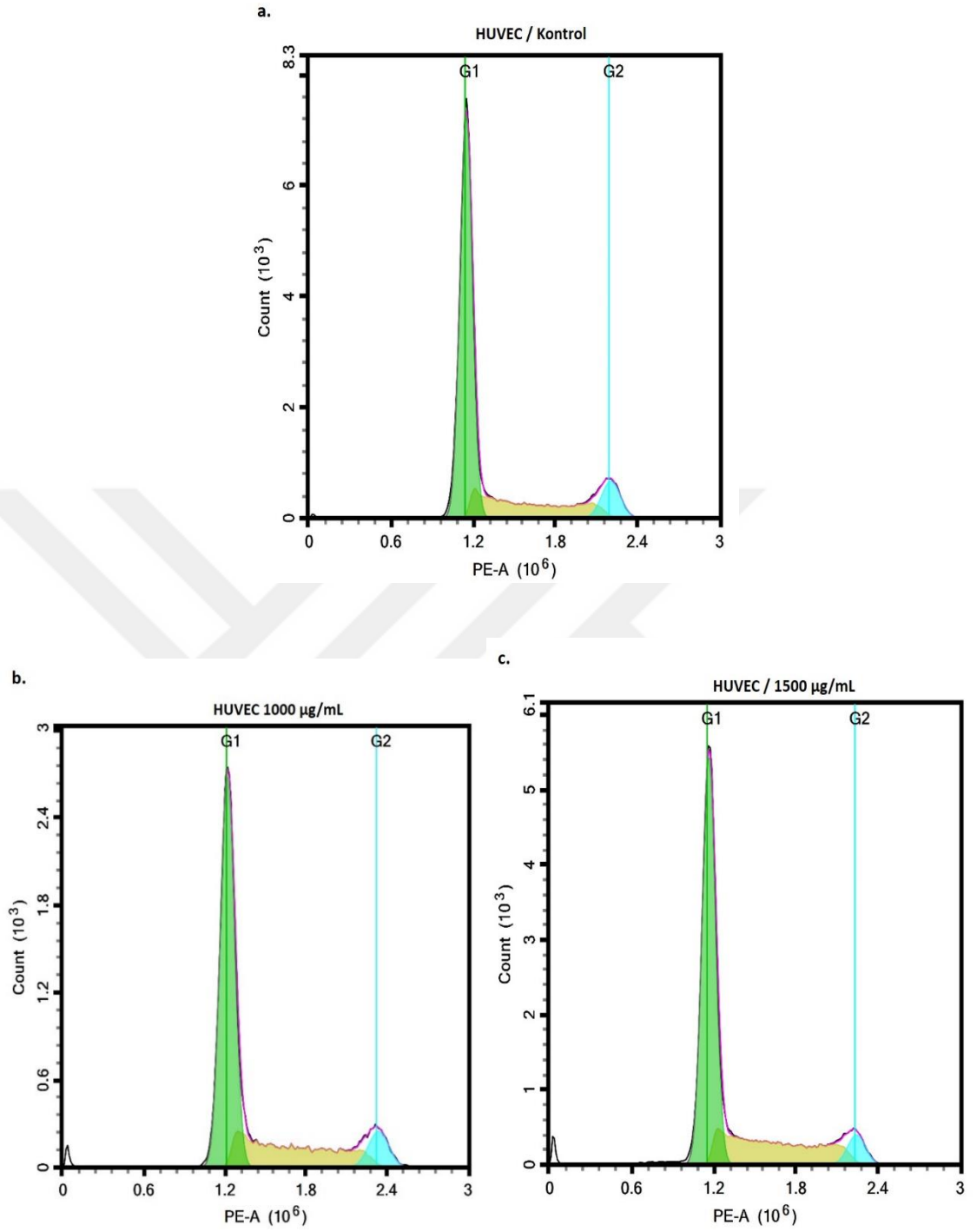
PM (1000 µg/mL ve 1500 µg/mL) uygulamasını takiben meme kanseri hücrelerine ve sağlıklı hücrelere ait hücre döngüsü dağılımı PI ile yapılan boyamalar neticesinde hücre akış sitometrisi kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler neticesinde, kontrol grupları ile PM uygulaması yapılan gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Çizelge 4.1). Akış sitometresi sonrasında elde edilen diyagramlar ise şekil 4.6-4.8'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1 Hücre akış sitometri analizleri neticesinde elde edilen veriler (%)

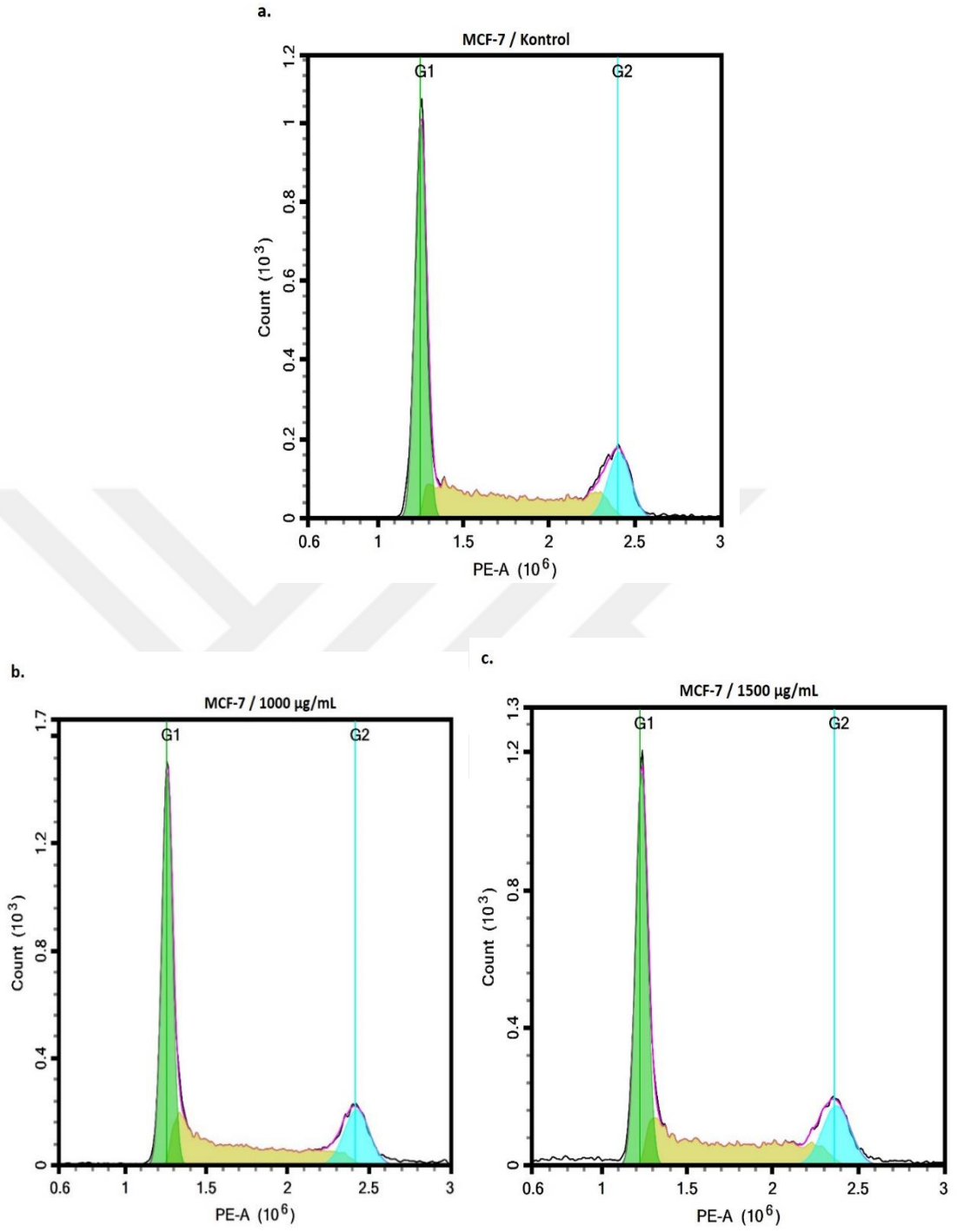
Örnek	Freq G1	Freq S	Freq G2	G2/G1	Freq Sub-G1	Freq Super-G2
MDA-MB-231 (Kontrol)	40,61	41,58	14,01	1,93	3,47	0,32
MDA-MB-231 (1000 µg/mL PM uygulaması)	42,35	39,15	12,6	1,92	5,6	0,3
MDA-MB-231 (1500 µg/mL PM uygulaması)	37,82	42,76	13,51	1,92	5,42	0,49
MCF-7 (Kontrol)	46,23	37,09	15,29	1,93	0,18	1,21
MCF-7 (1000 µg/mL PM uygulaması)	46,85	34,26	15,77	1,93	1,52	1,59
MCF-7 (1500 µg/mL PM uygulaması)	43,79	34,73	15,77	1,92	4,16	1,56
HUVEC (Kontrol)	66,69	23,1	9,37	1,92	0,53	0,31
HUVEC (1000 µg/mL PM uygulaması)	62,28	27,33	8,36	1,92	1,7	0,32
HUVEC (1500 µg/mL PM uygulaması)	61,63	29,12	6,11	1,93	2,79	0,35

4.4 PM'lerin Hücre Göçü (Migrasyon) Üzerine Etkileri

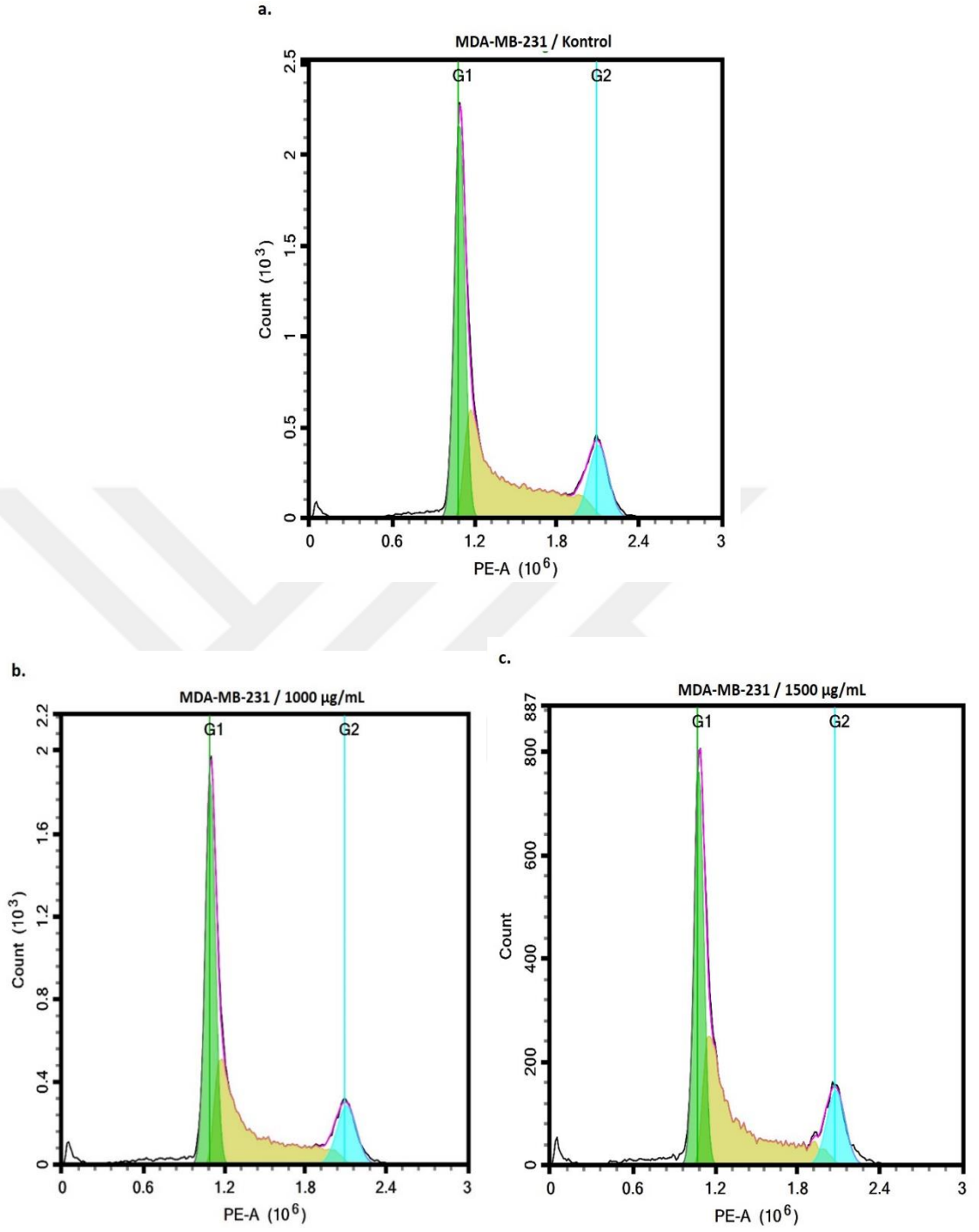
PM'lerin *in vitro* koşullarda meme kanseri hücre hareketliliği üzerindeki etkinliklerini belirlemek amacıyla yara modeli protokolü takip edilmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, sağlıklı hücrelerde kontrole kıyasla anlamlı bir farklılık gözlemlenmemesine rağmen (Şekil 4.9), PM ile muamelenin MCF-7 hücre göçünü 36. saatin sonunda kontrole kıyasla % 18 (1000 µg/mL) ve % 28 (1500 µg/mL), MDA-MB-231 hücre göçünü ise 24. saatin sonunda kontrole kıyasla % 11 (1000 µg/mL) ve % 13 (1500 µg/mL) oranında azalttığını tespit edilmiştir (Şekil 4.10-4.12).



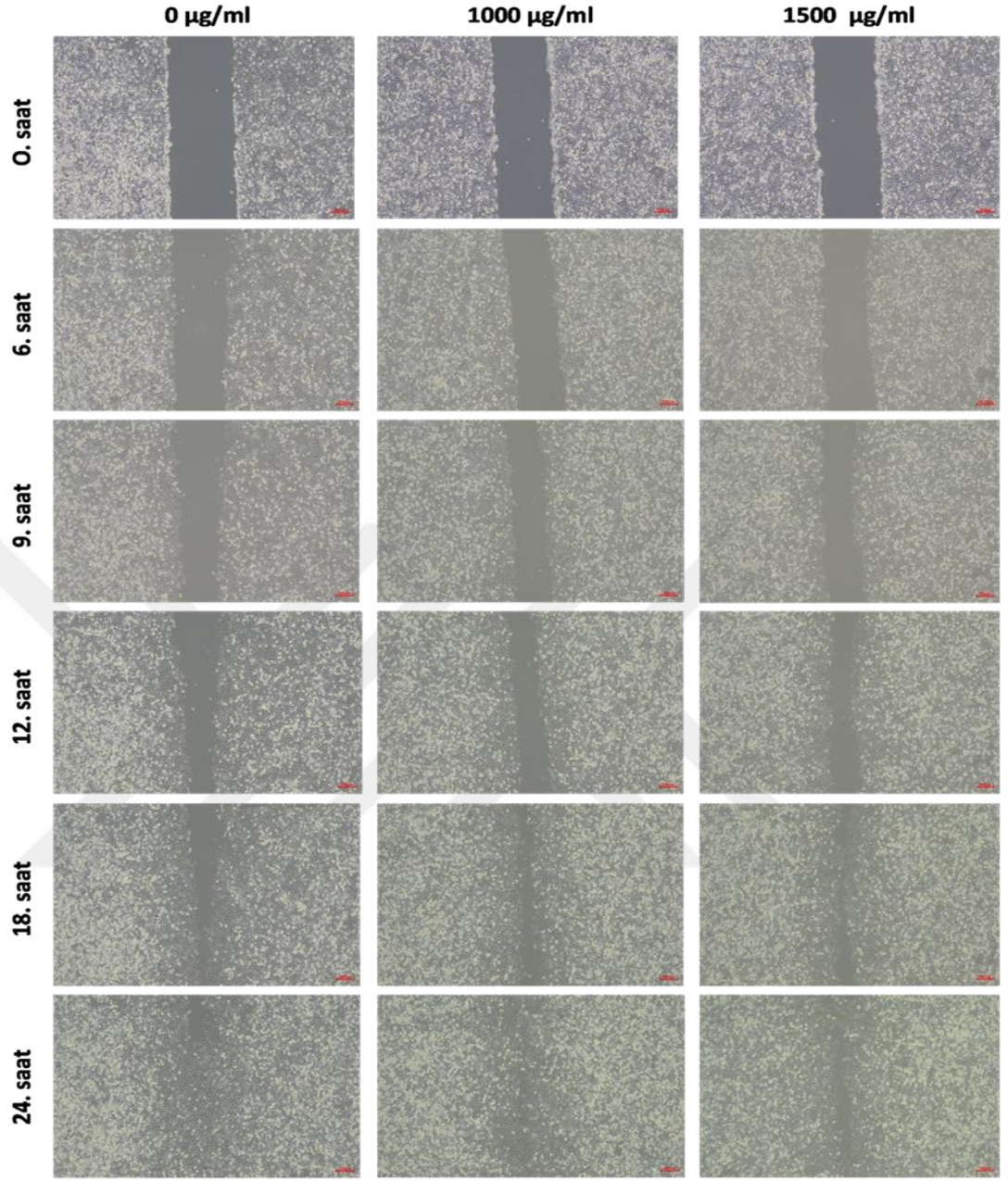
Şekil 4.6 HUVEC hücrelerine ait hücre döngüsü dağılımı (a) PM uygulaması yapılmayan kontrol grubu, (b) 1000 µg/mL ve (c) 1500 µg/mL PM uygulaması yapılan test grupları



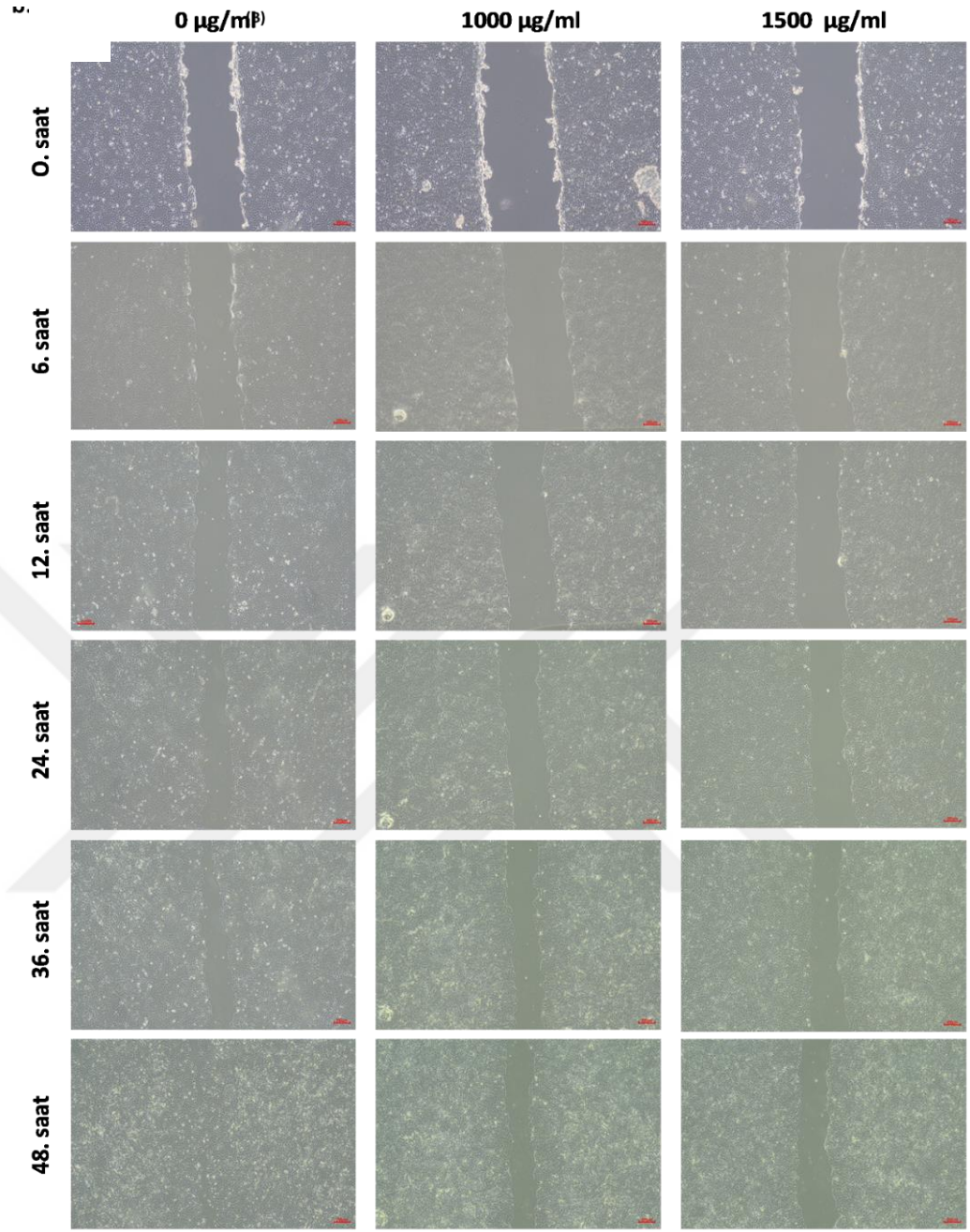
Şekil 4.7 MCF-7 hücrelerine ait hücre döngüsü dağılımı (a) PM uygulaması yapılmayan kontrol grubu, (b) 1000 µg/mL ve (c) 1500 µg/mL PM uygulaması yapılan test grupları



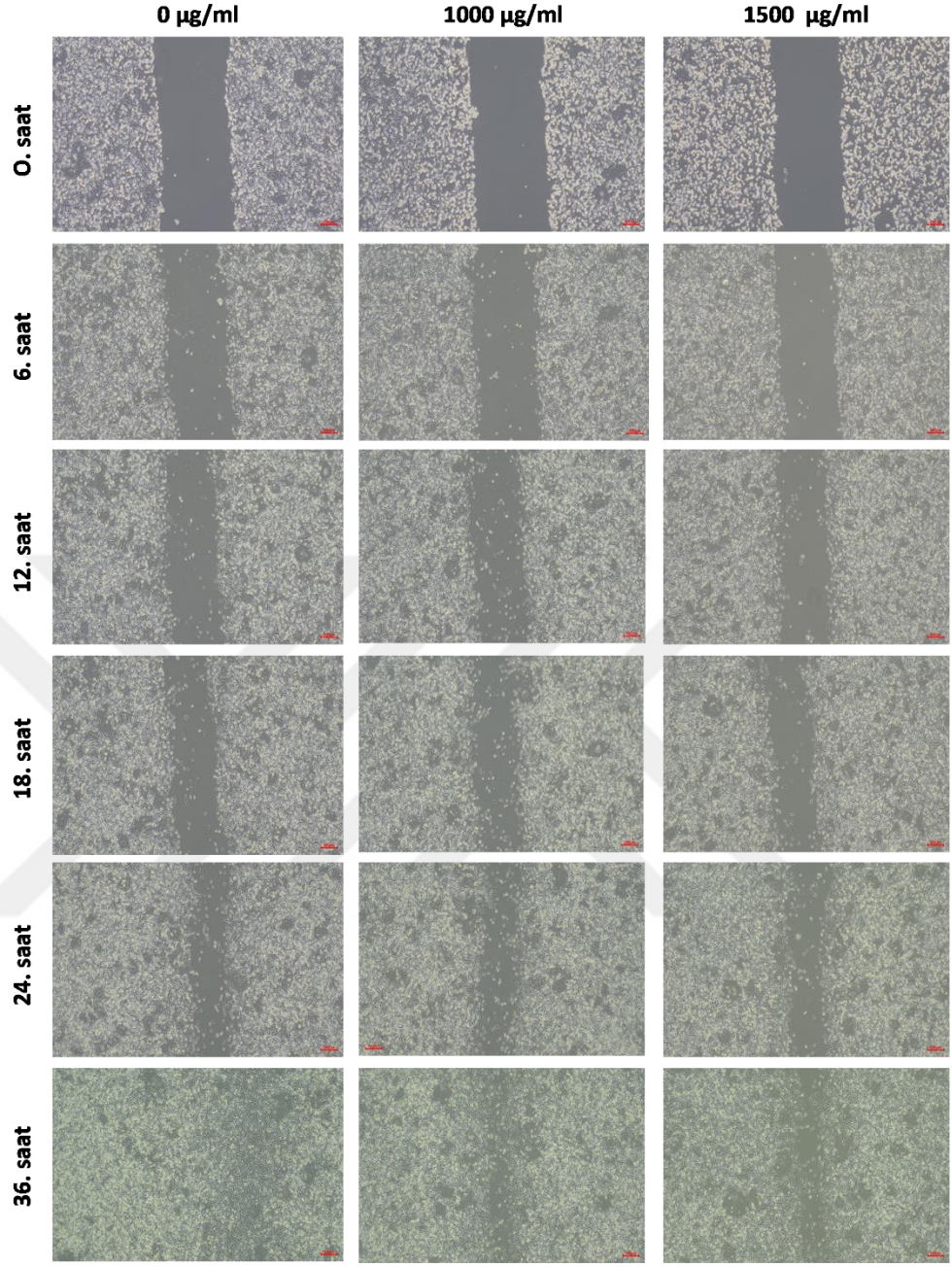
Şekil 4.8 MDA-MB-231 hücrelerine ait hücre döngüsü dağılımı (a) PM uygulaması yapılmayan kontrol grubu, (b) 1000 $\mu\text{g/mL}$ ve (c) 1500 $\mu\text{g/mL}$ PM uygulaması yapılan test grupları



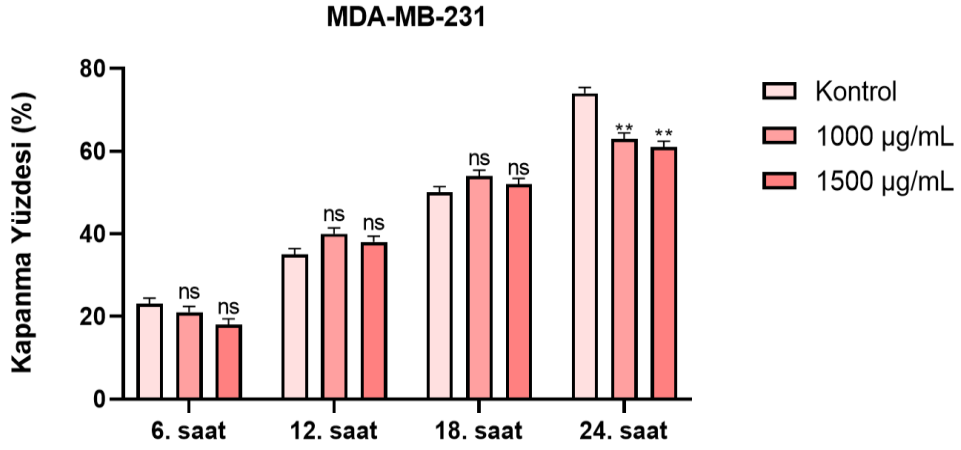
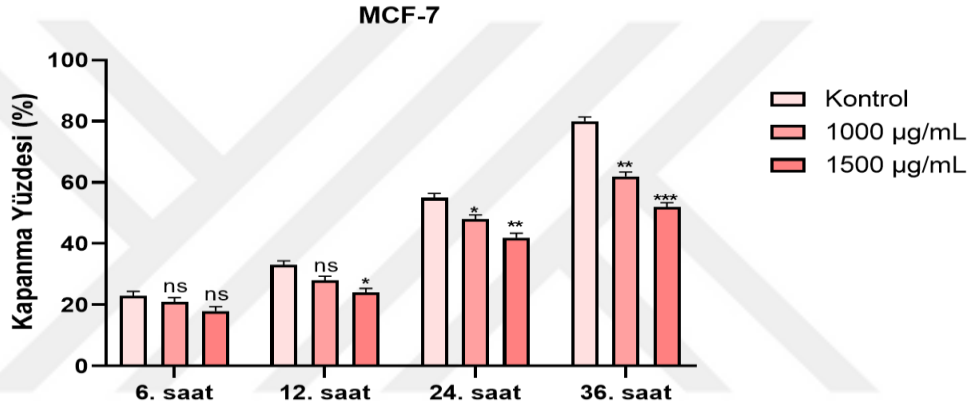
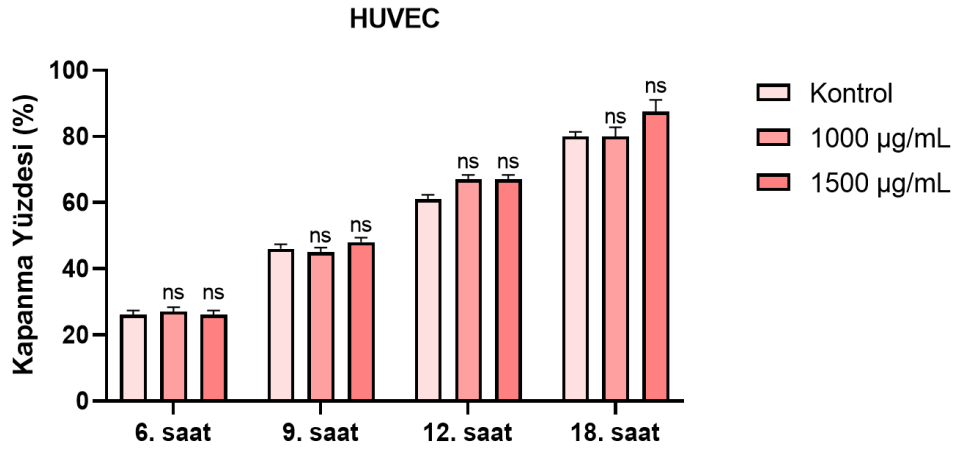
Şekil 4.9 PM'lerin HUVEC hücre hareketliliği üzerine etkilerine ait mikroskop görüntüleri



Şekil 4.10 PM'lerin MCF-7 hücre hareketliliği üzerine etkilerine ait mikroskop görüntüleri



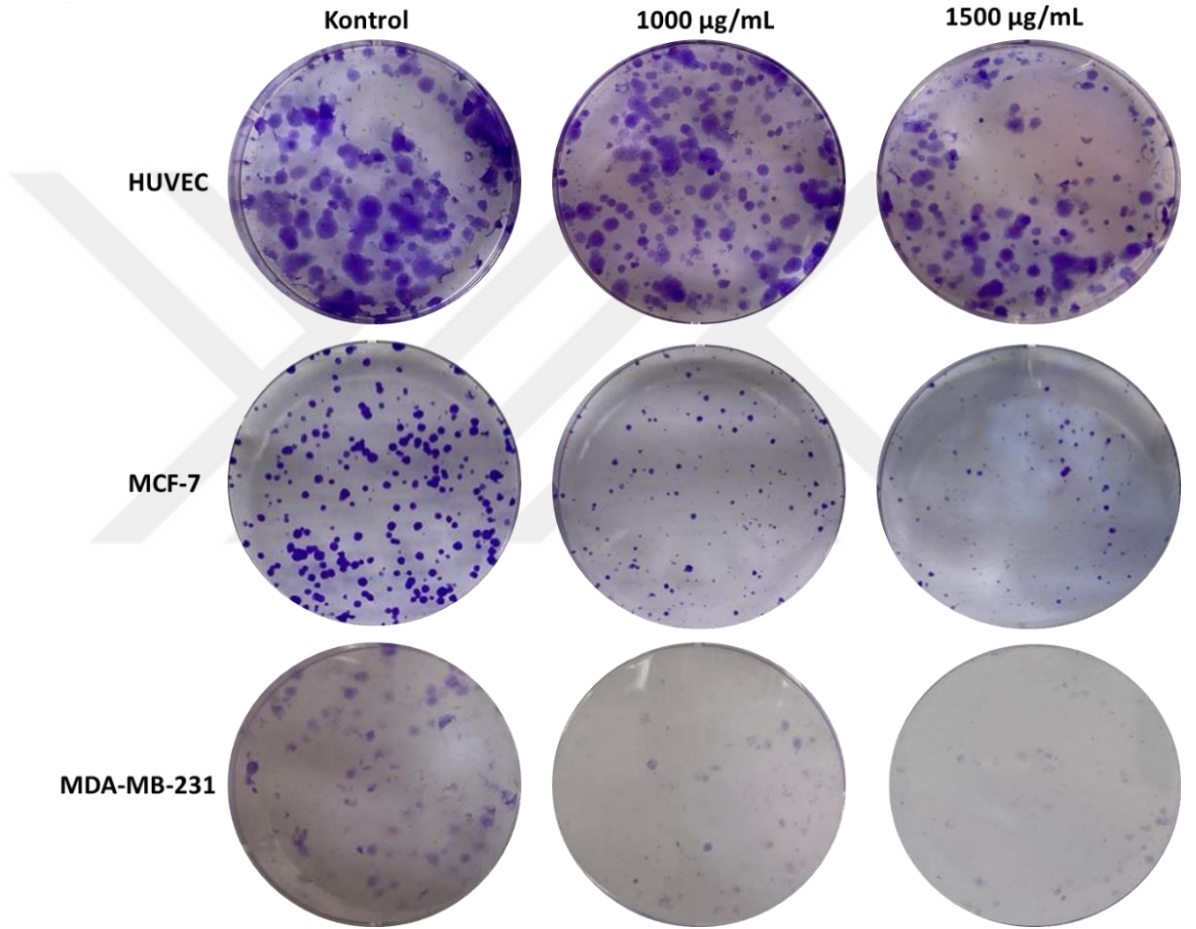
Şekil 4.11 PM'lerin MDA-MB-231 hücre hareketliliği üzerine etkilerine ait mikroskop görüntüleri



Şekil 4.12 PM'lerin hücre kapanması üzerine etkileri (%)
(ns: anlamlı değil; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)

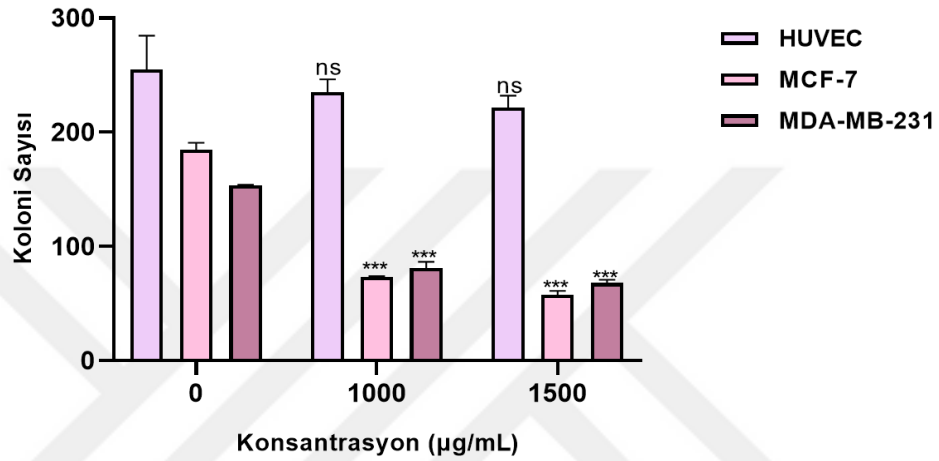
4.5 PM'lerin Klonojenik Aktivite Üzerindeki Etkileri

PM'lerin anti-proliferatif etkilerini belirlemek amacıyla klonojenik analizler gerçekleştirilmiştir. 48 saat boyunca PM'ler (1000 µg/mL ve 1500 µg/mL) ile muamele edildiğinde HUVEC hücrelerine kıyasla MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşumunun önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.13).

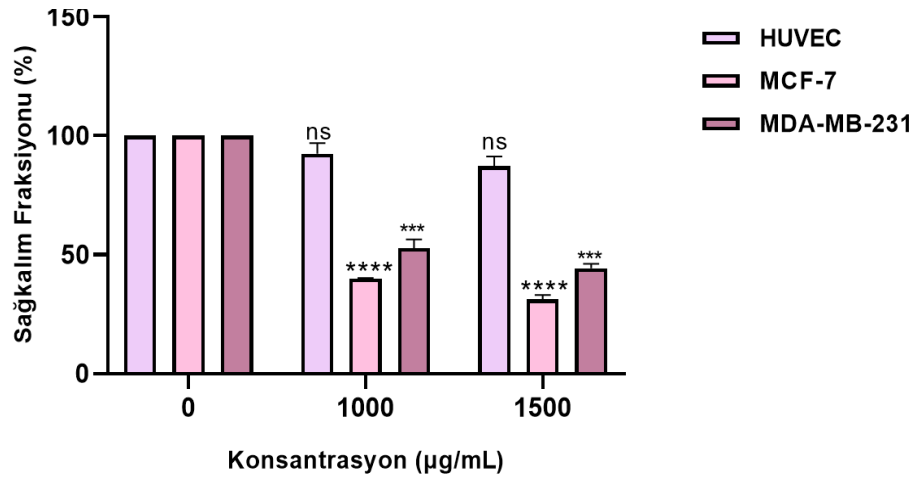


Şekil 4.13 PM'lerin hücre koloni oluşum aktivitesi üzerine etkisi (koloni oluşumunun temsili mikroskop görüntüleri)

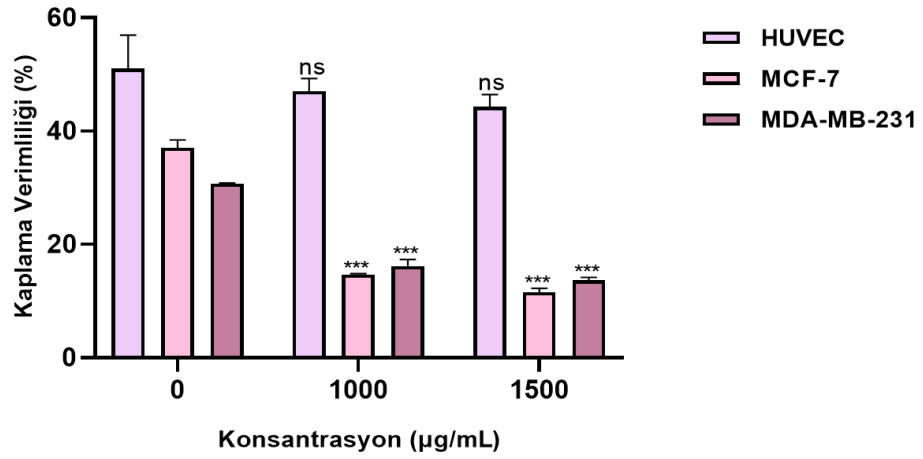
7 gün PM muamelesini takiben HUVEC hücre koloni sayısında herhangi bir değişiklik olmazken MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri koloni sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.14). HUVEC, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin hesaplanan sağkalım fraksiyonları şekil 4.15, kaplama verimliliği ise şekil 4.16’da sunulmuştur. Koloni oluşumunun temsili mikroskop görüntüleri de şekil 4.17’de verilmiştir.



Şekil 4.14 7 günlük muamele neticesinde oluşan koloni sayıları (ns: anlamlı değil; ***: $p < 0.001$)



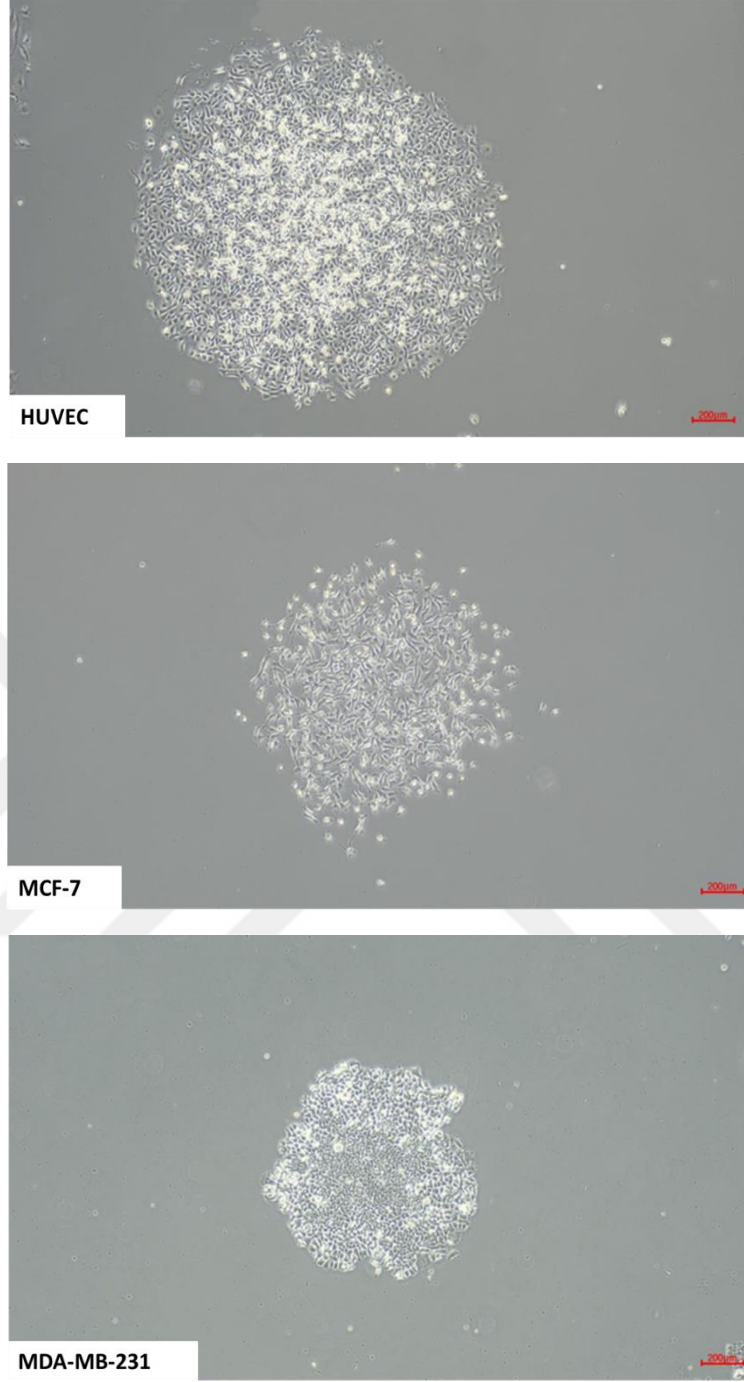
Şekil 4.15 7 günlük muamele neticesinde hesaplanan sağkalım fraksiyon yüzdeleri (ns: anlamlı değil; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$)



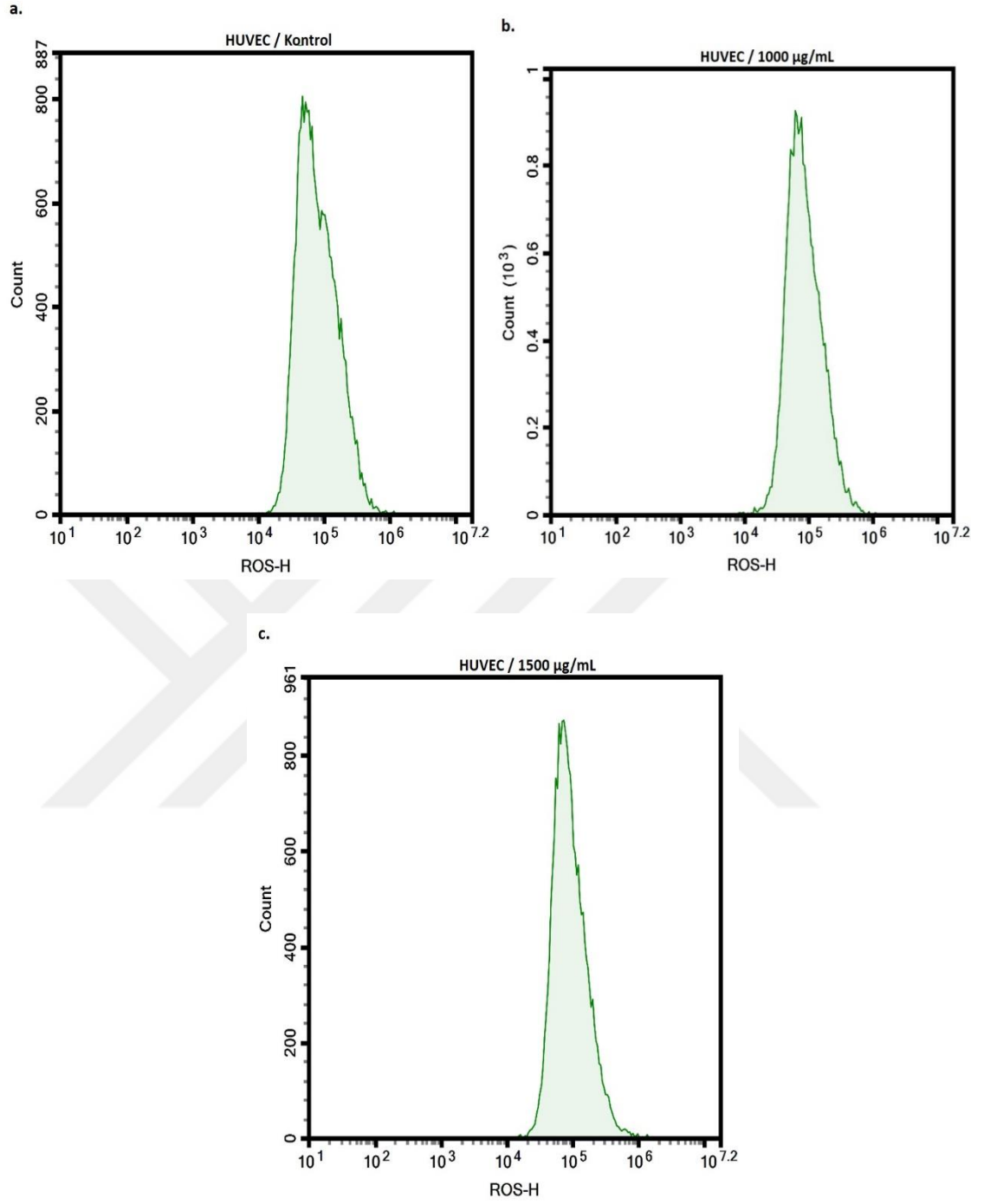
Şekil 4.16 7 günlük muamele neticesinde hesaplanan yüzde kaplama verimliliği (ns: anlamlı değil; ***: $p < 0.001$)

4.6 PM'lerin ROS Üretimine Etkileri

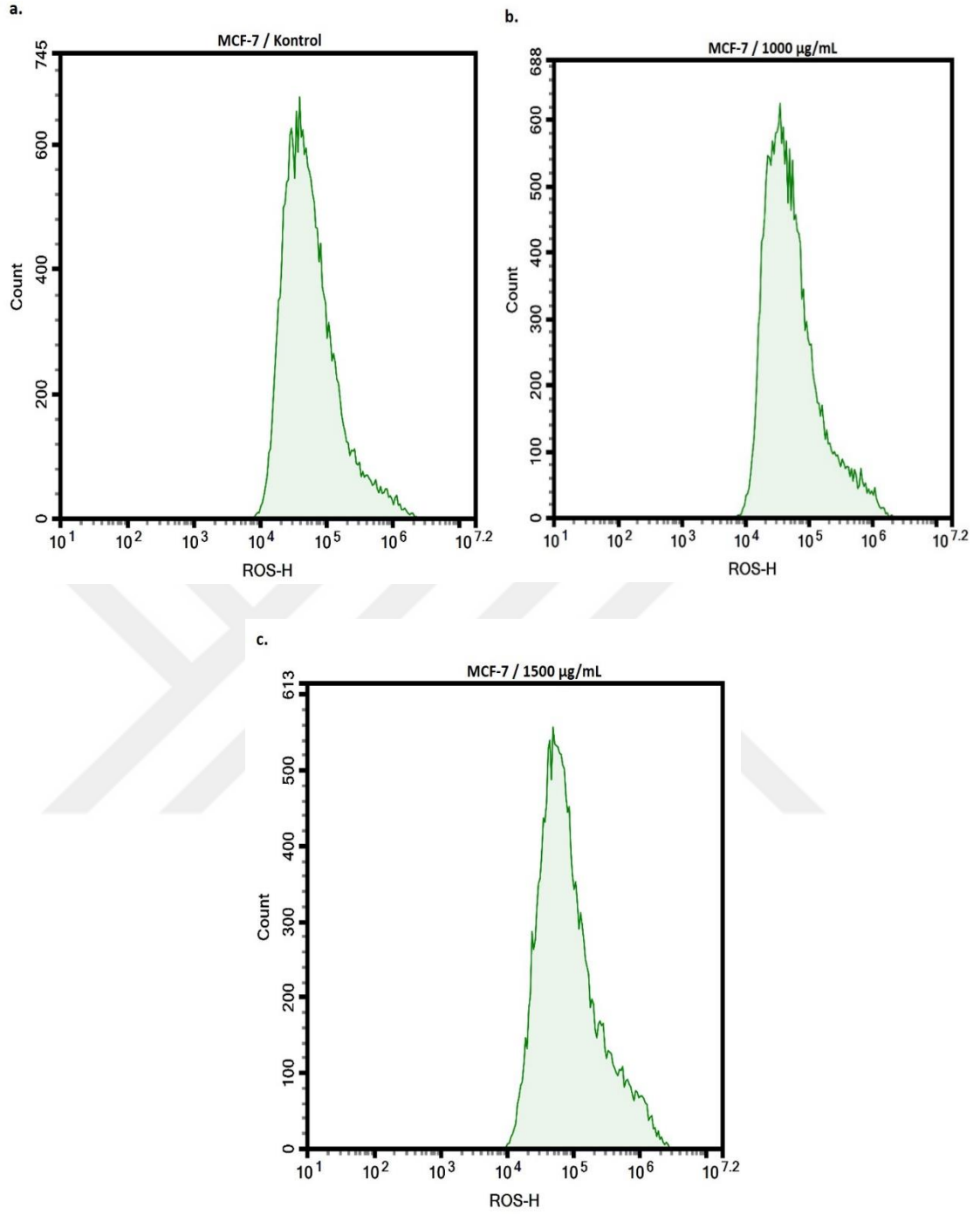
PM'lerin meme kanseri hücreleri üzerindeki hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynaklı oksidatif hasarı DCFDA boyası kullanılarak akış sitometri analizi ile belirlenmiştir. MCF-7 hücrelerinde 1500 µg/mL, MDA-MB-231 hücrelerinde ise hem iki doz PM uygulamasının ROS üretimini önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir. Sağlıklı hücrelerde ise 1000 µg/mL PM uygulaması sonucunda ROS üretiminde anlamlı bir farklılık gözlenmezken 1500 µg/mL PM uygulaması sonucunda meme kanseri hücrelerine kıyasla oldukça az oranda ROS üretimi gözlemlenmiştir (Şekil 4.18-21).



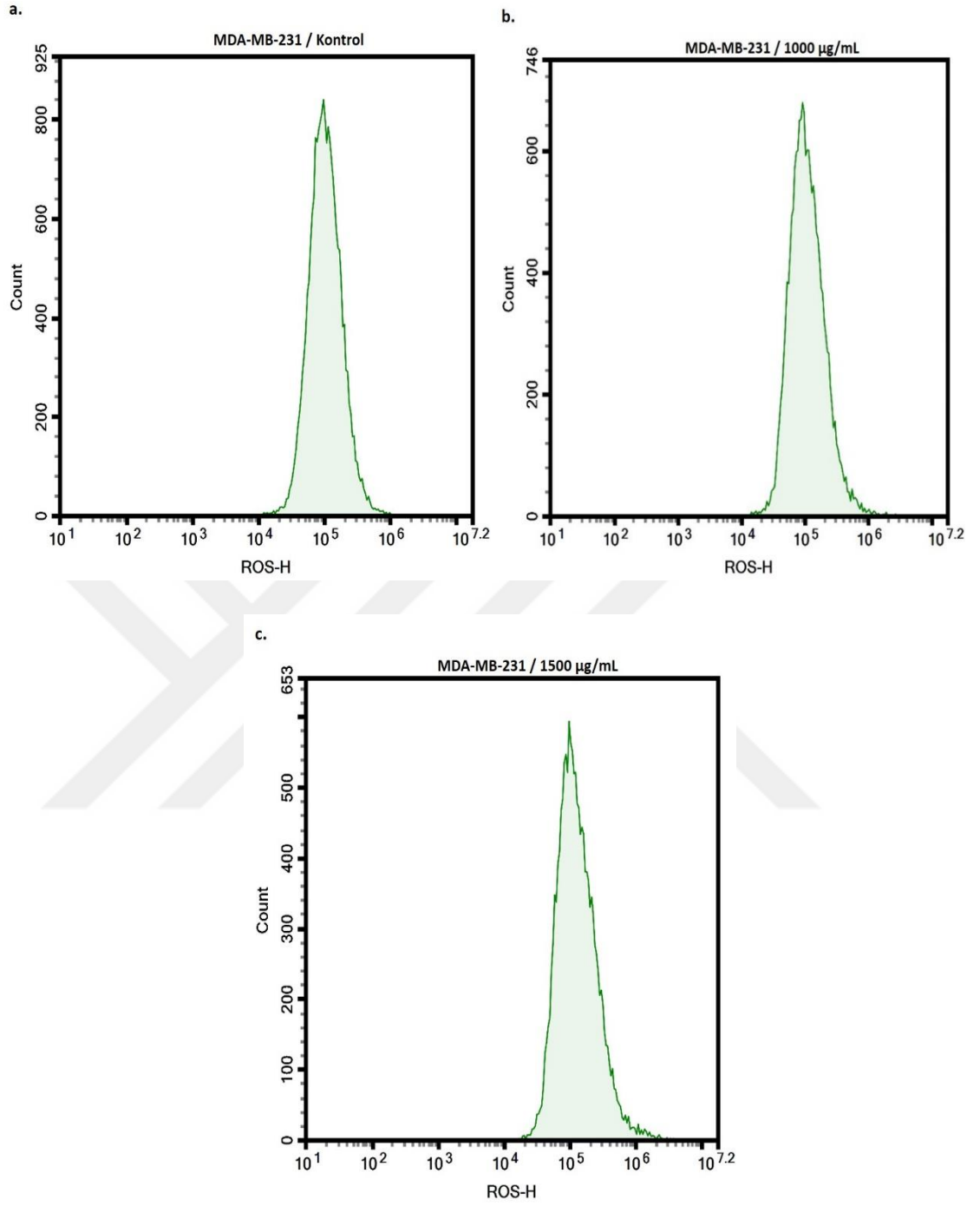
Şekil 4.17 PM'lerin hücre koloni oluşum üzerine etkilerinin temsili mikroskop görüntüleri



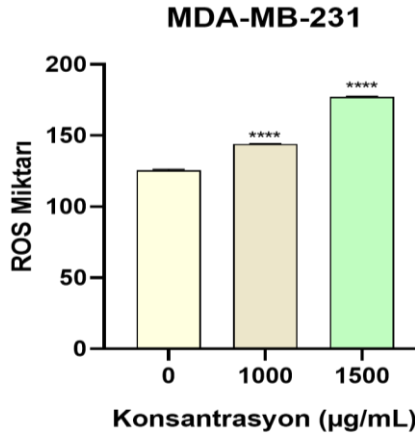
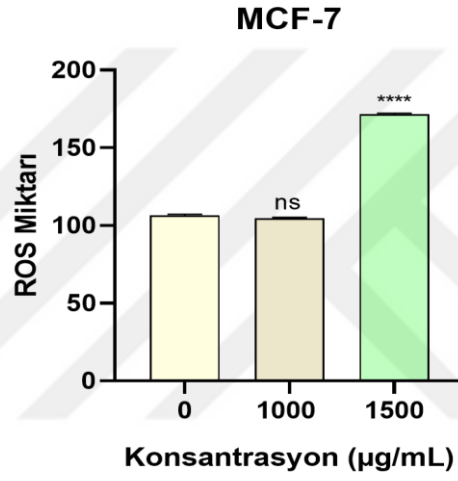
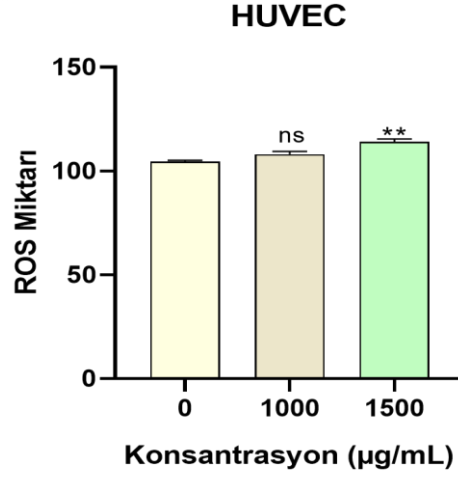
Şekil 4.18 HUVEC hücrelerindeki ROS miktarlarını gösteren akış sitometri diyagramları
(a) PM uygulaması yapılmayan kontrol grubu, (b) 1000 µg/mL ve (c) 1500 µg/mL PM uygulaması yapılan test grupları



Şekil 4.19 MCF-7 hücrelerindeki ROS miktarlarını gösteren akış sitometri diyagramları (a) PM uygulaması yapılmayan kontrol grubu, (b) 1000 µg/mL ve (c) 1500 µg/mL PM uygulaması yapılan test grupları



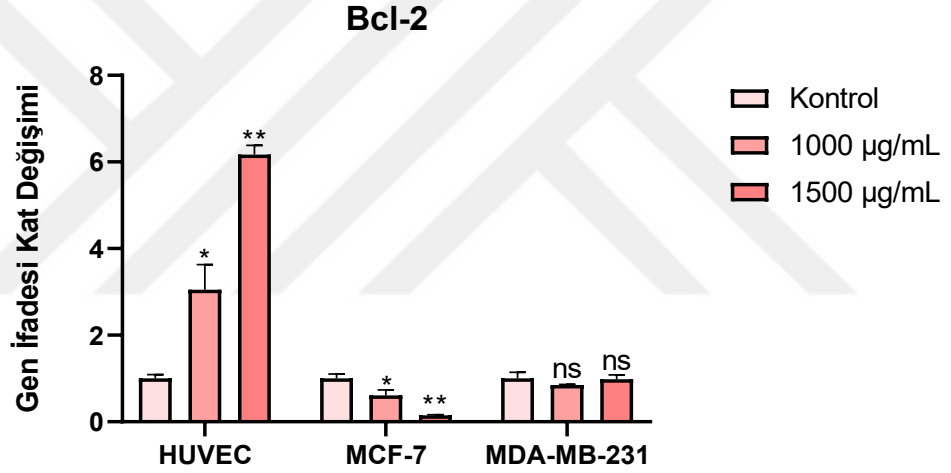
Şekil 4.20 MDA-MB-231 hücrelerindeki ROS miktarlarını gösteren akış sitometri diyagramları (a) PM uygulaması yapılmayan kontrol grubu, (b) 1000 µg/mL ve (c) 1500 µg/mL PM uygulaması yapılan test grupları



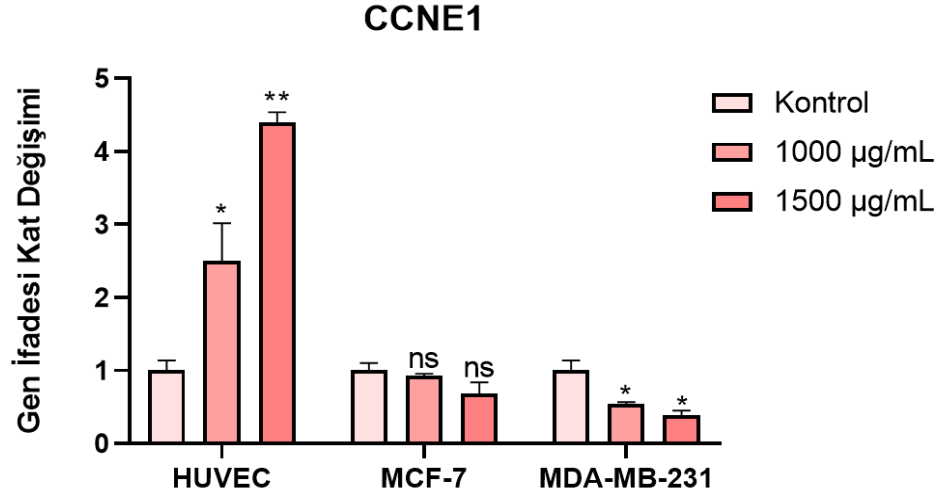
Şekil 4.21 PM'lerin ROS üretimine etkileri (%)
(ns: anlamlı değil; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$)

4.7 Gen İfadeleri Üzerindeki Etkileri

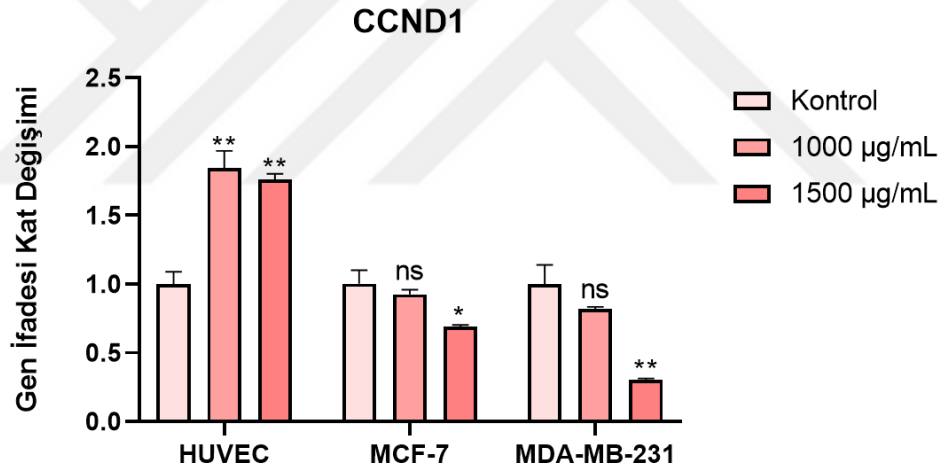
PM uygulaması sonucunda HUVEC, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin çeşitli gen ifade seviyeleri uygulama yapılmayan kontrol grupları ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Meme kanseri hücrelerinde anti-apoptotik *Bcl2* gen ifade seviyesinde (Şekil 4.22) ve hücre proliferasyonunu yönlendiren siklin *CCNE1* (Şekil 4.23) ve *CCND1* (Şekil 4.24) gen ifade seviyelerinde doza bağlı olarak azalma gözlemlenmiştir. MCF-7 hücrelerinde *kaspaz-3* gen ifadesinde doza bağlı olarak anlamlı bir artış gözlemlenirken, MDA-MB-231 hücrelerinde *kaspaz-3* gen ifadesinde bir artış gözlemlenmemiştir (Şekil 4.25).



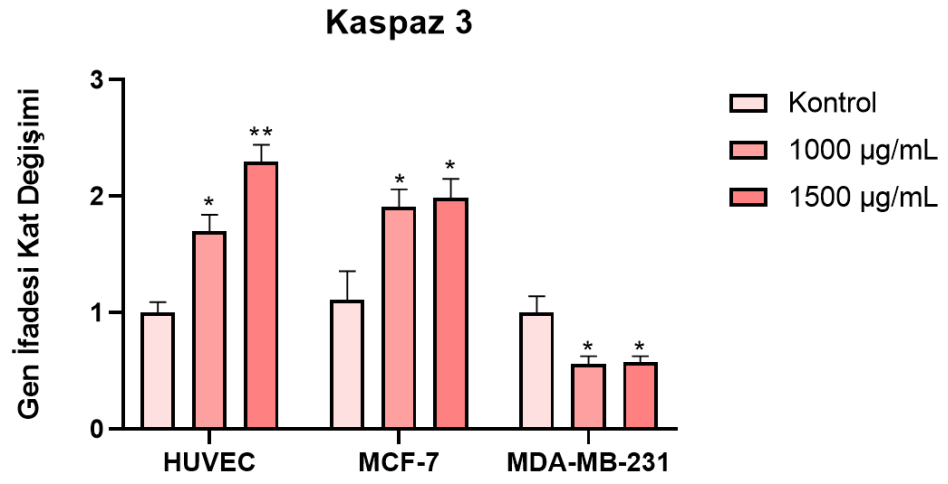
Şekil 4.22 PM uygulamasının hücrelerdeki *Bcl-2* gen ifadesi üzerine etkisi (ns: anlamlı değil; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$)



Şekil 4.23 PM uygulamasının hücrelerdeki *CCNE1* gen ifadesi üzerine etkisi (ns: anlamlı değil; *: $p<0.05$; **: $p<0.01$)



Şekil 4.24 PM uygulamasının hücrelerdeki *CCND1* gen ifadesi üzerine etkisi (ns: anlamlı değil; *: $p<0.05$; **: $p<0.01$)



Şekil 4.25 PM uygulamasının hücrelerdeki *Kaspaz3* gen ifadesi üzerine etkisi
(ns: anlamlı değil; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser tedavi edilmesi oldukça zor olan karmaşık bir hastalıktır (Dalkic vd. 2010). Özellikle kadınlar arasında sıklıkla tanısı konulan meme kanseri ise dünya çapında çok sayıda ölüme neden olmaktadır. Günümüzde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi gibi geleneksel tedaviler tehlikeli yan etkilerine rağmen halen meme kanseri tedavi sürecinde uygulanmaktadır. Günümüzde daha güvenli, doğal ve etkin bir alternatif yaklaşımın keşfi ise oldukça önemli kabul edilmektedir (Dasari vd. 2017, Khorrami vd. 2019). Mikrobiyota bileşimi ile meme kanseri arasında kurulan ilişkiler, bağırsak ve meme mikrobiyotasındaki disbiyozun meme karsinomunun başlatılmasında, gelişmesinde, ilerlemesinde ve metastazında anahtar bir role sahip olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, mikrobiyota modülasyonunu hedefleyerek terapötik etkiler sağlamak günümüzdeki yeni stratejiler arasında önem kazanmaktadır (Ciernikova vd. 2023).

Denge durumunda ve çeşitliliği fazla olan mikrobiyota konak sağlığına olumlu katkılar sunmaktadır (Zhu vd. 2021). Dolayısıyla bağırsak mikrobiyotasını hedeflemek, kanser tedavisinde hastanın durumunu iyileştirmek ve klinik faydalar sağlamak yeni bir stratejik yaklaşımı temsil etmektedir. Sağlıklı bir mikrobiyotada bulunan mikroorganizmalar tarafından üretilen postbiyotik mediatörlerin bağırsak mikrobiyotası bileşimini düzenlerken kanser hücreleri üzerinde apoptoz, anti-proliferatif ve anti-inflamatuvar yolları uyarma yoluyla anti-kanser etkiler sergilediği bilinmektedir. Postbiyotik mediatörlerin sergilediği anti-kanser etki, postbiyotik eldesi için seçilen probiyotik suşa, postbiyotiğin türüne/içeriğine ve kanserli hedef organın türüne göre değişiklik göstermektedir. Örneğin, geleneksel süt ürünlerinden izole edilen ve potansiyel olarak yeni bir probiyotik türü olarak *L. brevis* suşu tarafından salgılanan proteinlerin meme kanseri hücrelerinde *BAX*, *BCL-2* ve *BCL2L11* gen ifadelerinde değişikliklere neden olarak sitotoksik aktiviteyi ve apoptoz indüksiyonunu destekledikleri bildirilmektedir (Pourbaferani vd. 2021). Farklı bir postbiyotik kaynağı olarak deniz bakterisi olarak bilinen *Bacillus velezensis*'den elde edilen ekzopolisakkaritlerin meme kanseri hücrelerinde Kaspaz-3 aktivasyonunu ve sitokrom C seviyesinde artışı indüklemesi sonucunda apoptoza neden olduğu bilinmektedir (Mahgoub vd. 2018). Anti-kanser etkinliğe sahip postbiyotik mediatörlerin doğal ve güvenilir kaynaklı olması, uzun raf

ömrü, düşük hazırlama maliyeti ve düşük toksisitesi kanser tedavisindeki kullanılabilirliğini desteklemektedir. Ancak, postbiyotik takviyelerinin optimal dozunun ve uygulama sıklığını belirlemek oldukça önem taşımaktadır.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen *in vitro* analizler neticesinde elde edilen veriler, kansere dirençli kör köstebek faresi *Spalax* sp. bağırsak mikrobiyotasından izole edilen *Ligilactobacillus animalis* EIR/SpX-1 suşu kaynaklı postbiyotik mediatörlerin meme kanseri tedavisinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Sonuçlar, postbiyotik mediatörlerin meme kanseri hücrelerinde doza bağlı olarak hücre göçü ve koloni oluşum potansiyelini azaltırken sağlıklı hücrelerde anlamlı bir farklılık oluşturmadığını göstermektedir. Postbiyotik mediatör uygulaması sonucu apoptoz durumları incelendiğinde MCF-7 hücrelerinin % 30 (1000 µg/mL) ve % 39 (1500 µg/mL) apoptoza girdiği, MDA-MB-231 hücrelerinin ise % 22 (1000 µg/mL) ve % 23'ünün (1500 µg/mL) apoptoza girdiği gözlemlenmiştir. Sağlıklı hücrelerin ise kanser hücrelerine göre daha düşük oranlarda apoptoza girdiği tespit edilmiştir. Postbiyotik mediatör uygulaması sonrasında belirlenen ROS miktarları incelendiğinde MCF-7 hücrelerinde 1500 µg/mL PM uygulaması sonrasında, MDA-MB-231 hücrelerinde ise hem 1000 µg/mL hem de 1500 µg/mL PM uygulaması sonrasında gözlemlenen ROS üretimindeki artış meme kanseri hücrelerinde oksidatif stres kaynaklı hasarın meydana geldiğine işaret etmektedir. Gen ifadesi analizleri göz önünde bulundurulduğunda MCF-7 hücrelerinde apoptotik *kaspaz-3* gen ifadesinde artış, anti-apoptotik *Bcl-2* gen ifadesinde ise azalma olduğu tespit edilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde ise hücre proliferasyonunda önemli role sahip, hücre döngüsünün ilerlemesini sağlayan siklinlerin ifadesinde azalma olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, elde edilen bulgular göz önünde bulundurulduğunda kansere dirençli kör köstebek faresi *Spalax* sp. bağırsak mikrobiyotasından izole edilen *Ligilactobacillus animalis* EIR/SpX-1 suşu kaynaklı postbiyotik mediatörlerin meme kanseri hücreleri üzerinde seçici sitotoksikite sergilediği tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Adams, J.M. and Cory, S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324–1337.
- Albain, K., Anderson, S., Arriagada, R., Barlow, W., Bergh, J., Bliss, J., Buyse, M., Cameron, D., Carrasco, E., Clarke, M., Correa, C., Coates, A., Collins, R., Costantino, J., Cutter, D., Cuzick, J., Darby, S., Davidson, N., Davies, C. and Wood, W. 2012. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: Meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *The Lancet*, 379(9814), 432–444.
- Alizadehmohajer, N., Shojaeifar, S., Nedaeinia, R., Esparvarinha, M., Mohammadi, F., Ferns, G. A., Ghayour-Mobarhan, M., Manian, M. and Balouchi, A. 2020. Association between the microbiota and women's cancers – Cause or consequences?. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 127(3), 110203.
- American College of Surgeons. 2023. <https://www.facs.org/for-patients/home-skills-for-patients/breast-cancer-surgery/breast-cancer-types/breast-cancer-staging/>. Erişim Tarihi: 15.12.2023.
- An, B.C., Ryu, Y., Yoon, Y.S., Choi, O., Park, H.J., Kim, T.Y., Kim, S.I., Kim, B.K. and Chung, M. J. 2019. Colorectal cancer therapy using a *Pediococcus pentosaceus* SL4 drug delivery system secreting Lactic Acid Bacteria-derived protein p8. *Molecules and Cells*, 42(11), 755–762.
- Anderson, B.O., Ilbawi, A.M., Fidarova, E., Weiderpass, E., Stevens, L., Abdel-Wahab, M. and Mikkelsen, B. 2021. The global breast cancer initiative: A strategic collaboration to strengthen health care for non-communicable diseases. *The Lancet Oncology*, 22(5), 578–581.
- Anderson, B.O. and Jakesz, R. 2008. Breast cancer issues in developing countries: An overview of the breast health global initiative. *World Journal of Surgery*, 32(12), 2578–2585.
- Antoniou, A., Pharoah, P.D., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D. M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., Gronwald, J., Gorski, B., Tulinius, H., Thorlacius, S., Eerola, H., Nevanlinna, H., Syrjäkoski, K., Kallioniemi, O.P., Thompson, D., Evans, C., Peto, J., Lalloo, F., Evan D.G. and Easton, D. F. 2003. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies. *American Journal of Human Genetics*, 72(5), 1117–1130.
- Arruebo, M., Vilaboa, N., Sáez-Gutierrez, B., Lambea, J., Tres, A., Valladares, M. and González-Fernández, Á. 2011. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers*, 3(3), 3279–3330.

- Aslam, M.S., Naveed, S., Ahmed, A., Abbas, Z., Gull, I. and Athar, M.A. 2014. Side effects of chemotherapy in cancer patients and evaluation of patients opinion about starvation based differential chemotherapy. *Journal of Cancer Therapy*, 05(08), 817–822.
- Athanasίου, A., Tardivon, A., Ollivier, L., Thibault, F., El Khoury, C. and Neuenschwander, S. 2009. How to optimize breast ultrasound. *European Journal of Radiology*, 69(1), 6–13.
- Avand, A., Akbari, V. and Shafizadegan, S. 2018. In vitro cytotoxic activity of a lactococcus lactis antimicrobial peptide against breast cancer cells. *Iranian Journal of Biotechnology*, 16(3), e1867.
- Avivi, A., Shams, I., Joel, A., Lache, O., Levy, A.P. and Nevo, E. 2005. Increased blood vessel density provides the mole rat physiological tolerance to its hypoxic subterranean habitat. *The FASEB Journal*, 19(10), 1314–1316.
- Baek, M.K., Park, J.S., Park, J.H., Kim, M.H., Kim, H.D., Bae, W.K., Chung, I.J., Shin, B. A. and Jung, Y.D. 2010. Lithocholic acid upregulates uPAR and cell invasiveness via MAPK and AP-1 signaling in colon cancer cells. *Cancer Letters*, 290(1), 123-128.
- Bae, M.S., Moon, W.K., Chang, J.M., Koo, H.R., Kim, W.H., Cho, N., Yi, A., Yun, B. La, Lee, S.H., Kim, M.Y., Ryu, E.B. and Seo, M. 2014. Breast cancer detected with screening US: Reasons for nondetection at mammography. *Radiology*, 270(2), 369–377.
- Baindara, P., Gautam, A., Raghava, G. P. S. and Korpole, S. 2017. Anticancer properties of a defensin like class IId bacteriocin Laterosporulin10. *Scientific Reports*, 7, 1–9.
- Baker, J.M., Al-Nakkash, L. and Herbst-Kralovetz, M.M. 2017. Estrogen–gut microbiome axis: Physiological and clinical implications. *Maturitas*, 103(6), 45–53.
- Barrett, R.L. and Pure, E. 2020. Cancer-associated fibroblasts and their influence on tumor immunity and immunotherapy. *ELife*, 9, 1–20.
- Behrens, J. 1999. Cadherins and catenins: Role in signal transduction and tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 18(1), 15–30.
- Belcheva, A., Irrazabal, T., Robertson, S.J., Streutker, C., Maughan, H., Rubino, S., Moriyama, E.H., Copeland, J.K., Kumar, S., Green, B., Geddes, K., Pezo, R.C., Navarre, W.W., Milosevic, M., Wilson, B.C., Girardin, S.E., Wolever, T.M.S., Edelmann, W., Guttman, D.S. and Martin, A. 2014. Gut microbial metabolism drives transformation of msh2-deficient colon epithelial cells. *Cell*, 158(2), 288–299.
- Ben Ayed-Guerfali, D., Ben Kridis-Rejab, W., Ammous-Boukhris, N., Ayadi, W., Charfi, S., Khanfir, A., Sellami-Boudawara, T., Frikha, M., Daoud, J. and Mokdad-

- Gargouri, R. 2021. Novel and recurrent BRCA1/BRCA2 germline mutations in patients with breast/ovarian cancer: A series from the south of Tunisia. *Journal of Translational Medicine*, 19(1), 1–10.
- Berliere, M., Coche, M., Lacroix, C., Riggi, J., Coyette, M., Coulie, J., Galant, C., Fellah, L., Leconte, I., Maiter, D., Duhoux, F.P. and François, A. 2023. effects of hormones on breast development and breast cancer risk in transgender women. *Cancers*, 15(1), 1–15.
- Bernard, P.S., Parker, J.S., Mullins, M., Cheung, M.C.U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., Quackenbush, J.F., Stijleman, I.J., Palazzo, J., Matron, J.S., Nobel, A.B., Mardis, E., Nielsen, T.O., Ellis, M.J. and Perou, C.M. 2009. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, 27(8), 1160–1167.
- Bhatt, A.P., Redinbo, M.R. and Bultman, S.J. 2017. The role of the microbiome in cancer development and therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(4), 326–344.
- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G. and Moses, H.L. 2004. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432(7015), 332–337.
- Bigdeli, E., Motadel, M., Toloie Eshlaghy, A. and Radfar, R. 2020. A dynamic model of effective factors on Agile business–IT alignment. *Kybernetes*, 49(10), 2521–2546.
- Boleij, A., Hechenbleikner, E.M., Goodwin, A.C., Badani, R., Stein, E.M., Lazarev, M.G., Ellis, B., Carroll, K.C., Albesiano, E., Wick, E.C., Platz, E.A., Pardoll, D.M. and Sears, C. L. 2015. The *Bacteroides fragilis* Toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients. *Clinical infectious diseases*, 60(2), 208–215.
- Boonen, R.A.C.M., Wiegant, W.W., Celosse, N., Vrolijk, B., Heijl, S., Kote-Jara, Z., Mijuskovic, M., Cristea, S., Solleveld-Westerin, N., Van Wezel, T., Beerenwinkel, N., Eeles, R., Devilee, P., Vreeswijk, M.P.G., Marra, G. and Van Attikum, H. 2022. Functional analysis identifies damaging *chek2* missense variants associated with increased cancer risk. *Cancer Research*, 82(4), 615–631.
- Brewer, H.R., Jones, M.E., Schoemaker, M.J., Ashworth, A. and Swerdlow, A.J. 2017. Family history and risk of breast cancer: An analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Research and Treatment*, 165(1), 193–200.
- Brinton, L.A., Schairer, C., Hoover, R.N. and Fraumeni, J.F. 1988. Menstrual factors and risk of breast cancer. *Cancer Investigation*, 6(3), 245–254.
- Buachan, P., Chularojmontri, L. and Wattanapitayakul, S.K. 2014. Selected activities of *Citrus Maxima* merr. Fruits on human endothelial cells: Enhancing cell migration and delaying cellular aging. *Nutrients*, 6(4), 1618–1634.

- Bücker, L. and Lehmann, U. 2022. CDH1 (E-cadherin) Gene methylation in human breast cancer: critical appraisal of a long and twisted story. *Cancers*, 14(18), 1–15.
- Buranrat, B. and Boothia, S. 2019. Antiproliferative and antimigratory activities of bisphosphonates in human breast cancer cell line MCF-7. *Oncology Letters*, 18(2), 1246–1258.
- Burstein, H.J., Temin, S., Anderson, H., Buchholz, T.A., Davidson, N.E., Gelmon, K.E., Giordano, S.H., Hudis, C.A., Rowden, D., Solky, A.J., Stearns, V., Winer, E.P. and Griggs, J.J. 2014. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline focused update. *Journal of Clinical Oncology*, 32(21), 2255–2269.
- Carbognin, L., Miglietta, F., Paris, I. and Dieci, M.V. 2019. Prognostic and predictive implications of PTEN in breast cancer: Unfulfilled promises but intriguing perspectives. *Cancers*, 11(9), 1–18.
- Cavallaro, U. and Christofori, G. 2004. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(2), 118–132.
- Cenciarini, M.E. and Proietti, C.J. 2019. Molecular mechanisms underlying progesterone receptor action in breast cancer: Insights into cell proliferation and stem cell regulation. *Steroids*, 152(8), 108503.
- Chace, D. 2015. Turning off breast cancer: A Personalized approach to nutrition and detoxification in prevention and healing. Skyhorse Publishing, New York.
- Chaiwun, B. and Thorner, P. 2007. Fine needle aspiration for evaluation of breast masses. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 19(1), 48–55.
- Chen, J., Sun, J., Wang, Q., Du, Y., Cheng, J., Yi, J., Xie, B., Jin, S., Chen, G., Wang, L., Wang, X. and Wei, H. 2022. Systemic deficiency of pten accelerates breast cancer growth and metastasis. *Frontiers in Oncology*, 12(3), 1–12.
- Cheng, Y.J., Nie, X.Y., Ji, C.C., Lin, X.X., Liu, L.J., Chen, X.M., Yao, H. and Wu, S. H. 2017. Long-term cardiovascular risk after radiotherapy in women with breast cancer. *Journal of the American Heart Association*, 6(5).
- Chuah, L.O., Foo, H.L. and Loh, T.C. 2019. Postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* strains exert selective cytotoxicity effects on cancer cells. *BMC Complement Alternative Medicine*, 114.
- Cicatiello, L., Addeo, R., Sasso, A., Altucci, L., Petrizzi, V.B., Borgo, R., Cancemi, M., Caporali, S., Caristi, S., Scafoglio, C., Teti, D., Bresciani, F., Perillo, B. and Weisz, A. 2004. Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G 1 by inducing transcriptional derepression via c- Jun /c- Fos /estrogen receptor (Progesterone Receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cycli. *Molecular and Cellular Biology*, 24(16), 7260–7274.

- Ciernikova, S., Sevcikova, A., Drgona, L. and Mego, M. 2023. Modulating the gut microbiota by probiotics, prebiotics, postbiotics, and fecal microbiota transplantation: An emerging trend in cancer patient care. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1878(6), 188990.
- Clemente, J.C., Ursell, L.K., Parfrey, L.W. and Knight, R. 2012. The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell*, 148(6), 1258–1270.
- Cohain, J.S., Buxbaum, R.E. and Mankuta, D. 2017. Spontaneous first trimester miscarriage rates per woman among parous women with 1 or more pregnancies of 24 weeks or more. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 17(1), 1–7.
- Coley, H. M. 2008. Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 34(4), 378–390.
- Cooper, G.M. 2000. *The Cell : A Molecular Approach*. 2nd ed. ASM Press, Washington.
- Cordeiro, M. 2014. Current and emerging concepts in neuroprotection. *Acta Ophthalmologica*, 92(s253), 0–0.
- Cunha, R., Nejo, P., Bento, S. and Vaz, F. 2021. ATM germline variants and male breast cancer. *BMJ Case Reports*, 14(1), e238100.
- Dalkic, E., Wang, X., Wright, N. and Chan, C. 2010. Cancer-drug associations: a complex system. *PloS one*, 5(4), e10031.
- Dall, G.V. and Britt, K.L. 2017. Estrogen effects on the mammary gland in early and late life and breast cancer risk. *Frontiers in Oncology*, 7(5), 1–10.
- Done, S. 2011. In breast cancer-recent advances in biology, imaging and therapeutics. IntechOpen Limited, 5 Princes Gate Court, London, SW7 2QJ, United Kingdom.
- Danø, K., Behrendt, N., Høyer-Hansen, G., Johnsen, M., Lund, L.R., Ploug, M. and Rømer, J. 2005. Plasminogen activation and cancer. *Thrombosis and Haemostasis*, 93(4), 676–681.
- Dasari, S., Kathera, C., Janardhan, A., Praveen Kumar, A. and Viswanath, B. 2017. Surfacing role of probiotics in cancer prophylaxis and therapy: A systematic review. *Clinical Nutrition*, 36(6), 1465–1472.
- Davies, M.A. and Samuels, Y. 2010. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*, 29(41), 5545–5555.
- Dekaboruah, E., Suryavanshi, M.V., Chettri, D. and Verma, A.K. 2020. Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role. *Archives of Microbiology*, 202(8), 2147–2167.

- Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C. and Barton, M. 2005. The role of radiotherapy in cancer treatment: Estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer*, 104(6), 1129–1137.
- De Moreno de LeBlanc, A., Matar, C., Farnworth, E and Perdigon, G. 2006. Study of cytokines involved in the prevention of a murine experimental breast cancer by kefir. *Cytokine*, 34(1), 1–8.
- Denizot, F. and Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271-277.
- DeVita, V.T. and Chu, E. 2008. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research*, 68(21), 8643–8653.
- Dhankhar, R., Vyas, S.P., Jain, A.K., Arora, S., Rath, G. and Goyal, A. K. 2010. Advances in novel drug delivery strategies for breast cancer therapy. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 38(5), 230–249.
- Dormand, E.L., Banwell, P.E. and Goodacre, T.E. 2005. Radiotherapy and wound healing. *International Wound Journal*, 2(2), 112–127.
- Duffy, M.J., Harbeck, N., Nap, M., Molina, R., Nicolini, A., Senkus, E. and Cardoso, F. 2017. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *European Journal of Cancer*, 75, 284–298.
- Dulal, S. and Keku, T. O. 2014. Gut microbiome and colorectal adenomas. *Cancer Journal*, 20(3), 225–231.
- Ediriweera, M.K., Tennekoon, K.H. and Samarakoon, S.R. 2019. Emerging role of histone deacetylase inhibitors as anti-breast-cancer agents. *Drug Discovery Today*, 24(3), 685–702.
- Egeblad, M. and Werb, Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 161–174.
- El-Deeb, B., Al-Talhi, A., Mostafa, N. and Abou-assy, R. 2018. Biological Synthesis and Structural characterization of selenium nanoparticles and assessment of their antimicrobial properties. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences*, 45(1), 135–170.
- Erdoğan, B., Ao, M., White, L.M., Means, A.L., Brewer, B.M., Yang, L., Washington, M. K., Shi, C., Franco, O.E., Weaver, A.M., Hayward, S.W., Li, D. and Webb, D.J. 2017. Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin. *The Journal of Cell Biology*, 216(11), 3799–3816.

- Eslami S.Z., Majidzadeh, A.K., Halvaei, S., Babapirali, F. and Esmaeili, R. 2020. Microbiome and breast cancer: New role for an ancient population. *Frontiers in Oncology*, 10, 120.
- Faith, J.J., Guruge, J.L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A.L., Clemente, J.C., Knight, R., Heath, A.C., Leibel, R.L., Rosenbaum, M. and Gordon, J.I. 2013. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*, 341(6141), 1237439.
- Fang, X., Nevo, E., Han, L., Levanon, E.Y., Zhao, J., Avivi, A., Larkin, D., Jiang, X., Feranchuk, S., Zhu, Y., Fishman, A., Feng, Y., Sher, N., Xiong, Z., Hankeln, T., Huang, Z., Gorbunova, V., Zhang, L., Zhao, W. and Wang, J. 2014. Genome-wide adaptive complexes to underground stresses in blind mole rats *Spalax*. *Nature Communications*, 5, 3966.
- Farhat, M.H., El-Saghir, N.S. and Shamseddine, A.I. 2009. Modified resistance to chemotherapy and trastuzumab by bevacizumab in locally recurrent breast cancer. *Breast*, 18(1), 66–68.
- Fatemi, M., Ghandhari, F. and Karimi, N. 2019. Effects of the Cell Debris and Supernatant of *Saccharomyces boulardii* on 7,12-Dimethylbenz(a) Anthracene-Induced Breast Cancer in Rats. *Journal of Kermanshah University of Medical Sciences*, 23(3).
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppapapati, A., Luu, H.H., Haydon, R.C., He, T.C. and Ren, G. 2018. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes and Diseases*, 5(2), 77–106.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A. and Bray, F. 2019. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer*, 144(8), 1941–1953.
- Fernández, M.F., Reina-Pérez, I., Astorga, J.M., Rodríguez-Carrillo, A., Plaza-Díaz, J. and Fontana, L. 2018. Breast cancer and its relationship with the microbiota. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(8), 1–20.
- Fomby, P. and Cherlin, A. J. 2011. Role of microbiota in immunity and inflammation. *National Institute of Health*, 72(2), 181–204.
- Foulkes, W.D., Smith, I.E. and Reis-Filho, J.S. 2010. Triple-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 363(20), 1938–1948.
- Francescone, R., Hou, V. and Grivennikov, S. I. 2014. Microbiome, inflammation, and cancer. *Cancer Journal*, 20(3), 181–189.

- Franken, N.A.P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J. and van Bree, C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319.
- Fuentes, N. and Silveyra, P. 2019. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 116, 135–170.
- Gagnière, J., Raisch, J., Veziat, J., Barnich, N., Bonnet, R., Buc, E., Bringer, M.A., Pezet, D. and Bonnet, M. 2016. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(2), 501–518.
- Gajewski, T.F., Schreiber, H. and Fu, Y.X. 2013. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology*, 14(10), 1014–1022.
- Garrett, W.S. 2015. Cancer and the microbiota. *Science*, 348(6230), 80–86.
- Gest, C., Joimel, U., Huang, L., Pritchard, L.L., Petit, A., Dulong, C., Buquet, C., Hu, C. Q., Mirshahi, P., Laurent, M., Fauvel-Lafève, F., Cazin, L., Vannier, J.P., Lu, H., Soria, J., Li, H., Varin, R. and Soria, C. 2013. Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC cancer*, 13, 63.
- Gewirtz, D.A. 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57(7), 727–741.
- Ghoneum, M. and Gollapudi, S. 2004. Induction of apoptosis in breast cancer cells by *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, in vitro. *Anticancer Research*, 24(3A), 1455–1463.
- Ghoneum, M., Matsuura, M., Braga, M. and Gollapudi, S. 2008. *S. cerevisiae* induces apoptosis in human metastatic breast cancer cells by altering intracellular Ca²⁺ and the ratio of Bax and Bcl-2. *International Journal of Oncology*, 33(3), 533–539.
- Giles, R.H., Van Es, J.H. and Clevers, H. 2003. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1653(1), 1–24.
- GLOBOCAN. 2020. <https://gco.iarc.fr/>. Erişim tarihi: 16.12.2023.
- Gnerlich, J.L., Deshpande, A.D., Jeffe, D.B., Seelam, S., Kimbuende, E. and Margenthaler, J. A. 2011. Poorer survival outcomes for male breast cancer compared with female breast cancer may be attributable to in-stage migration. *Annals of Surgical Oncology*, 18(7), 1837–1844.
- Greville-Heygate, S.L., Maishman, T., Tapper, W.J., Cutress, R.I., Copson, E., Dunning, A. M., Haywood, L., Jones, L.J. and Eccles, D.M. 2020. Pathogenic variants in CHEK2 are associated with an adverse prognosis in symptomatic early-onset breast cancer. *JCO Precision Oncology*, 4, 472–485.

- Group, C., Factors, H. and Cancer, B. 1997. Erratum. Breast cancer and hormone replacement therapy: Collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet*, 350(9089), 1484.
- Guzy, R.D. and Schumacker, P.. 2006. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: The paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Experimental Physiology*, 91(5), 807–819.
- Hamada, F. 2009. Wnt signaling and cancer. *Journal of Anatomy*, 84(4), 111–112.
- Hamajima, N., Hirose, K., Tajima, K., Rohan, T., Calle, E.E., Heath, C.W., Coates, R.J., Liff, J.M., Talamini, R., Chantarakul, N., Koetsawang, S., Rachawat, D., Morabia, A., Schuman, L., Stewart, W., Szklo, M., Bain, C., Schofield, F., Siskind, V. and Van Leeuwen, M. 2002. Alcohol, tobacco and breast cancer - Collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58 515 women with breast cancer and 95 067 women without the disease. *British Journal of Cancer*, 87(11), 1234–1245.
- Hamajima, N., Hirose, K., Tajima, K., Rohan, T., Friedenreich, C.M., Calle, E.E., Gapstur, S.M., Patel, A.V., Coates, R.J., Liff, J.M., Talamini, R., Chantarakul, N., Koetsawang, S., Rachawat, D., Marcou, Y., Kakouri, E., Duffy, S.W., Morabia, A., Schuman, L. and Fukao, A. 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.
- Hanahan, D. 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46.
- Hanahan, D. and Folkman, J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353–364.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- Harbeck, N., Kates, R.E., Schmitt, M., Gauger, K., Kiechle, M., Jänicke, F., Thomssen, C., Look, M.P. and Foekens, J.A. 2004. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 predict disease outcome and therapy response in primary breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 5(5), 348–352.
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J. and Cardoso, F. 2019. Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 1-31.
- Harris, L.N., Ismaila, N., McShane, L.M., Andre, F., Collyar, D.E., Gonzalez-Angulo, A.M., Hammond, E.H., Kuderer, N.M., Liu, M.C., Mennel, R.G., Van Poznak, C., Bast, R. C. and Hayes, D.F. 2016. Use of biomarkers to guide decisions on

adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of clinical Oncology clinical practice guideline. *Journal of Clinical Oncology*, 34(10), 1134–1150.

Hassan, G. and Seno, M. 2020. Blood and Cancer: Cancer Stem Cells as Origin of Hematopoietic Cells in Solid Tumor Microenvironments. *Cells*, 9(5).

Ha, Y.H. and Park, D.G. 2010. Effects of DCA on cell cycle proteins in colonocytes. *Journal of the Korean Society of Coloproctology*, 26(4), 254–259.

Heer, E., Harper, A., Escandor, N., Sung, H., McCormack, V. and Fidler-Benaoudia, M.M. 2020. Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study. *The Lancet Global Health*, 8(8), e1027–e1037.

Heim, E., Valach, L. and Schaffner, L. 1997. Coping and psychosocial adaptation: Longitudinal effects over time and stages in breast cancer. *Psychosomatic Medicine*, 59(4), 408–418.

Hejmadi, M. 2013. Introduction to cancer biology. Ventus Publishing, Denmark.

Hernandez-Aya, L.F. and Hortobagyi, G.N. 2010. The role of taxanes in the adjuvant treatment of breast cancer. *Breast Diseases*, 21(4), 305–308.

Hewitt, S.C., Couse, J.F. and Korach, K.S. 2000. Estrogen receptor knockout mice: What their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action. *Breast Cancer Research*, 2(5), 345–352.

Hieken, T.J., Chen, J., Hoskin, T.L., Walther-Antonio, M., Johnson, S., Ramaker, S., Xiao, J., Radisky, D.C., Knutson, K.L., Kalari, K.R., Yao, J.Z., Baddour, L.M., Chia, N. and Degnim, A.C. 2016. The microbiome of aseptically collected human breast tissue in benign and malignant disease. *Scientific Reports*, 6(6), 1–10.

Hilton, H.N., Clarke, C.L. and Graham, J.D. 2018. Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 466, 2–14.

Homayouni Rad, A., Aghebati Maleki, L., Samadi Kafil, H. and Abbasi, A. 2021. Postbiotics: A novel strategy in food allergy treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(3), 492–499.

Horn, J.L.V. 2017. Risk factors for breast cancer--a historical perspective. *International Journal of Women's Health*, 265–272.

Hosseini, S.S., Goudarzi, H., Ghalavand, Z., Hajikhani, B., Rafeieiatani, Z. and Hakemi-Vala, M. 2020. Anti-proliferative effects of cell wall, cytoplasmic extract of *Lactococcus lactis* and nisin through down-regulation of cyclin d1 on sw480 colorectal cancer cell line. *Iranian Journal of Microbiology*, 12(5), 424–430.

- Howe, L.R. and Brown, A.M.C. 2004. Wht signaling and breast cancer. *Cancer Biology and Therapy*, 3(1), 36–41.
- Huang, Z., Wu, T., Liu, A.Y. and Ouyang, G. 2015. Differentiation and transdifferentiation potentials of cancer stem cells. *Oncotarget*, 6(37), 39550–39563.
- Huebner, R.J. and Ewald, A.J. 2014. Cellular foundations of mammary tubulogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 31, 124–131.
- Hunter, K.W., Crawford, N.P.S. and Alsarraj, J. 2008. Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Research*, 10(1), 1–10.
- Hunter, T. 2007. The age of crosstalk: Phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Molecular Cell*, 28(5), 730–738.
- Huse, S.M., Dethlefsen, L., Huber, J.A., Welch, D.M., Relman, D.A. and Sogin, M.L. 2008. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genetics*, 4(11).
- Ingthorsson, S., Traustadottir, G.A. and Gudjonsson, T. 2022. Cellular Plasticity and Heterotypic Interactions during Breast Morphogenesis and Cancer Initiation. *Cancers*, 14(21), 1–11.
- Inman, J.L., Robertson, C., Mott, J.D. and Bissell, M.J. 2015. Mammary gland development: Cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development*, 142(6), 1028–1042.
- Jacquillat C. 1989. Clinical trials. *Cancer*, 33(3), 1–2.
- Jain, R.K. 2005. Normalization of tumor vasculature: An emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 307(5706), 58–62.
- Jakobsson, H.E., Jernberg, C., Andersson, A.F., Sjölund-Karlsson, M., Jansson, J.K. and Engstrand, L. 2010. Short-term antibiotic treatment has differing long- term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS ONE*, 5(3).
- Jiang, B.H. and Liu, L.Z. 2009. Chapter 2 PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Advances in Cancer Research*, 102(09), 19–65.
- Jung, S., Wang, M., Anderson, K., Baglietto, L., Bergkvist, L., Bernstein, L., van den Brandt, P.A., Brinton, L., Buring, J.E., Heather Eliassen, A., Falk, R., Gapstur, S.M., Giles, G.G., Goodman, G., Hoffman-Bolton, J., Horn-Ross, P.L., Inoue, M., Kolonel, L.N., Krogh, V. and Smith-Warner, S.A. 2016. Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: In a pooled analysis of 20 studies. *International Journal of Epidemiology*, 45(3), 916–928.
- Kaji, R., Kiyoshima-Shibata, J., Nagaoka, M., Nanno, M. and Shida, K. 2010. Bacterial teichoic acids reverse predominant IL-12 production induced by certain

- lactobacillus strains into predominant IL-10 production via TLR2-dependent ERK activation in macrophages. *Journal of Immunology*, 184(7), 3505–3513.
- Kang, S.S., Sim, J.R., Yun, C.H. and Han, S.H. 2016. Lipoteichoic acids as a major virulence factor causing inflammatory responses via Toll-like receptor 2. *Archives of pharmacal research*, 39(11), 1519–1529.
- Kerlikowske, K., Hubbard, R.A., Miglioretti, D.L., Geller, B.M., Yankaskas, B.C., Lehman, C.D., Taplin, S.H. and Sickles, E.A. 2011. Comparative effectiveness of digital versus film-screen mammography in community practice in the United States: A cohort study. *Annals of Internal Medicine*, 155(8), 493–502.
- Khan, U. and Khan, M.S. 2021. Prognostic value estimation of BRIP1 in breast cancer by exploiting transcriptomics data through bioinformatics approaches. *Bioinformatics and Biology Insights*, 15, 1–14.
- Khorrami, S., Abdollahi, Z., Eshaghi, G., Khosravi, A., Bidram, E. and Zarrabi, A. 2019. An improved method for fabrication of Ag-GO nanocomposite with controlled anti-cancer and anti-bacterial behavior; a comparative study. *Scientific Reports*, 9(1), 9167.
- Kilkinen, A., Rissanen, H., Klaukka, T., Pukkala, E., Heliövaara, M., Huovinen, P., Männistö, S., Aromaa, A. and Knekt, P. 2008. Antibiotic use predicts an increased risk of cancer. *International Journal of Cancer*, 123(9), 2152–2155.
- Kim, E.Y., Chang, Y., Ahn, J., Yun, J.S., Park, Y.L., Park, C.H., Shin, H. and Ryu, S. 2020. Mammographic breast density, its changes, and breast cancer risk in premenopausal and postmenopausal women. *Cancer*, 126(21), 4687–4696.
- Kim, S.J., Kim, G.H. and Cho, H. 2021. Postbiotics for cancer prevention and treatment. *Korean Journal of Microbiology*, 57(3), 142–153.
- Kim, Y., Oh, S., Yun, H. S., Oh, S. and Kim, S. H. 2010. Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells. *Letters in Applied Microbiology*, 51(2), 123–130.
- Klaas, E., Sung, E., Azizi, E., Martinez, M., Barpujari, A., Roberts, J. and Lucke-Wold, B. 2023. Advanced breast cancer metastasized in the brain: treatment standards and innovations. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 9.
- Kleiblova, P., Stolarova, L., Krizova, K., Lhota, F., Hojny, J., Zemankova, P., Havranek, O., Vocka, M., Cerna, M., Lhotova, K., Borecka, M., Janatova, M., Soukupova, J., Sevcik, J., Zimovjanova, M., Kotlas, J., Panczak, A., Vesela, K., Cervenková, J. and Kleibl, Z. 2019. Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer. *International Journal of Cancer*, 145(7), 1782–1797.
- Kohno, T. and Yokota, J. 1999. How many tumor suppressor genes are involved in human lung carcinogenesis? *Carcinogenesis*, 20(8), 1403–1410.

- Kovács, T., Mikó, E., Vida, A., Sebő, É., Toth, J., Csonka, T., Boratkó, A., Ujlaki, G., Lente, G., Kovács, P., Tóth, D., Árkosy, P., Kiss, B., Méhes, G., Goedert, J.J. and Bai, P. 2019. Cadaverine, a metabolite of the microbiome, reduces breast cancer aggressiveness through trace amino acid receptors. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14.
- Kuchenbaecker, K.B., Hopper, J.L., Barnes, D.R., Phillips, K.A., Mooij, T.M., Roos-Blom, M.J., Jervis, S., Van Leeuwen, F.E., Milne, R.L., Andrieu, N., Goldgar, D.E., Terry, M.B., Rookus, M.A., Easton, D.F. and Antoniou, A.C. 2017. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Journal of the American Medical Association*, 317(23), 2402–2416.
- Kuczynski, E.A., Vermeulen, P.B., Pezzella, F., Kerbel, R.S. and Reynolds, A.R. 2019. Vessel co-option in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(8), 469–493.
- Kulsum, S., Raju, N., Raghavan, N., Ramanjanappa, R.D.R., Sharma, A., Mehta, A., Kuriakose, M.A. and Suresh, A. 2019. Cancer stem cells and fibroblast niche cross talk in an in-vitro oral dysplasia model. *Molecular Carcinogenesis*, 58(5), 820–831.
- Kuroki-Suzuki, S., Kuroki, Y., Nasu, K., Nawano, S., Moriyama, N. and Okazaki, M. 2007. Detecting breast cancer with non-contrast MR imaging: Combining diffusion-weighted and STIR imaging. *Magnetic Resonance in Medical Sciences*, 6(1), 21–27.
- Kvakova, M., Kamlarova, A., Stofilova, J., Benetinova, V. and Bertkova, I. 2022. Probiotics and postbiotics in colorectal cancer: Prevention and complementary therapy. *World journal of gastroenterology*, 28(27), 3370–3382.
- Lee, K.H., Kim, E.Y., Yun, J.S., Park, Y.L., Do, S.I., Chae, S.W. and Park, C.H. 2018. The prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes and hematologic parameters in patients with breast cancer. *BMC Cancer*, 18(1), 1–9.
- Le Grange, D., Doyle, P., Crosby, R.D. and Chen, E. 2008. Early response to treatment in adolescent bulimia nervosa. *The International journal of eating disorders*, 41(8), 755–757.
- Leite De Oliveira, R., Hamm, A. and Mazzone, M. 2011. Growing tumor vessels: More than one way to skin a cat - Implications for angiogenesis targeted cancer therapies. *Molecular Aspects of Medicine*, 32(2), 71–87.
- Li, D.M. and Feng, Y.M. 2011. Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: Potential therapeutic targets. *Breast Cancer Research and Treatment*, 128(1), 7–21.

- Liang, C.C., Park, A.Y. and Guan, J.L. 2007. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2), 329–333.
- Libow, L.S. and Neufeld, R.R. 2008. The autopsy and the elderly patient in the hospital and the nursing home: Enhancing the quality of life. *Geriatrics*, 63(12), 307–317.
- Lin, E.Y. and Pollard, J.W. 2007. Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Research*, 67(11), 5064–5066.
- Lin, Y., Xu, J. and Lan, H. 2019. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: Biological roles and clinical therapeutic applications. *Journal of Hematology and Oncology*, 12(1), 1–16.
- Lundberg, A.S. and Weinberg, R.A. 1999. Control of the cell cycle and apoptosis. *European Journal of Cancer*, 35(14), 1886–1894.
- Macdonald, D.W. and Norris, S. 2001. *The Encyclopedia of Mammals*. 1st ed. Facts on File (J). Oxford University Press, New York.
- Macias, H. and Hinck, L. 2012. Mammary gland development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(4), 533–557.
- Mackey, J.B.G., Coffelt, S.B. and Carlin, L.M. 2019. Neutrophil maturity in cancer. *Frontiers in Immunology*, 10(8), 1–11.
- Mahgoub, A.M., Mahmoud, M.G., Selim, M.S. and EL Awady, M.E. 2018. Exopolysaccharide from marine *Bacillus velezensis* MHM3 induces apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells through a mitochondrial pathway. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 19(7), 1957–1963.
- Malik, A., Domankevich, V., Han, L., Fang, X., Korol, A., Avivi, A. and Shams, I. 2016. Genome maintenance and bioenergetics of the long-lived hypoxia-tolerant and cancer-resistant blind mole rat, *Spalax*: A cross-species analysis of brain transcriptome. *Scientific Reports*, 6(9), 1–14.
- Malik, A., Korol, A., Hübner, S., Hernandez, A.G., Thimmapuram, J., Ali, S., Glaser, F., Paz, A., Avivi, A. and Band, M. 2011. Transcriptome sequencing of the blind subterranean mole rat, *Spalax galili*: Utility and potential for the discovery of novel evolutionary patterns. *PLoS ONE*, 6(8).
- Malik, A., Korol, A., Weber, M., Hankeln, T., Avivi, A. and Band, M. 2012. Transcriptome analysis of the *Spalax* hypoxia survival response includes suppression of apoptosis and tight control of angiogenesis. *BMC Genomics*, 13(1).
- McKenna, N.J., Lanz, R.B. and O'Malley, B.W. 1999. Nuclear receptor coregulators: Cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews*, 20(3), 321–344.

- McSherry, E.A., Donatello, S., Hopkins, A.M. and McDonnell, S. 2007. Molecular basis of invasion in breast cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(24), 3201–3218.
- Mego, M., Mani, S.A. and Cristofanilli, M. 2010. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7(12), 693–701.
- Meirson, T., Gil-Henn, H. and Samson, A.O. 2020. Invasion and metastasis: the elusive hallmark of cancer. *Oncogene*, 39(9), 2024–2026.
- Menon, S.S., Guruvayoorappan, C., Sakthivel, K.M. and Rasmi, R.R. 2019. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clinica Chimica Acta*, 491(11), 39–45.
- Mikó, E., Kovács, T., Sebő, É., Tóth, J., Csonka, T., Ujlaki, G., Sipos, A., Szabó, J., Méhes, G. and Bai, P. 2019. Microbiome—microbial metabolome—cancer cell interactions in breast cancer—familiar, but unexplored. *Cells*, 8(4), 1–33.
- Mills, J. N., Rutkovsky, A.C. and Giordano, A. 2018. Mechanisms of resistance in estrogen receptor positive breast cancer: overcoming resistance to tamoxifen/aromatase inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*, 41, 59–65.
- Moar, K., Pant, A., Saini, V. and Maurya, P.K. 2023. Potential biomarkers in endometrial cancer: a narrative review. *Biomarkers*, 28(4), 358–371.
- Moos, A., Hepp, H. H., Kaul, S., Ahlert, T., Basiert, G. and Wallwiener, D. 1998. Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. *International Journal of Cancer*, 79(1), 8–12.
- Moos, P.J. and Fitzpatrick, F. A. 1998. Taxanes propagate apoptosis via two cell populations with distinctive cytological and molecular traits. *Cell growth and differentiation: The molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 9(8), 687–697.
- Moran, M.S., Schnitt, S.J., Giuliano, A.E., Harris, J.R., Khan, S.A., Horton, J., Klimberg, S., Chavez-MacGregor, M., Freedman, G., Houssami, N., Johnson, P.L. and Morrow, M. 2014. Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 88(3), 553–564.
- Mørch, L.S., Skovlund, C.W., Hannaford, P.C., Iversen, L., Fielding, S. and Lidegaard, Ø. 2017. Contemporary hormonal contraception and the risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 377(23), 2228–2239.
- Moslemi, M., Moradi, Y., Dehghanbanadaki, H., Afkhami, H., Khaledi, M., Sedighimehr, N., Fathi, J. and Sohrabi, E. 2021. The association between ATM variants and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, 21(1).

- Mowat, A.M. and Agace, W.W. 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14(10), 667–685.
- Moyer, C.L., Ivanovich, J., Gillespie, J.L., Doberstein, R., Radke, M.R., Richardson, M.E., Kaufmann, S.H., Swisher, E.M. and Goodfellow, P. J. 2020. Rare BRIP1 missense alleles confer risk for ovarian and breast cancer. *Cancer Research*, 80(4), 857–867.
- Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., Barrera, J.L., Mohar, A., Verástegui, E. and Zlotnik, A. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410(6824), 50–56.
- Nair, N., Calle, A.S., Zahra, M.H., Prieto-Vila, M., Oo, A.K.K., Hurley, L., Vaidyanath, A., Seno, A., Masuda, J., Iwasaki, Y., Tanaka, H., Kasai, T. and Seno, M. 2017. A cancer stem cell model as the point of origin of cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13.
- Nakkarach, A., Foo, H.L., Song, A.A.L., Mutalib, N.E.A., Nitisinprasert, S. and Withayagiat, U. 2021. Anti-cancer and anti-inflammatory effects elicited by short chain fatty acids produced by *Escherichia coli* isolated from healthy human gut microbiota. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 1–17.
- Nasser, N. J., Avivi, A., Shafat, I., Edovitsky, E., Zcharia, E., Ilan, N., Vlodavsky, I. and Nevo, E. 2009. Alternatively spliced Spalax heparanase inhibits extracellular matrix degradation, tumor growth, and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7), 2253–2258.
- Nazari, F., Jafari, P., Nomanpour, B., Varmira, K. and Raissi, F. 2022 Inhibitory effects of postbiotic consisting sonication-killed *Bifidobacterium bifidum* on experimental triple negative breast neoplasm in mice: a preliminary study. *Iranian Journal of Microbiology*, 14(5):689-697.
- N'Da, D.D., Breytenbach, J.C., Smith, P.J. and Lategan, C. 2010. Synthesis, cytotoxicity and antimalarial activity of ferrocenyl amides of 4-aminoquinolines. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 60(10), 627–635.
- Neal, L., Sandhu, N.P., Hieken, T.J., Glazebrook, K.N., Bride, M.B. Mac, Dilaveri, C.A., Wahner-Roedler, D.L., Ghosh, K. and Visscher, D. W. 2014. Diagnosis and management of benign, atypical, and indeterminate breast lesions detected on core needle biopsy. *Mayo Clinic Proceedings*, 89(4), 536–547.
- Nejman, D., Livyatan, I., Fuks, G., Gavert, N., Zwang, Y., Geller, L.T., Rotter-Maskowitz, A., Weiser, R., Mallel, G., Gigi, E., Meltser, A., Douglas, G.M., Kamer, I., Gopalakrishnan, V., Dadosh, T., Levin-Zaidman, S., Avnet, S., Atlan, T., Cooper, Z. A., Arora, R. and Straussman, R. 2020. The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science*. 368(6494), 973-980.

- Nepomuceno, T.C., De Gregoriis, G., de Oliveira, F.M.B., Suarez-Kurtz, G., Monteiro, A. N. and Carvalho, M.A. 2017. The role of PALB2 in the DNA damage response and cancer predisposition. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1–20.
- Neuman, H.B., Morrogh, M., Gonen, M., Van Zee, K.J., Morrow, M. and King, T.A. 2010. Stage IV breast cancer in the era of targeted therapy. *Cancer*, 116, 1226–1233.
- Neves Rebello Alves, L., Dummer Meira, D., Poppe Meriguetti, L., Correia Casotti, M., do Prado Ventorim, D., Ferreira Figueiredo Almeida, J., Pereira de Sousa, V., Cindra Sant’Ana, M., Gonçalves Coutinho da Cruz, R., Santos Louro, L., Mendonça Santana, G., Erik Santos Louro, T., Evangelista Salazar, R., Ribeiro Campos da Silva, D., Stefani Siqueira Zetum, A., Silva dos Reis Trabach, R., Imbroisi Valle Errera, F., de Paula, F., de Vargas Wolfgramm dos Santos, E. and Drumond Louro, I. 2023. Biomarkers in breast cancer: An old story with a new end. *Genes*, 14(7).
- Nevo, E., Ivanitskaya, E. and Beiles, A. 2001. Adaptive Radiation of Blind Subterranean Mole Rats. Backhuys Publishers. Leiden.
- Nevo, E., Ivanitskaya, E., Filippucci, M.G. and Beiles, A. 2000. Speciation and adaptive radiation of subterranean mole rats, *Spalax ehrenbergi* superspecies, in Jordan. *Biological Journal of the Linnean Society*, 69(2), 263–281.
- Ngambenjawong, C., Gustafson, H.H. and Pun, S.H. 2017. Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics. *Advanced drug delivery reviews*, 114, 206–221.
- Nicolini, A., Ferrari, P. and Duffy, M.J. 2018. Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future. *Seminars in Cancer Biology*, 52(8), 56–73.
- Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., Martincorena, I., Alexandrov, L.B., Martin, S., Wedge, D.C., Van Loo, P., Ju, Y.S., Smid, M., Brinkman, A.B., Morganella, S., Aure, M.R., Lingjærde, O.C., Langerød, A., Ringnér, M. and Stratton, M.R. 2016. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*, 534(7605), 47–54.
- Normanno, N., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Luca, A. and Caponigro, F. 2005. The ErbB Receptors and their Ligands in Cancer: An Overview. 243–257.
- Nounou, M.I., Elamrawy, F., Ahmed, N., Abdelraouf, K., Goda, S. and Syed-Sha-Qhattal, H. 2015. Breast cancer: Conventional diagnosis and treatment modalities and recent patents and technologies supplementary issue: Targeted therapies in breast cancer treatment. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 9, 17–34.

- O'Connor, H., MacSharry, J., Bueso, Y.F., Lindsay, S., Kavanagh, E.L., Tangney, M., Clyne, M., Saldo, R. and McCann, A. 2018. Resident bacteria in breast cancer tissue: pathogenic agents or harmless commensals? *Discovery Medicine*, 26(142), 93–102.
- O'Connor, M., Rhodes, D. and Hruska, C. 2009. Molecular breast imaging. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 9(8), 1073–1080.
- O'Reilly, K.E., Rojo, F., She, Q.B., Solit, D., Mills, G.B., Smith, D., Lane, H., Hofmann, F., Hicklin, D.J., Ludwig, D.L., Baselga, J. and Rosen, N. 2006. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Research*, 66(3), 1500–1508.
- Özmen V. Breast cancer in the world and Turkey. 2013. *The Journal of Breast Health*, 4(2), 2-5.
- Palmer, M.L. and Tsangaris, T.N. 1993. Breast biopsy in women 30 years old or less. *The American Journal of Surgery*, 165(6), 708–712.
- Panigrahi, A.K. and Rahman Khuda-Bukhsh, A. 2014. Conventional chemotherapy: Problems and scope for combined therapies with certain herbal products and dietary supplements Citation: Mondal, J., Panigrahi, A.K. and Khuda-Bukhsh, A.R. Conventional chemotherapy: Problems and scope for combined therapies with Cert. *Austin Journal of Molecular and Cellular Biology*, 1(1).
- Parida, S. and Sharma, D. 2019. The microbiome–estrogen connection and breast cancer risk. *Cells*, 8(12).
- Parida, S. and Sharma, D. 2019. The power of small changes: Comprehensive analyses of microbial dysbiosis in breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1871(2), 392–405.
- Park, H.S., Han, J.H., Park, J.W., Lee, D.H., Jang, K.W., Lee, M., Heo, K.S. and Myung, C. S. 2021. Sodium propionate exerts anticancer effect in mice bearing breast cancer cell xenograft by regulating JAK2/STAT3/ROS/p38 MAPK signaling. *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(8), 1311–1323.
- Penel, N., Adenis, A. and Bocci, G. 2012. Cyclophosphamide-based metronomic chemotherapy: After 10 years of experience, where do we stand and where are we going? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 82(1), 40–50.
- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., Rijn, M. Van De, Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, I., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lunning, P.E., Brown, P.O., Botstein, D., Grant, S. and Con, H. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6869), 747–752.
- Poste, G. and Fidler, I.J. 1980. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, 283(5743), 139–146.

- Pourbaferani, M., Modiri, S., Norouzy, A., Maleki, H., Heidari, M., Alidoust, L., Derakhshan, V., Zahiri, H.S. and Noghabi, K.A. 2021. A newly characterized potentially probiotic strain, *Lactobacillus brevis* MK05, and the toxicity effects of its secretory proteins against MCF-7 breast cancer cells. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(4), 982–992.
- Prabhakaran, S., Rizk, V.T., Ma, Z., Cheng, C.H., Berglund, A.E., Coppola, D., Khalil, F., Mulé, J.J. and Soliman, H.H. 2017. Evaluation of invasive breast cancer samples using a 12-chemokine gene expression score: Correlation with clinical outcomes. *Breast Cancer Research*, 19(1), 1–11.
- Rad, A.H., Maleki, L.A., Kafil, H.S., Zavoshti, H.F. and Abbasi, A. 2020. Postbiotics as novel health-promoting ingredients in functional foods. *Health Promotion Perspectives*, 10(1), 3–4.
- Rakha, E.A., Chmielik, E., Schmitt, F.C., Tan, P.H., Quinn, C.M. and Gallaghy, G. 2022. Assessment of predictive biomarkers in breast cancer: Challenges and updates. *Pathobiology*, 89(5), 263–277.
- Reinhardt, K., Stückrath, K., Hartung, C., Kaufhold, S., Uleer, C., Hanf, V., Lantzsche, T., Peschel, S., John, J., Pöhler, M., Bauer, M., Bürrig, F. K., Weigert, E., Buchmann, J., Kantelhardt, E. J., Thomssen, C. and Vetter, M. 2022. PIK3CA-mutations in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 196(3), 483–493.
- Riaz Rajoka, M. S., Zhao, H., Mehwish, H.M., Li, N., Lu, Y., Lian, Z., Shao, D., Jin, M., Li, Q., Zhao, L. and Shi, J. 2019. Anti-tumor potential of cell free culture supernatant of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. *Food Research International*, 123(5), 286–297.
- Roy, M., Fowler, A.M., Ulaner, G.A. and Mahajan, A. 2023. Molecular classification of breast cancer. *PET Clinics*, 18(4), 441–458.
- Ruo, S.W., Alkayyali, T., Win, M., Tara, A., Joseph, C., Kannan, A., Srivastava, K., Ochuba, O., Sandhu, J.K., Went, T.R., Sultan, W., Kantamaneni, K. and Poudel, S. 2021. Role of gut microbiota dysbiosis in breast cancer and novel approaches in prevention, diagnosis, and treatment. *Cureus*, 13(8).
- Sadikovic, B. and Rodenhiser, D. I. 2006. Benzopyrene exposure disrupts DNA methylation and growth dynamics in breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 216(3), 458–468.
- Said, T.K., Conneely, O.M., Medina, D., O'Malley, B.W. and Lydon, J.P. 1997. Progesterone, in addition to estrogen, induces cyclin D1 expression in the murine mammary epithelial cell, in vivo. *Endocrinology*, 138(9), 3933–3939.
- Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Türkiye Kanseri İstatistikleri. 2017. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2017.pdf

- Salimi, V., Shahsavari, Z., Safizadeh, B., Hosseini, A., Khademian, N. and Tavakoli-Yaraki, M. 2017. Sodium butyrate promotes apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen species (ROS) formation and mitochondrial impairment. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 1–11.
- Sampsell, K., Hao, D. and Reimer, R.A. 2020. The gut microbiota: A potential gateway to improved health outcomes in breast cancer treatment and survivorship. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–24.
- Sanders, M.E., Merenstein, D.J., Reid, G., Gibson, G.R. and Rastall, R.A. 2019. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature reviews. Gastroenterology and Hepatology*, 16(10), 605–616.
- Schmidt, H., Malik, A., Bicker, A., Poetzsch, G., Avivi, A., Shams, I. and Hankeln, T. 2017. Hypoxia tolerance, longevity and cancer-resistance in the mole rat *Spalax* - A liver transcriptomics approach. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13.
- Schnitt, S.J., Moran, M.S. and Giuliano, A.E. 2020. Lumpectomy margins for invasive breast cancer and ductal carcinoma in situ: Current guideline recommendations, their implications, and impact. *Journal of Clinical Oncology*, 38(20), 2240–2245.
- Sears, C.L. 2009. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 349–369.
- Segal, R., Evans, W., Johnson, D., Smith, J., Colletta, S., Gayton, J., Woodard, S., Wells, G. and Reid, R. 2001. Structured exercise improves physical functioning in women with stages I and II breast cancer: results of a randomized controlled trial. *Journal of Clinical Oncology*, 19(3), 657–665.
- Serra, V., Scaltriti, M., Prudkin, L., Eichhorn, P.J.A., Ibrahim, Y.H., Chandarlapaty, S., Markman, B., Rodriguez, O., Guzman, M., Rodriguez, S., Gili, M., Russillo, M., Parra, J.L., Singh, S., Arribas, J., Rosen, N. and Baselga, J. 2011. PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. *Oncogene*, 30(22), 2547–2557.
- Sever, R. and Brugge, J.S. 2015. Genetic and epigenetic mechanisms of cancer progression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(4), a006098.
- Shahbandi, A., Nguyen, H.D. and Jackson, J.G. 2020. TP53 Mutations and outcomes in breast cancer: Reading beyond the Headlines. *Trends in Cancer*, 6(2), 98–110.
- Shams, I., Avivi, A. and Nevo, E. 2004. Hypoxic stress tolerance of the blind subterranean mole rat: Expression of erythropoietin and hypoxia-inducible factor 1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9698–9703.
- Shapira, A., Livney, Y.D., Broxterman, H.J. and Assaraf, Y.G. 2011. Nanomedicine for targeted cancer therapy: Towards the overcoming of drug resistance. *Drug Resistance Updates*, 14(3), 150–163.

- Sharma, M. and Shukla, G. 2016. Metabiotics: One step ahead of probiotics; an insight into mechanisms involved in anticancerous effect in colorectal cancer. *Frontiers in Microbiology*, 7(12), 1–15.
- Sheflin, A.M., Whitney, A.K. and Weir, T.L. 2014. Cancer-Promoting Effects of Microbial Dysbiosis. *Current Oncology Reports*, 16(10), 1–9.
- Sheikh, I.A., Beg, M.A. and Yasir, M. 2017. Molecular interactions of carcinogenic aromatic amines, 4-aminobiphenyl and 4, 4'-diaminobiphenyl, with lactoperoxidase -Insight to breast cancer. *Anticancer Research*, 37(11), 6245–6249.
- Shetty, M.K. 2011. Screening and diagnosis of breast cancer in low-resource countries: What is state of the art? *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 32(4), 300–305.
- Shirazi, F.H, Zarghi, A., Kobarfard, F., Zendehtel, R., Nakhjavani, M., Arfaiee, S., Zebardast, T., Mohebi, S., Anjidani, N., Ashtarinezhad, A. and Shoeibi S. 2011. Remarks in successful cellular investigations for fighting breast cancer using novel synthetic compounds. *InTech*.
- Shokryazdan, P., Jahromi, M.F., Bashokouh, F., Idrus, Z. and Liang, J.B. 2017. Antiproliferation effects and antioxidant activity of two new *Lactobacillus* strains. *Brazilian Journal of Food Technology*. 21.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. 2017. Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(1), 7–30.
- Sirisinha, S. 2016. The potential impact of gut microbiota on your health: Current status and future challenges. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 34(4), 249–264.
- Skouroliakou, M., Grosomanidis, D., Massara, P., Kostara, C., Papandreou, P., Ntountaniotis, D. and Xepapadakis, G. 2018. Serum antioxidant capacity, biochemical profile and body composition of breast cancer survivors in a randomized Mediterranean dietary intervention study. *European Journal of Nutrition*, 57(6), 2133–2145.
- Smetherman, D.H. 2013. Screening, Imaging, and image-guided biopsy techniques for breast cancer. *Surgical Clinics of North America*, 93(2), 309–327.
- Solak, H.M., Sezgin, E., Cizkova, D., Kreisinger, J., Çolak, F., Çetintaş, O. and Yanchukov, A. 2023. The microbiota of long-living and cancer-free blind mole rat (*Nannospalax xanthodon*) from the edge of its distribution in Northern Anatolia. *Communications Faculty of Science University of Ankara Series C Biology Geological Engineering and Geophysical Engineering*, 32(2), 105–118.
- Somiari, R.I., Sullivan, A., Russell, S., Somiari, S., Hu, H., Jordan, R., George, A., Katenhusen, R., Buchowiecka, A., Arciero, C., Brzeski, H., Hooke, J. and

- Shriver, C. 2003. High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics*, 3(10), 1863–1873.
- So, S.S., Wan, M.L. and El-Nezami, H. 2017. Probiotics-mediated suppression of cancer. *Current Opinion in Oncology*, 29(1), 62–72.
- Speirs, V. and Shaaban, A. M. 2009. The rising incidence of male breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 115(2), 429–430.
- Stevanovic, A., Lee, P. and Wilcken, N. 2006. Metastatic breast cancer. *Australian Family Physician*, 35(5), 309–312.
- Sudarsanam, S. and Johnson, D.E. 2010. Functional consequences of mTOR inhibition. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 13(1), 31–40.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249.
- Talmadge, J.E. and Fidler, I.J. 2010. The Biology of cancer metastasis: Historical perspective. *Cancer Research*, 70(14), 5649–5669.
- Tang, Y., Chen, Y., Jiang, H. and Nie, D. 2011. Short-chain fatty acids induced autophagy serves as an adaptive strategy for retarding mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation*, 18(4), 602–618.
- Tharu, R. 2023. Breast cancer/carcinoma of the breast. Medindia. <https://www.medindia.net/health/conditions/breast-cancer.htm>. Erişim tarihi: 02.02.2024
- Thirunavukkarasan, M., Wang, C., Rao, A., Hind, T., Teo, Y.R., Siddiquee, A.A.M., Goghari, M.A.I., Kumar, A.P. and Herr, D.R. 2017. Short-chain fatty acid receptors inhibit invasive phenotypes in breast cancer cells. *PLoS ONE*, 12(10), 1–16.
- Thompson, E.W., Paik, S., Br  nner, N., Sommers, C.L., Zugmaier, G., Clarke, R., Shima, T.B., Torri, J., Donahue, S. and Lippman, M.E. 1992. Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *Journal of Cellular Physiology*, 150(3), 534–544.
- Thorpe, L.M., Yuzugullu, H. and Zhao, J.J. 2015. PI3K in cancer: Divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature Reviews Cancer*, 15(1), 7–24.
- Toss, A., Tenedini, E., Piombino, C., Venturelli, M., Marchi, I., Gasparini, E., Barbieri, E., Razzaboni, E., Domati, F., Caggia, F., Grandi, G., Combi, F., Tazzioli, G., Dominici, M., Tagliafico, E. and Cortesi, L. 2021. Clinicopathologic profile of breast cancer in germline ATM and CHEK2 mutation carriers. *Genes*, 12(5).

- Urbaniak, C., Cummins, J., Brackstone, M., Macklaim, J.M., Gloor, G.B., Baban, C.K., Scott, L., O'Hanlon, D.M., Burton, J.P., Francis, K.P., Tangney, M. and Reida, G. 2014. Microbiota of human breast tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 3007–3014.
- Urbaniak, C., Gloor, G.B., Brackstone, M., Scott, L., Tangney, M. and Reida, G. 2016. The microbiota of breast tissue and its association with breast cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(16), 5039–5048.
- Van Denderen, B.J.W. and Thompson, E.W. 2013. The to and fro of tumour spread. *Nature*, 493(7433), 485–486.
- Van Goethem, M., Tjalma, W., Schelfout, K., Verslegers, I., Biltjes, I. and Parizel, P. 2006. Magnetic resonance imaging in breast cancer. *European Journal of Surgical Oncology*, 32(9), 901–910.
- Van Meerloo, J., Kaspers, G.J. and Cloos, J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in Molecular Biology*, 731, 237–245.
- Venetis, K., Sajjadi, E., Haricharan, S. and Fusco, N. 2020. Mismatch repair testing in breast cancer: The path to tumor-specific immuno-oncology biomarkers. *Translational Cancer Research*, 9(7), 4060–4064.
- Visvader, J.E. and Stingl, J. 2014. Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: Current status and perspectives. *Genes and Development*, 28(11), 1143–1158.
- Wan, C., Qian, W.W., Liu, W., Pi, X., Tang, M.T., Wang, X.L., Gu, Q., Li, P. and Zhou, T. 2022. Exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* ZFM231 alleviates DSS-induced colitis in mice by regulating gut microbiota. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 102(15), 7087–7097.
- Wang, H., Naghavi, M., Allen, C., Barber, R.M., Carter, A., Casey, D.C., Charlson, F.J., Chen, A.Z., Coates, M.M., Coggeshall, M., Dandona, L., Dicker, D.J., Erskine, H.E., Haagsma, J.A., Fitzmaurice, C., Foreman, K., Forouzanfar, M.H., Fraser, M.S., Fullman, N. and Zuhlke, L.J. 2016. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388(10053), 1459–1544.
- Wang, J.S., Wang, H.J. and Qian, H.L. 2018. Biological effects of radiation on cancer cells. *Military Medical Research*, 5(1), 1–10.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y. and Yang, Z. 2015. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 125, 16–25.
- Wang, N., Sun, T. and Xu, J. 2021. Tumor-related microbiome in the breast microenvironment and breast cancer. *Journal of Cancer*, 12(16), 4841–4848.

- Wang, Q., Shao, X., Zhang, Y., Zhu, M., Wang, F.X.C., Mu, J., Li, J., Yao, H. and Chen, K. 2023. Role of tumor microenvironment in cancer progression and therapeutic strategy. *Cancer Medicine*, 12(10), 11149–11165.
- Wang, R., Zhu, Y., Liu, X., Liao, X., He, J. and Niu, L. 2019. The Clinicopathological features and survival outcomes of patients with different metastatic sites in stage IV breast cancer. *BMC Cancer*, 19(1), 1–12.
- Wang, S., Li, Y., Xing, C., Ding, C., Zhang, H., Chen, L., You, L., Dai, M. and Zhao, Y. 2020. Tumor microenvironment in chemoresistance, metastasis and immunotherapy of pancreatic cancer. *American Journal of Cancer Research*, 10(7), 1937–1953.
- Washbrook, E. 2006. Risk factors and epidemiology of breast cancer. *Women's Health Medicine*, 3(1), 8–14.
- Wawruszak, A., Halasa, M., Okon, E., Kukula-Koch, W. and Stepulak, A. 2021. Valproic Acid and Breast Cancer: State of the Art in 2021. *Cancers*, 13(14), 3409.
- Weiss, J.R., Moysich, K.B. and Swede, H. 2005. Epidemiology of male breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers and prevention: A publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 14(1), 20–26.
- West, A.K.V., Wullkopf, L., Christensen, A., Leijnse, N., Tarp, J.M., Mathiesen, J., Erler, J. T. and Oddershede, L.B. 2017. Dynamics of cancerous tissue correlates with invasiveness. *Scientific Reports*, 7(11), 1–11.
- Wolff, A.C. 2015. Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *The Breast*, 24(2), 23–24.
- Xu, Z., Wu, W., Yan, H., Hu, Y., He, Q. and Luo, P. 2021. Regulation of p53 stability as a therapeutic strategy for cancer. *Biochemical Pharmacology*, 185(1), 114407.
- Xuan, C., Shamonki, J.M., Chung, A., DiNome, M.L., Chung, M., Sieling, P.A. and Lee, D. J. 2014. Microbial dysbiosis is associated with human breast cancer. *PLoS ONE*, 9(1), 1–7.
- Yates, L.R. and Desmedt, C. 2017. Translational genomics: Practical applications of the genomic revolution in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(11), 2630–2639.
- Yip, K.W. and Reed, J.C. 2008. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, 27(50), 6398–6406.
- Yuan, T.L. and Cantley, L.C. 2008. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27(41), 5497–5510.
- Yu, P. and Fu, Y.X. 2006. Tumor-infiltrating T lymphocytes: Friends or foes? *Laboratory Investigation*, 86(3), 231–245.

- Zheng, Y., Li, B., Pan, D., Cao, J., Zhang, J., Wang, X., Li, X., Hou, W., Bao, D., Ren, L., Yang, J., Wang, S., Qiu, Y., Zhou, F., Liu, Z., Zhu, S., Zhang, L., Qing, T., Wang, Y., Yu, Y., Wu, J., Hu, X. and Shi, L. 2021. Functional consequences of a rare missense BARD1 c.403G>A germline mutation identified in a triple-negative breast cancer patient. *Breast Cancer Research*, 23(1), 1–7.
- Zhu, Y., Liu, Y., Zhang, C., Chu, J., Wu, Y., Li, Y., Liu, J., Li, Q., Li, S., Shi, Q., Jin, L., Zhao, J., Yin, D., Efroni, S., Su, F., Yao, H., Song, E. and Liu, Q. 2018. Tamoxifen-resistant breast cancer cells are resistant to DNA-damaging chemotherapy because of upregulated BARD1 and BRCA1. *Nature Communications*, 9(1), 1–11.
- Zwijnen, R.M.L., Wientjens, E., Klompmaker, R., Van der Sman, J., Bernards, R. and Michalides, R.J.A.M. 1997. CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell*, 88(3), 405–415.