

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SIÇAN MEME KANSER MODELİNDE RALOXİFEN ve
FLUOXETİN'İN TEDAVİ EDİCİ ETKİSİ**

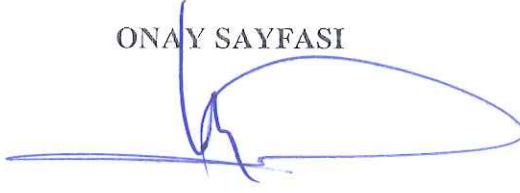
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Oğuzhan TATAR

DANIŞMAN
Prof. Dr. Necip İLHAN

ELAĞIĞ, 2018

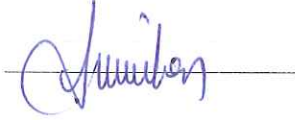
ONAY SAYFASI



Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Nevin İLHAN

Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Necip İLHAN



Danışman

Yüksek Lisans Tezi Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Necip İLHAN

Prof. Dr. Nevin İLHAN

Prof. Dr. Eşref YEĞİN





ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Oğuzhan TATAR

TARİH: 09/08/2018

İMZA:

A blue ink signature of Oğuzhan Tatar, written over a horizontal line.

TEŞEKKÜR

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimim süresince, her an yanımda olan, çalışmalarım bana yön göstererek tecrübeleriyle araştırmalarım ışıltı tutan, biyokimyayı bana sevdiren çok değerli hocam Prof. Dr. Necip İLHAN'a minnettarım. Tez çalışmam boyunca gerek tecrübesiyle gerek bilgisiyle beni hiç yalnız bırakmayan ve bana biyokimya adına çok şey öğreten Sayın Anabilim Dalı Başkanımız ve çok kıymetli hocam Prof. Dr. Nevin İLHAN'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim. Anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Ferit GÜRSU'ya, Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ'a, Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU'na, Prof. Dr. Dilara KAMAN'a, Prof. Dr. Süleyman AYDIN'a, ve çalışmam verdiğimiz desteklerinden dolayı Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. İbrahim Hanifi ÖZERCAN'a ve Histoloji Anabilim Dalı Dr. Öğretim Üyesi Tuncay KULOĞLU'na katkıları için teşekkür ederim. Tezimin tüm aşamalarda yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında görevli arkadaşlarım Araştırma Görevlileri H. Fatih GÜL ve Solmaz SUSAM'a şükranlarımı sunarım. Tez çalışmalarım boyunca benden desteklerini hiç eksik etmeyen babam, annem, eşim ve bütün aileme sevgilerimi sunarım. Biyokimya dalında yüksek lisans yapmam için beni teşvik edip destekleyen amcam Sayın Ecz. Yavuz TATAR'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) biriminin TF.16.24 no'lu projeye olan desteklerinden dolayı gerek FÜBAP birimi personellerine ve gerekse FÜDAM personellerine katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Ecz. Oğuzhan TATAR

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	I
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
TABLO LİSTESİ	VII
ŞEKİL LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR LİSTESİ	IX
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1.Kanser Tanımı	5
3.2. Dünya’da ve Türkiye’de Kanser Epidemiyolojisi	5
3.3. Kanser Etyolojisi	6
3.4. Meme Kanseri	7
3.4.1. Meme Kanserin Tanımı	7
3.4.2. Dünya’da ve Türkiye’ de Meme Kanser Epidemiyolojisi	7
3.4.3. Meme Kanserin Etyolojisi	8
3.4.3.1. Meme Kanserde Majör Risk Faktörleri	8
3.4.4. Meme Kanserin Sınıflandırılması	10
3.4.4.1 Histopatolojik Açıdan Meme Kanserin Sınıflandırılması	10
3.4.4.1.1. Meme Kanserin Evreleri	11
3.4.4.2. Meme Kanserin Moleküler Alt Türleri	13
3.4.5. Meme Kanseri Onkogenleri ve Tümör Baskılayıcı Genler	14
3.4.6. Obezite ve Meme Kanseri	16
3.5. Meme Bezinin Anatomisi	17
3.6. Meme Bezinin Fizyolojisi	18
3.7. Kullanılan Terapotik İlaçlar	19
3.7.1. Fluoksetin	19
3.7.1. 1. Fluoksetin’in Farmakokinetik Özellikleri	20
3.7.2.Raloksifen Hidroklorür	21
3.7.2.1.Raloksifenin Yapısı ve Özellikleri	21

3.7.2.2.Raloksifen'in Etki Mekanizması	21
3.7.2.3. Raloksifenin Kullanımı ve Etki Mekanizması	22
3.8. Test Parametreleri	24
3.8.1.Karbonhidrat Antijeni 15-3 (CA 15-3)	24
3.8.2. Vasküler Endotelyal Growth Faktör (VEGF)	24
3.8.3.Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (M-CSF)	25
3.8.5. Doku Matris Metalloproteinaz İnhibitörü-1 (TIMP-1)	28
3.8.6.Antioksidan Parametreler	29
3.8.6.1.Enzimatik Antioksidanlar	30
3.8.6.1.1. Süperoksit Dismutaz(SOD)	30
3.8.6.1.2.Katalaz (CAT)	31
3.8.6.1.3.Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)	32
3.8.6.1.4.Glutatyon (GSH)	33
3.8.6.1.4.1.Glutatyon Metabolizması	33
3.8.7. Oksidan Parametre	35
3.8.7.1. Malondialdehit (MDA)	35
3.9. Kullanılan Karsinogen Ajan	37
3.9.1. [7,12]-Dimetilbenzantrasen (DMBA)	37
4. GEREÇ ve YÖNTEM	39
4.1.Gereç	39
4.1.1. Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenmeleri	39
4.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	40
4.1.3. Kullanılan Gereçler	41
4.1.4. Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışı	41
5.1.5. Deney Hayvanlarının Hazırlanması	42
4.1.6. Kan Örneklerinin Hazırlanması	43
4.2. Yöntem	44
4.2.1. Enzim İmmün Ölçümler	44
4.2.1.1. Plazma VEGF Düzeylerinin Ölçümü	45
4.2.1.2. Plazma M-CSF Düzeylerinin Ölçümü	45
4.2.1.3. Plazma MMP-9 Düzeylerinin Ölçümü	45
4.2.1.4. Plazma TIMP-1 Düzeylerinin Ölçümü	45

4.2.2. Doku Numunelerinde Antioksidan ve Oksidan Parametrelerin Ölçüm Yöntemleri	46
4.2.2.1. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyi	46
4.2.2.2. Doku Glutasyon Peroksidaz(GSH-Px) Aktivitesi	46
4.2.2.3. Doku Katalaz (CAT) Aktivitesi	47
4.2.2.4. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi	47
4.2.2.5. Doku Redükte Glutasyon (GSH) Tayini	48
4.2.3.Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler	48
4.2.3.1. Histopatolojik İncelemeler	48
4.2.3.2. Doku Örneklerinin Alınması	49
4.2.3.3. TUNEL Metodu	50
4.2.3.4. İstatistiksel Analiz	52
5. BULGULAR	53
5.1. Meme Tümör Dokusunun Makroskopik ve Histopatolojik Değerlendirilmesi	53
5.2.Terapötik Ajanların Kilo Artışı ve Büyüme Oranı Üzerine Etkisi	54
5.3. Plazma Eliza Parametrelerinin Gruplara Göre Değişimi	55
Plazma CA 15-3, VEGF, M-CSF, MMP-9 ve TIMP-1 düzeylerinin meme kanseri oluşturulan grup ile tedavi gruplarındaki değişimi Tablo 10'da verilmiştir.	55
5.4. Doku Eliza Parametrelerinin Gruplara Göre Değişimi	56
5.5. Doku GSH, MDA Düzeyleri ile Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Gruplara Bağlı Olarak Değişimi	57
6.TARTIŞMA	59
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	80

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.Meme Kanserinin TNM Sistemi İle Evrelemesi (17).	11
Tablo 2. Total TNM Evrelemesi (17).	12
Tablo 3. Meme Kanseri Tiplerinin Major Moleküler Alt Türleri (21).	13
Tablo 4 Standart Yem Bileşenleri	39
Tablo 5. Kullanılan Kimyasal Maddeler	40
Tablo 6. Kullanılan Gereçler	41
Tablo 7. Histolojik Takip Serileri	49
Tablo 8. TUNEL Boyama Prosedürü.	51
Tablo 9. DMBA ve Tedavi Gruplarındaki Sıçanların Ağırlık Değişimleri ve Büyüme oranları	54
Tablo 10. Terapötik Ajanların Ölçülen Eliza Plazma Parametreleri Üzerindeki Etkisi	55
Tablo 11. Terapötik Ajanların Ölçülen ELISA Doku Parametreleri Üzerindeki Etkisi	56
Tablo 12. Meme Dokusunda Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Gruplara Bağlı Olarak Değişimi	57
Table 13. Apoptotik İndeks Değerleri	58

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Meme Bezinin Anatomisi	18
Şekil 2. Fluoksetinin Etkisi	19
Şekil 4. Raloksifen HCl ve 17- β -Östradiol'ün Kimyasal Yapıları (48).	21
Şekil 5. Raloksifenin Etki Mekanizması	23
Şekil 6. M-CSF'nin moleküler yapısı	26
Şekil 7. Makrofajın görevleri	27
Şekil 8. Süperoksit Radikalinin SOD Tarafından Dismutasyonu	30
Şekil 9. GSH'ın moleküler yapısı	33
Şekil 10. Glutatyon Oksidasyon-Redüksiyon (Redoks) Döngüsü	34
Şekil 11. Yağ asitlerinin peroksidasyonu ve malondialdehit oluşumu (92).	36
Şekil 12. 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) molekülü	37
Şekil 13. 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen'in olası metabolik aktivasyon yolları	38
Şekil 14. Meme Karsinomunun Makroskopik Değerlendirilmesi	53
Şekil 15. DMBA (A), RAL (B), FLX (C) ve RAL + FLX (D) gruplarında TUNEL boyama ile apoptotik hücrelerin görünüşü.	58

KISALTMALAR LİSTESİ

AF	: Aktivasyon Faktörü
AI	: Apoptotik İndeks
AJCC	: Amerikan Ortak Kanser Komitesi
CA	: Karbonhidrat Antijeni
CAT	: Katalaz
CSF	: Koloni Uyarıcı Faktör
DAB	: Diaminobenzidin
DMBA	: [7,12]-Dimetilbenzantrazen
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	: Enzim Bağlı İmmunosorbant Ölçüm
E₂	: Östradiol
ER	: Östrojen Reseptörü
ER-α	: Östrojen Reseptör Alfa
ER-β	: Östrojen Reseptör Beta
ERE	: Östrojen Yanıtlayan Eleman
ESM	: Ekstrasellüler Matriks
FDA	: Food and Drug Administration
FLX	: Fluoksetin
g	: Gram
GSH	: Glutasyon (Redükte)
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSSG	: Okside Glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit

MDA	: Malondialdehit
M-CSF	: Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MUC	: Musin
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa Beta
NBT	: Nitroblue Tetrazolium
NRI	: Nörepinefrin Geri Alımı
PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PBS	: Fosfat Tamponu
PK1	: Fosfoinosit Bağımlı Protein Kinaz-1
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PLGF	: Plasenta Büyüme Faktörü
PKB	: Protein Kinaz-B
PLOOH	: Fosfolipid Peroksid
RAL	: Raloksifen
ROOH	: Lipid Peroksid
SERM	: Seçici Östrojen Modülatörü
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SSRI	: Selektif Serotonin Geri Alım İnhibitörü
TCA	: Triklorasetik Asit
TIMP-1	: Doku Matriks Metalloproteinaz İnhibitörü-1
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör- Alfa
TNM	: Tümör-Nod Metastaz
UICC	: Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

1. ÖZET

Dünya genelinde meme kanseri oranı sürekli artmaktadır, bu nedenle meme kanserinin tedavisinde kullanılabilecek terapötik ilaçların geliştirilmesi önemlidir. Çalışmamızda, Raloksifen ve Fluoksetinin, tek başlarına veya beraber kullanılarak DMBA ile oluşturulmuş meme kanseri üzerindeki potansiyel terapötik etkileri araştırılmıştır.

Wistar Albino türü 32 adet dişi sıçan DMBA (Grup I), DMBA+RAL (Grup II), DMBA+FLX (Grup III), DMBA+RAL+FLX (Grup IV) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Meme dokusunda ve plazmada VEGF, M-CSF, MMP-9 ve TIMP-1 düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. Kanserli meme dokularındaki MDA ve GSH düzeyleri ile SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri spektrofotometrik yöntemlerle tayin edildi.

Tedavi gruplarının plazma CA15-3 düzeyleri DMBA grubu ile karşılaştırıldığında tüm tedavi gruplarında anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. Plazma VEGF ve TIMP-1 düzeyleri DMBA grubu ile kıyaslandığında, tüm tedavi gruplarında anlamlı olarak azalmışken, bu gruplardaki plazma M-CSF düzeylerindeki azalmalar anlamlı bulunmamıştır. Plazma MMP-9 düzeyindeki anlamlı azalma sadece RAL+FLX grubunda gözlemlendi.

Tedavi ajanları uygulanan sıçanların doku CA 15-3, VEGF, M-CSF ve MMP-9 düzeylerinde DMBA grubuna oranla bir azalma gözlenmiştir. Tüm tedavi gruplarında CA 15-3 ve M-CSF düzeylerindeki azalma istatistiksel

olarak anlamlı iken, VEGF düzeylerinde sadece RAL+FLX grubunda istatistiksel olarak bir anlamlılık görülmüştür. Ayrıca, MMP-9 düzeylerindeki en anlamlı düşüş RAL ile tedavi edilen grupta gözlenirken, TIMP-1 düzeylerindeki anlamlı artış sadece RAL+FLX grubunda görüldü.

DMBA grubu ile karşılaştırıldığında; doku MDA düzeyleri, FLX grubu dışındaki bütün tedavi gruplarında anlamlı olarak azalırken, doku SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri bütün tedavi gruplarında artmıştır. Sadece RAL+FLX grubunda GSH-Px ve CAT aktivitelerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Doku GSH düzeyi RAL ve RAL+FLX gruplarında anlamlı olarak artmıştır.

Sonuç olarak, DMBA ile oluşturulmuş meme kanseri dokularında RAL ve FLX'in beraber kullanımının, tümörlerde aktive edilmiş makrofajların varlığını daha etkin bir şekilde azaltabileceğini, angiogenezi ve oksidatif stresi bastırabileceğini böylece meme kanserinin ilerlemesini modüle edebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, Raloksifen, Fluoksetin, Dimetilbenzantrasen

2. ABSTRACT

The Therapeutic Effect of Raloxifene and Fluoxetine in the Rat Model of Breast Cancer

The worldwide rate of breast cancer is constantly increasing, so it is important to develop therapeutic drugs that can be used in the treatment of breast cancer. In our study, the potential therapeutic effects of Raloxifene and Fluoxetine on breast cancer induced by DMBA alone or in combination were investigated.

32 Wistar Albino female rat divided into four groups; DMBA (Group I), DMBA+RAL (Group II), DMBA+FLX (Group III), DMBA+RAL+FLX (Group IV). The levels of VEGF, M-CSF, MMP-9 and TIMP-1 in breast tissue and plasma were determined by ELISA method. MDA and GSH levels with SOD, GSH-Px and CAT activities in breast cancer tissues were determined using spectrophotometer.

When the plasma CA 15-3 levels of the study groups were compared with the DMBA group, it was seen to decrease significantly in all treatment groups. Plasma VEGF levels were significantly reduced in all treatment groups, while reductions in plasma M-CSF levels in these groups were not significant. A significant decrease in plasma MMP-9 levels was observed only in the RAL + FLX group. Plasma TIMP-1 levels were significantly reduced in all treatment groups compared to the DMBA group.

A reduction in tissue CA 15-3, VEGF, M-CSF and MMP-9 levels of the all treatment groups was observed compared to the DMBA group. While the

decrease in CA 15-3 and M-CSF levels in all treatment groups was statistically significant, VEGF levels are statistically significant only in the RAL + FLX group. In addition, the most significant decrease in MMP-9 levels was observed in the RAL-treated group, while a significant increase in TIMP-1 levels was observed only in the RAL+FLX group.

Compared to the DMBA group; tissue MDA levels were significantly decreased in all treatment groups except the FLX group, whereas tissue SOD, GSH-Px and CAT activities were increased in all treatment groups. Only the increase in GSH-Px and CAT activities in the RAL + FLX group was statistically significant. Tissue GSH levels were significantly increased in the RAL and RAL + FLX groups.

In conclusion, it is thought that the combined use of RAL and FLX in DMBA-induced breast cancer tissues can modulate the progression of breast cancer so that it can suppress angiogenesis and oxidative stress more effectively, reduce the presence of activated macrophages in tumors.

Key Words: Breast Cancer, Raloxifene, Fluoxetine, Dimethylbenzanthracene

3. GİRİŞ

3.1.Kanser Tanımı

Kanser, hücre DNA'sının hasar görmesi sonucunda bu hücrelerin kontrolsüz ve anormal bir şekilde çoğalması ile büyüyüp, immün sistemden kaçarak komşu dokulara ve devamında uzak doku ve organlara invazyon ve metastaz yapması ile oluşan bir hastalıktır. Hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulmasının nedeni gen ekspresyonunda ve moleküler bazda çoklu değişikliklerin görülmesi olarak bilinmektedir. Bu dengenin bozulması sonucunda da kanserli hücreler meydana gelir (1,2).

3.2. Dünya’da ve Türkiye’de Kanser Epidemiyolojisi

Dünya genelinde görülen hastalıklar göz önüne alındığında kanser en önemli hastalıklar içerisinde yerini almıştır. Mevcut veriler değerlendirildiğinde her yıl dünya genelinde 14 milyon, Türkiye’de ise 160 bin kişi kanser teşhisiyle kayıt altına alınmaktadır. Aynı zamanda kansere bağlı olarak yılda, dünyada bir milyon, Türkiye de ise 77 bin hasta yaşamını yitirmektedir. Kansere yakalanma hızının aynı şekilde süreceği değerlendirildiğinde 2030 yılında kanser tanısıyla yılda 22 milyon yeni vaka ile karşı karşıya kalınacağı düşünülmektedir. Dünya genelinde yapılan istatistiklere bakıldığında hastalıklara göre ölüm nedenleri arasında kanser birinci sırada yerini alırken Türkiye’de kardiyovasküler rahatsızlıklardan sonra ikinci sırada olduğu görülmektedir. 2014 yılında yapılan çalışmaya göre Türkiye’de yaşa özel ölüm hızı erkeklerde yüz binde 246,8 iken kadınlarda bu sayı yüz binde 173,6 olarak hesaplanmıştır. Toplamda görülen kanser sıklığı ise yüz binde 210,2 olmuştur (3,4). Kanser tipine göre görülme

sıklığı sıralanacak olursa eğer Türkiye’de erkeklerde akciğer kanseri, prostat kanseri, mesane kanseri, kolorektal kanseri ve mide kanseri olarak sınıflandırılır. Kadınlarda ise bu sınıflandırma meme, tiroid, kolorektal, mide ve rahim kanseri şeklinde olmaktadır. Kanserın sebep olduğu ölümler göz önüne alındığında en fazla görülen kanser tipi erkeklerde akciğer kanseri iken kadınlarda meme kanseri’dir (4).

3.3. Kanser Etyolojisi

Kanser, tek bir sebebe bağılı olmayan birden çok etkenin yol açabileceğı bir hastalıktır. Bu etkenler içerisinde çevresel koşulları barındırırken aynı zamanda vücuttaki genlerin büyük rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Sahip olduğumuz genler tiplerine göre kanserin oluşmasına neden olabilir. Bu genler içerisinde onkogenler, hücrenin bölünmesini uyaran genler olduğu için kanser hastalığı boyunca oldukça aktif genlerdir. Fakat hücrenin bölünmesini baskılayıp farklılaşmasını uyaran tümör baskılayıcı genler ise bu süreçte inaktif duruma geçerler. Aynı zamanda DNA’nın yapısındaki bozuklukları onarmak için bulunan genlerde görülen sorunların DNA’da olan hasarın giderilmemesine yol açtığı için gerek onkogenleri gerekse tümör baskılayıcı genleri mutasyona uğratacağından dolayı kansere sebep olabilmektedir. Bu görülen genetik değışiklik hücrenin dengesini olumsuz etkileyerek hücre çoğalması ve apoptozis arasındaki dengeyi bozar bu şekilde malign hücrenin oluşumuna yol açar. Bu karsinogenez olayı birden çok genin etkilediğı birden fazla basamağın görüldüğü bir süreçtir (5).

3.4. Meme Kanseri

3.4.1. Meme Kanserinin Tanımı

Vücutta, değişen ve kontrolsüzce çoğalan hücrelerin oluşumu şeklinde tanımlanan kanser, genelde bulunduğu lokasyona göre adlandırılırlar. Çoğu kanser türü yumru veya kitle şeklinde tümör adı verilen yapıları oluşturur. Meme kanseri, ya lobül olarak adlandırılan ve süt üretimini gerçekleştiren bezleri barındıran keselerde ya da bu keseleri birbirine bağlayıp üretilen sütü meme başına kadar taşıyan duktal olarak bilinen kanallardan köken alır. Göğüsün geri kalan kısımları ise yağ, bağ ve lenf dokularından oluşmaktadır (6).

3.4.2. Dünya’da ve Türkiye’ de Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Dünya genelinde kadınlar arasında kanser çeşitleri göz önüne alındığında meme kanseri yaklaşık olarak % 30 bir sıklık göstermektedir. Ulusal Kanseri Enstitüsü’nün verilerine göre 2014 yılında Amerika Birleşik Devletleri’nde kadınlarda tahmini yeni 232670 meme kanseri vakası görülmüş olup bu oran bütün kanser çeşitlerinin % 14 ünü oluşturmaktadır (7).

Meme kanseri, Türkiye Sağlık Bakanlığı’nın verileri incelenecek olursa kadınlar arasında en fazla rastlanan kanser çeşidi olup, diğer kanser türleriyle kıyaslandığında toplamda % 25 ini oluşturmaktadır (8). 2014 yılında meme kanseri taraması için hedeflenen toplam 5.600.000 kadın içerisinde sadece % 33,5 i için bu tarama gerçekleştirilmiş olup bu oran 2013 yılı baz alındığında 2014 yılında % 40 oranında artmıştır. Ayrıca birinci basamak tarama hizmetleri ile 231 kadında büyük bir kısmı erken evrede olmak üzere meme kanseri tanısı konulmuştur (8).

3.4.3. Meme Kanserinin Etyolojisi

Meme kanserine sebep olan etkenler tam olarak bilinemediği halde kromozomal mutasyona yol açabilecek birçok maddenin veya etkenin meme kanseri oluşumunda etkin rol aldığı düşünülmektedir (9,10). Bazı risk faktörlerinin bu hastalığa yakalanma olasılığını artırdığı gibi hastalığın ilerlemesinde de hızlandırıcı bir etkisi olduğu bilinmektedir (11). Bu risk faktörleriyle ilişkili olarak meme kanseri vakaları görülme sıklığı arasında anlamlı bir bağ olduğu görülmüştür (12).

3.4.3.1. Meme Kanserinde Majör Risk Faktörleri

- 1) **Cinsiyet:** Östrojen ve progesteron hormonlarının meme hücrelerindeki etkisi ve kadınlarda meme dokusunun daha fazla bulunmasından dolayı kadınların meme kanseri olma olasılığını arttırmaktadır (6). Bu bağlamda cinsiyete göre meme kanserinin görülme sıklığı 100 kadına karşılık sadece bir erkektir (13).
- 2) **Yaş:** Meme kanserine yakalanma riski yaşla birlikte doğru orantılı olarak artmaktadır. Bu hastalık genellikle 50 yaşından sonra görülmesine rağmen ailesinde meme kanseri öyküsü olan kişilerde daha genç yaşlarda görülebilmektedir (6). Bu hastalığa ergenlikten önce yakalanmış vaka olmaması ile birlikte yirmi yaşından önce görülme sıklığı azdır. Fakat yapılan çalışmalarda 45 ile 55 yaş arasında meme kanseri ile karşılaşma oranı fazla iken bu sıklık 55 yaşından sonra oldukça yüksek olur (13).
- 3) **Aile Öyküsü:** Kadınlarda aile de var olan meme kanseri öyküsü meme kanseri olma olasılığını arttırırken bu durum birinci derece yakın akrabalar

üzerinde meme kanserine yakalanma olasılığını iki katına çıkarır (14). Ayrıca meme kanserine yol açabilecek gen mutasyonunun anneden çocuğa aktarılması ile hasarlı geni taşıyan kişide hayatı boyunca bu hastalığa yakalanma olasılığını % 87 oranında arttırdığı görülmüştür (16).

4) Daha Önce Maling veya Bening Meme Kanseri Öyküsünün Olması:

Meme kanseri riskini atipik hiperplazi 4-5 kez arttırırken bir memede var olan kanser diğer memede de görülme olasılığını 2-6 kez arttırır (6).

5) Hormonlar: Hormonların meme kanseri ile ilişkilerini ortaya koymak için yapılan çalışmalarda çoğu hormonun meme kanseri oluşumunda etkileri olduğu bilinirken en önemli hormonun östrojen olduğu görülmüştür. Bu hormonun direkt kansere sebep olmamasına karşın mevcut meme kanseri olgularında meme kanser hücresinin östrojen varlığında daha hızlı bir şekilde çoğaldığı görülmüştür (13).

6) Menapoz Sonrası Hormon Replasman Tedavisi (HRT) Kullanımı: Tek başına östrojen kullanımının meme kanseri riskini arttırmamasına rağmen progesteron ile beraber kombine kullanımının bu hastalığa yakalanma riskini arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Fakat 10 yıl ve üzeri uzun süreli östrojen kullanımının meme kanseri olma olasılığını arttırdığı açıklanmıştır (14).

7) Oral Kontraseptif Kullanma: Oral kontraseptif kullanımının meme kanseri riskini arttırdığı bilinmektedir. İlaç kullanımı bırakıldıktan sonra zaman içerisinde bu risk azalırken 10 yıldan sonra ilaç kullanımına bağlı olarak hastalığa yakalanma riskinin ortadan kalktığı görülmüştür (6).

8) Doğum: Yapılan bazı çalışmalarda meme kanseri görülme sıklığının; 18 yaşından önce doğum yapmış ve emzirmiş kadınlarda genele göre kıyaslandığında %70 oranında azaldığı gösterilmiştir (13).

9) Alkol: Meme kanseri riskinin alkol kullanımı ile artması, günde bir kadeh içki içen kadınlarda çok küçük bir risk oluştururken bu risk, günde 2-5 kadeh arasına çıktığında alkol kullanmayan kadınlarla kıyaslandığında 1,5 katına çıktığı görülmüştür (6).

3.4.4. Meme Kanserin Sınıflandırılması

Meme kanseri, göğüste genellikle süt kanallarının veya keselerinin iç kısmında başlayan ve buradan yayılan bir kanser türüdür. Bu hastalığın tanımı kolayca yapılabilmesine rağmen sınıflandırılması biraz karmaşıktır. Meme kanserleri birçok farklı açıdan sınıflandırılabilir ve yapılan bu sınıflandırmaların her biri hastalığın prognozunda aynı zamanda tedavisinde önemli bir rol almaktadır. Kapsamlı bir sınıflandırma histopatolojik tip, kanser hücresinin boyutu, metastaz olup olmaması ve lokasyonu, reseptörün durumu, genetik test sonucunda belirlenen kanser hastalığına neden olabilecek genlerin varlığı veya yokluğu baz alınarak yapılmaktadır.

3.4.4.1 Histopatolojik Açıdan Meme Kanserin Sınıflandırılması

Mevcut kanser hücresi invazyon ile bazal membranı geçtiği anda invazif karsinom olarak isimlendirilir. Bu invazif karsinomlar eğer süt bezlerinden yayılmaya başlamış ise invazif lobüler karsinom, ilk oluşumu süt kanallarından başlayıp yayılmışsa da invazif duktal karsinom olarak adlandırılır. İnvazif kanser hücreleri lenf ve kan dolaşımı yolu ile diğer organlara metastaz yapabilme eğilimi

göstermektedir. Oysa bazal membranı geçmeden belli bir bölgede kalan meme kanser hücreleri İn-situ karsinom olarak isimlendirilir ve bulunduğu yere göre İn-situ lobüler karsinom veya in-situ duktal karsinom diye çeşitlendirilir. Bu tip kanser hücreleri başka bölgelere yayılma eğilimi göstermezler (16).

3.4.4.1.1. Meme Kanserinin Evreleri

Meme kanseri evreleme sistemi American Joint Committee on Cancer (AJCC) ve Union for International Cancer Control (UICC) tarafından oluşturulan Tümör-Nod-Metastaz (TNM) sistemi ile sınıflandırılmıştır (Tablo 1) (17). Kanser hücrelerini morfolojik özellikleri açısından sınıflandırarak malign tümörleri tanımlama için önemli bir yol olan bu sistem 1942 yılında Pierre Denoix tarafından ortaya konulmuştur (17).

Tablo 1.Meme Kanserinin TNM Sistemi İle Evrelemesi (17).

Evre	Tanım
Primer tümör (T)	
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümör yok
Tis	İn situ karsinom
T1	En büyük boyutu ≤ 2 cm olan tümör
T2	En büyük boyutu > 2 cm ve ≤ 5 cm olan tümör
T3	En büyük boyutu > 5 cm olan tümör
T4	Göğüs duvarı veya deriye doğrudan uzantısı olan herhangi bir boyutta tümör
Bölgesel lenf nodu (N)	
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor (örneğin, daha önce alınmış)
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Hareketli ipsilateral aksiller lenf nodunda metastaz
N2	Sabitlenmiş ya da kalıcı ipsilateral aksiller lenf nodunda metastaz
N3	İpsilateral infraklavikuler lenf nodunda metastaz
Uzak metastaz (M)	
MX	Uzak metastaz değerlendirilemiyor
M0	Metastaz yok
M1	Uzak metastaz

Kanseri evrelemek için kullanılan bütün sistemlerde kanserin oluşumunun en erken safhasını gösteren evre 0 ve 1 evresidir. Bu evrelerde kanser hücreleri oldukça küçük bir alanda lokalize olmuştur. Evre 2 de ise meme kanser hücreleri küçük bir alanda olmalarına karşın çoğalmaya veya yayılmaya başlamıştır. Genellikle bu evre de tedaviyle olumlu sonuç alma yüzdesi oldukça fazladır. Evre 3'e gelindiğinde kanser hücreleri meme dokularına yakın olan diğer çevre dokulara doğru çoğalma eğilimli oldukları görülür. Son evre olan Evre 4 de ise artık meme kanser hücreleri vücudun başka taraflarına yayılmıştır (Tablo.2) (17).

Tablo 2. Total TNM Evrelemesi (17).

Total Evre	T kategorisi	N kategorisi	M kategorisi
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre 1	T1	N0	M0
Evre IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Evre IIIB	T4	Herhangi N	M0
Evre IIIC	Herhangi T	N3	M0
Evre IV	Herhangi T	Herhangi N	M1

3.4.4.2. Meme Kanserinin Moleküler Alt Türleri

Perou ve Sorlie'nin yaptığı gen ekspresyon farklılıklarını ortaya koyan çalışma ile moleküler sınıflandırma sistemi oluşturulmaya başlamıştır (18).

Bu sistem de kanserin moleküler alt tiplere yöntemleri farklı olup luminal A, luminal B, HER2/neu, bazal ve normal benzeri moleküler alt gruplar farklı prognostik alt grupları oluşturduğundan dolayı klinik olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Tanısal açıdan yaygın kullanılması ve sistemin güvenilirliğini kanıtlamak için farklı hasta grupları ve çeşitli dizileme platformlarında yapılan çalışmalarda elde edilen verilerin iyi bir şekilde örtüştüğü kanıtlanmıştır (19, 20).

Tablo 3. Meme Kanseri Tiplerinin Major Moleküler Alt Türleri (21).

	Moleküler Suptip			
	Lüminal A	Lüminal B	HER2/neu	Bazal benzeri ^a
Gen ekspresyon paterni	Lüminal (düşük moleküler ağırlıklı) sitokeratinlerin ekspresyonu ve hormon reseptörleri ve ilişkili genlerin yüksek ekspresyonu	Lüminal (düşük moleküler ağırlıklı) sitokeratinlerin ekspresyonu ve hormon reseptörleri ve ilişkili genlerin orta-düşük ekspresyonu	HER2/neu yüksek ekspresyonu, ER ve ilişkili genlerin düşük ekspresyonu	Bazal epitelial genlerin ve bazal sitokeratinlerin yüksek ekspresyonu, ER ve ilişkili genlerin düşük ekspresyonu, HER2/neu düşük ekspresyonu
Klinik ve biyolojik özellikler	İnvaziv meme kanserlerinin ~%50 si, ER/PR pozitif, ER2/neu negatif	İnvaziv meme kanserlerinin ~%20 si, ER/PR pozitif, HER2/neu ekspresyonu değişken (+ya da-) Lüminal A'dan daha yüksek proliferasyon, Lüminal A'dan daha yüksek histolojik dereceli	İnvaziv meme kanserlerinin ~%15'i, ER/PR negatif, HER2/neu pozitif, Yüksek Proliferasyon, Yaygın TP53 mutasyonu, Yüksek histolojik derece ve nodal pozitiflik oranı	İnvaziv meme kanserlerinin ~%15'i, çoğu ER/PR ve HER2/neu negative (triple negative) Yüksek proliferasyon, Yaygın TP53 mutasyonu, BRCA1 disfoksiyonu (germline, sporadic)
Histolojik korelasyon	Tübüler karsinom Kribriform karsinom Düşük dereceli invaziv ductal karsinom, NOS Klasik lobüler karsinom ^b	İnvaziv ductal karsinom, NOS Mikropapiller karsinom	Yüksek dereceli invaziv ductal karsinom, NOS	Yüksek dereceli invaziv ductal karsinom, NOS Metaplastik karsinom, Medüller karsinom
Tedaviye cevap ve seyir	Endokrin tedaviye cevap	Endokrin tedaviye cevap (tamoksifen ve aromataz inhibitörleri) Lüminal A kadar iyi olmayabilir	Trastuzumaba (Herceptin) cevap	Endokrin tedaviye ya da trastuzumaba (Herceptin) cevap yok
	Kemoterapiye değişken cevap daha iyi)	Kemoterapiye cevap değişken (Lüminal A'dan	Antrasiklin grubu kemoterapiye cevap	Platinum grubu kemoterapiye ve PARP inhibitörlerine duyarlı
	İyi prognoz	Prognoz, lüminal A kadar iyi değil	Genellikle kötü prognoz	Tümü değil ama genellikle kötü prognoz
PARP poli (adenozin difosfat-riboz) polimeraz.				
^a Bazal benzeri tümörlerin grubunda bazal tip (yüksek moleküler ağırlıklı) sitokeratin ekspresyonu eden ve triple negative fenotip gösteren, fakat düşük proliferasyonlu low-grade bir grup (adenoid kistik karsinom gibi) bulunmaktadır.				
^b Klasik lobüler karsinom genellikle lüminal A özellikleri gösterir, pleomorfik lobüler karsinom ise sıklıkla diğer moleküler subtiplerin özelliklerini gösterir.				

3.4.5. Meme Kanseri Onkogenleri ve Tümör Baskılayıcı Genler

Kanser nedenleri arasında sayılan gen mutasyonu onkogenler veya tümör baskılayıcı genlerde oluşabilecek değişiklikler sonucu ortaya çıkar. Hücrenin büyümesinde ve çoğalmasında görev alan bu genler birbirine ters bir şekilde çalışarak hücrenin kontrol altında tutulmasını sağlarlar. Onkogenlerde oluşabilecek değişiklikler tümör oluşumuna neden olurken, tümör baskılayıcı genler hücrenin çoğalmasında görev alan genleri kontrol ettiği için malignite oluşumunu baskılar. Bundan dolayı bu genlerde var olan bir mutasyon malign hücrenin çoğalmasını engelleyecek mekanizmayı ortadan kaldırabilir (22,23). Bu genlerden bazıları şunlardır:

HER-2/neu: Bu proto-onkogen CerbB2 adıyla da bilinen 17. Kromozomun uzun kolunda bulunan, p185 olarak kodlanan tirozin kinaz aktivitesi gösteren bir transmembran glikoproteinidir. HER ailesi hücrenin adezyonunda, büyümesinde, motilitesinde ve hatta diferansiasyonunda görev aldıkları için onkojenik mutasyonun varlığı hücre membranında HER-2 reseptör monomerleri 100 kata kadar varan bir artış gösterir. Fakat bu olay benign meme kanserinde görülmemektedir. Bu protein meme kanserlerinde % 30 oranında fazla salınım gösterdiği için lenf nodu metastazında ve malign agresifliğinde artışa sebep olmaktadır (24).

BCL-2/BAX: 18. kromozomda bulunan Bcl-2 protoonkogeni hücrenin apoptozunu düzenlemede görev alır (25). Şimdiye kadar 20 üyesi tanımlanan Bcl-2/Bax gen ailesinin hücre apoptozisinde mitokondriyal yolağın düzenlenmesinde rol oynarlar. Bax, Bad, Bid gibi bazı proapoptotik proteinler ile Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 gibi bazı antiapoptotik proteinler burada bulunmaktadır. Bcl-2/Bax gen

ailesi mitokondri zarından başka endoplazmik retikulumda da bulunur ve bu Bcl-2/Bax oranına “ölüm anahtarı” da denir. Çünkü bu proteinlerin sayısal miktarı hücrenin varlığının devam etmesine veya ölmesine neden olur. Bcl-2 ‘nin fazlalığı hücrenin yaşamasını sağlarken, Bax oranının fazla oluşu hücrenin ölümüne yol açar (26).

BRCA-1 VE BRCA-2: Genom stabilizasyonunu sağlayan proteinleri kodlayan bu genlerde olabilecek bir mutasyon sonuçta genomik instabiliteye neden olur ve tümör süpresör genler gibi çalışan bu genler görevini yapamazlar (27). Gatekeeper ve caretaker olmak üzere iki gruba ayrılan tümör baskılayıcı genlerin içinde BRCA-1 ve BRCA-2 proteinleri genom tamirinde görev alan caretaker grubunda değerlendirilmektedir (28). RNA polimeraz II ile C-terminal domain üzerinden bağlanan BRCA-1 geninin ürünü aynı zamanda histon deasetilaz kompleksi ile de etkileşir. Bundan dolayı transkripsiyon sırasında DNA çift iplik kırıklarının onarımında ve rekombinasyonunda önemli görevler üstlenir. Yapılan çalışmalarda yaklaşık olarak kalıtsal meme kanserlerinin % 40’ından kalıtsal meme ve over kanserlerinin ise % 80 ve daha fazlasından sorumludur (28). BRCA-2 geni ise kromozomal hasarın tamirinde ve aynı zamanda hücre siklusunun kontrolünde rol oynayan proteinleri sentezlerler (29,30). DNA hasarı sırasında BRCA-2 ve RAD51 tamir bölgesinde kompleks oluşturarak BRCA-2 proteini RAD51’i tamir olması gereken yere bağlamaktan sorumludur. Bu sebepten dolayı BRCA-2 proteininden yoksun hücreler DNA hasarını düzeltmek için RAD51’i hasarlı bölgeye bağlayamazlar ve hasarı onaramazlar (31,32).

p53 GENİ: Transkripsiyon faktörü olarak çalışan birçok genden biri olan p53 geni, DNA hasarı veya bazı onkogenlerin uyarılması gibi hücrede

oluşabilecek çoğu bozukluklardan sonra devreye girerek bu hasarlı hücrenin proliferere olup, çoğalmasını önleyecek olan gen ekspresyonunu başlatır (33). p53 geninin fonksiyonları arasında; hücresel strese bağlı olarak meydana gelebilecek farklılaşma, hücresel döngünün düzenlenmesi, apoptozun kontrol edilmesi, hücre büyümesinin durdurulması, tümör anjiogenezinin kontrolü ve DNA hasarlarının onarılmasında görev alan birçok genin regülasyonu sayılabilir (34). Bütün kanser türlerinin % 50-55'inde bu genin mutasyonun rol oynadığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (35).

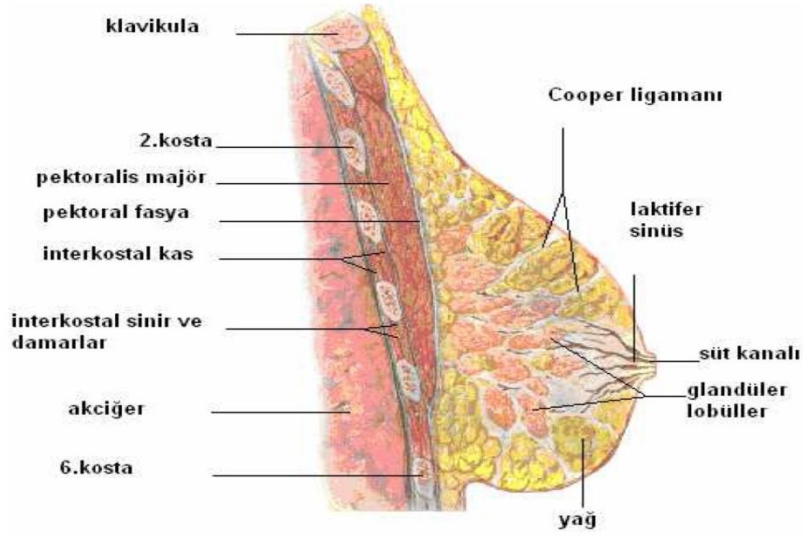
3.4.6. Obezite ve Meme Kanseri

Obezitenin meme kanseri ile olan ilişkisini göstermek amacıyla Brandt ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 337819 kadın hastadan 4385 kadının invazif meme kanseri olduğu görülmüştür. Postmenopozal dönemde 80 kg'ın üzerindeki kadınlar ile 60 kg'ın altında kadınlar karşılaştırıldığında, meme kanseri olgusu görülme relatif riski 1,25, premenopozal kadınlarda ise aynı özelliklerde bu relatif riskin 0,58 olduğu açıklanmıştır (36). Buna göre postmenopozal obezitenin meme kanseriyle doğrudan ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu ilişki biyokimyasal olarak premenopozal kadınların östrojen/östradiol hormonlarının kontrolünde olduğunu göstermektedir. Postmenopozal dönemdeki kadınlarda ise östrojenin kaynağının, yağ dokusunda mevcut androstenedionun aromataz enzimi ile reaksiyonu sonucunda oluşan östron olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra vücutta seks hormonu bağlayıcı globulin düzeyi obez insanlarda azaldığından, aktif hormon düzeylerinde artış görülmektedir. Obezite ile birlikte gelişen hiperinsulineminin de tümör hücrelerinde mitojenik etkisinin olduğu ve aynı

zamanda obeziteyle hiperkolesteroleminin beraber görülmesinin tüm steroid hormonlarının prekürsörü olan kolesterolün, östrojen düzeylerini arttırabileceği unutulmamalıdır. Bununla beraber meme kanseri olan obez kadınlarda ölüm oranının daha fazla olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (36,37).

3.5. Meme Bezinin Anatomisi

Deriye bağlı apokrin bezi olarak adlandırılan meme dokusu reproduktif sistemin fonksiyonel bir bölümüdür. Bu doku cilt, cilt altı yağ dokusu ve meme dokusu (parankim ve stroma) olmak üzere üç kısımdan meydana gelir. Memenin çapı ortalama 10-12 cm ve orta bölgesinde maksimum kalınlığı 5-7 cm'dir. Laktasyon döneminde olmayan bir meme yaklaşık olarak 150-200 gram iken laktasyon döneminde bu ağırlık 400-500 grama kadar çıkabilmektedir (38,39). Gelişimini tamamlamış bir meme dokusu üstte, ikinci ve ya üçüncü kosta'nın üst sınırından, altta altıncı kosta hizasına kadar uzanır. Medial kısmı sternumun kenarında, lateral kısmı ise orta veya ön aksiller hattındadır. Meme üst dış ucunda, muscularis pectoralis majör kasının alt kenarı boyunca koltuk altına doğru uzanır. Meme dokusunda oluşan lezyonların genellikle üst dış kısımda görülmesinin nedeni olarak dokunun büyük kitlesinin çoğunlukla üst yarıda ve dış kısmında yerleşmesi olarak açıklanabilir. Meme dokusunun yaklaşık olarak dörtte üçü muscularis pectoralis major üzerinde yer alır.



Şekil 1. Meme Bezinin Anatomisi

3.6. Meme Bezinin Fizyolojisi

Meme bezi başlıca üç dokudan oluşur; parankimatöz doku, içinde bulunan lobları birbirine bağlayan fibröz doku ve bunların aralarını dolduran yağ dokusundan meydana gelir. Bireyin yapısal durumu meme dokusundaki fibröz ve yağ dokusunun miktarını belirlemede önemli bir rol oynar. Hipofiz, hipotalamus ve overlerin kontrolünde salgılanan, östrojen, progesteron, oksitosin, büyüme hormonu, prolaktin, kortizol, tiroid hormonu gibi birçok önemli hormon memenin gelişmesinde ve fonksiyonunda görev alır (40). Belirtilen bu hormonların in vivo olarak kesin olmamakla beraber in vitro olarak meme dokusu üzerine etkileri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Fakat kesin olarak bilinen hormonlar arasında östrojenin duktusun gelişimini başlattığı, prolaktin ve progesteronun ise lobül ve burada bulunan asinüs olarak adlandırılan birçok kanalcıkların gelişiminde görev aldığı ve prolaktinin aynı zamanda süt salgısının oluşmasını sağladığı bilinmektedir. Hipofiz bezinden salgılanan prolaktin hamileliğin son zamanlarına

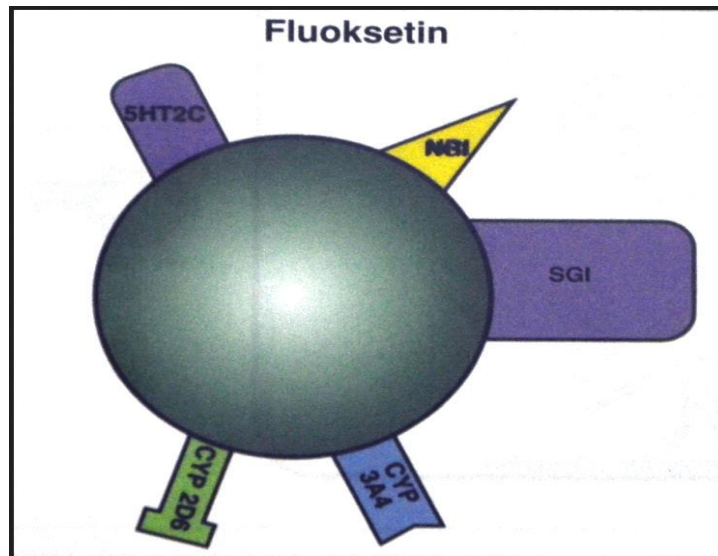
doğru yükselir, lohusalık dönemi ve emzirme süresince yüksek düzeyde seyrederek süt sekresyonunu ve süt proteinlerinin sentezini kontrol eder(40).

Meme epitelinin özellikle duktal epitelin gelişimi üzerinde büyük etkisi olduğu bilinen östrojenin etkisini gösterebilmesi için östrojenin ve progesteronun sentezini uyardığı, çekirdek ve sitoplazmada bulunan östrojen reseptörlerine ihtiyaç vardır (41).

3.7. Kullanılan Terapotik İlaçlar

3.7.1. Fluoksetin

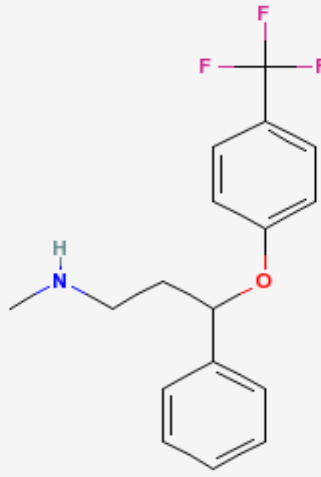
Fenilpropilamin türevi olan ve selektif serotonin geri alım inhibitörü (SSRI) grubunda değerlendirilen fluoksetin, 5HT2C reseptör antagonisti olarak davranan, norepinefrin ve dopamin disinhibe edici özelliğe sahip bir tedavi ajanıdır. Fluoksetin, serotonin geri alımının inhibisyonuna ek olarak norepinefrin geri alımını (NRI), CYP450 2D6 ve 3A4'ü de inhibe eder. Ayrıca NRI, serotonin 2C (5HT2C) antagonisti etkilere de sahiptir (42,43).



Şekil 2. Fluoksetinin Etkisi

3.7.1. 1. Fluoksetin'in Farmakokinetik Özellikleri

Fluoksetin vücutta demetilizasyon ile aktif metaboliti olarak bilinen norfluoksetine dönüştürülür. Bu bileşiğin tedavide hem R hem de S enantiomeri birlikte kullanılır ama fluoksetinin S enantiomeri daha aktiftir (44).



Şekil 3. Fluoksetinin Kimyasal Yapısı

Karaciğerde metabolize olan fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetin CYP2D6 enzimini inhibe eder (45). Norfluoksetinin yarılanma ömrü 5-16 gün arasında değişirken fluoksetinin yarılanma ömrü sadece 53 saattir (46).

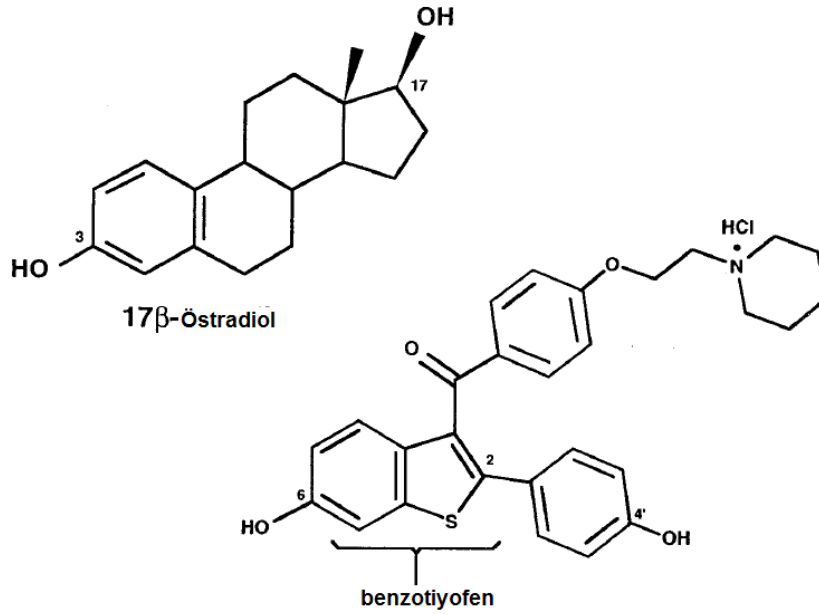
T lenfositler vücutta immun sistemi güçlendiren yapılardan biridir. CD3+ T lenfositlerin aktivitesini desteklerken, CD4+ T lenfositler organizmanın immun sistemini artırır. Fakat CD8+ T lenfositler vücutta T lenfositleri baskılar. Bu yüzden vücutta T lenfositlerin aracılık ettiği immun reaksiyonlarda antitümör ajan olarak önemli bir rol oynamaktadır. Tümörlü hastalar üzerinde yapılan çalışmada fluoksetin verilmeden önce CD3+, CD4+ ve CD4+/CD8+ T lenfositlerin miktarının az, CD8+ miktarının fazla olduğu saptanmıştır. Bu hastalara fluoksetin verildikten sonra CD3+, CD4+ ve CD4+/CD8+ T lenfositlerin miktarında artış

saptanırken zıttı olarak CD8+ sayısında da azalma olduğu görülmüştür. Bu da fluoksetinin vücutta T lenfositler aracılığı ile savunma sistemini desteklediğini göstermiştir (47).

3.7.2.Raloksifen Hidroklorür

3.7.2.1.Raloksifenin Yapısı ve Özellikleri

Benzotiyazepin türevi olan bu bileşiğin molekül formülü C₂₈H₂₇NO₄S ve molekül ağırlığı 473.587 g/mol olarak bilinmektedir (48).



Şekil 4.Raloksifen HCl ve 17-β-Östradiol'ün Kimyasal Yapıları (48).

3.7.2.2.Raloksifen'in Etki Mekanizması

Östrojenin etki mekanizması, özellikle östradiolün (E₂) hedef organ hücrelerinin çekirdeğine girerek, orada östrojen reseptörü (ER) olarak adlandırılan bir dizi boş, pasif durumda olan proteine bağlanmasıyla olur. ERα (baskın olarak aktive olan) ve ERβ olarak iki farklı izoformu olan ER ü E₂ ile birleşerek farklı bir

konfigürasyon oluşturur (E_2 -ER) ve aktif reseptörlere dönüşürler. Böylece östrojen yanıtlayan eleman (ERE) olarak bilinen DNA dizisi ile eşzamanlı bir şekilde dimerize edilmelerini ve daha sonra etkileşimde bulunmalarını sağlarlar (Şekil 5). Rahim ve meme gibi hedef, üreme organı dokularında östrojen etki tetikleme sorumlu olan hücre proteinlerini sentezlemek için sorumlu olan genlerin spesifik bir grubu, ERE bağlıdır (Şekil 5) (49,50).

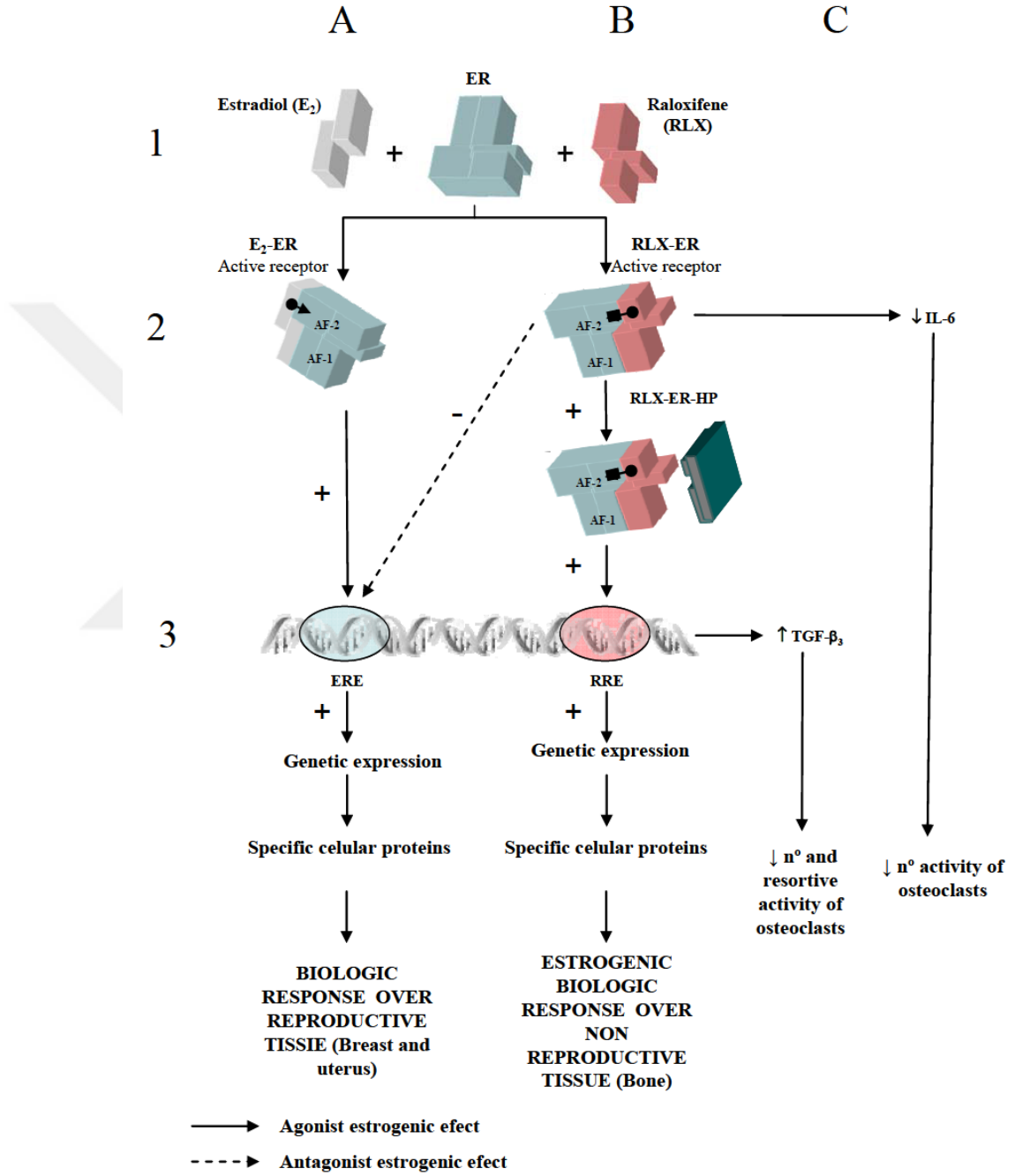
Ayrıca, ER'de aktivasyon faktörleri (AF) olarak bilinen, spesifik DNA dizisi ile etkileşim yerinde bulunan AF-1 ve ligandın bağlandığı yerde olan AF-2 olmak üzere iki özel bölgesi vardır. ERE ile bağlantılı gen gruplarının etkileştirilmesi ve dolayısı ile kendileriyle bağlantılı proteinlerin sentezlenmesi için E_2 yan zincirinin AF-2 bölgesi ile etkileşmesi gerekir (Şekil 5) (49,50).

Östrojen tek bir molekül bağlanma alanına sahip değildir. Östrojen tipi ligantlara ve antiöstrojenik ligantlara ve seçici östrojen modülatörlere (SERM) bağlanmasıyla iki alana sahip olarak farklı etkiler oluşturur. Bu nedenle ligandın ER'ye bağlandığı bölgeye bağlı olarak, ligandın östrojen agonisti, kısmi östrojen agonisti veya bir östrojen antagonisti olup olmadığını tanımlayarak, Raloksifen gibi farklı ER molekül formları yapılmıştır (Şekil 5) (49,50).

3.7.2.3. Raloksifenin Kullanımı ve Etki Mekanizması

Raloksifenin en önemli özelliğinden biri östrojen etkilerini taklit ederken endometriumu uyarmadığı yapılan hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda gösterilmiştir (51,52). Raloksifen hali hazırda klinik olarak osteoporoz tedavisinde kullanılırken, SERM olarak etki gösteren bu bileşiğin meme kanseri tedavisinde de kullanılması için çalışmalar yapılmaktadır. Çünkü raloksifen, şu anda meme

kanseri tedavisinde kullanılan bileşiklerin aksine yerine göre agonist yerine göre anatagonist etki gösterebilmesinin çok büyük bir avantaj olacağı bilinmektedir.



Şekil 5.Raloksifenin Etki Mekanizması

SERM grubu olan bu bileşiklerin farklı yerlerde farklı etki göstermeleri, östrojen reseptörlerine bağlanırken aktive ettikleri veya gerekli olan farklı endojen kofaktörler ve yapısal farklılıkların neden olduğu düşünülmektedir (53-55).

3.8. Test Parametreleri

3.8.1.Karbonhidrat Antijeni 15-3 (CA 15-3)

Vücut savunma sisteminde görev alan musinler hücre yüzeyinde bulundukları yere göre jel oluşturan (sekrete edilen) ve hücre zarında (transmembran) yerleşen musinler olmak üzere 2'ye ayrılırlar. Jel oluşturan musinler tamamen ekstrasellüler olup hücre dışı ortam ile mukoza yüzeyi arasındaki ilk savunma hattını oluştururken, transmembran yerleşen musinler ikinci savunma hattını oluşturur, aynı zamanda ortamdaki herhangi bir farklılığa ait bilgileri hücre içine ileten sensörler olarak da görev yapar. Bir musin çeşidi olan ve kanser hücresinin yüzeyinde salınan MUC1-N'in göğüs kanserinde serum düzeyi artar ve CA 15-3 olarak ölçülür (56). Meme epitelyumunda bulunan glukoprotein yapısında olan bu musin CA 15-3 episialin olarak ta bilinir (57).

Müsin tipi meme kanseri belirteçleri CA 15-3, BR 27.29, CA 549, MCA, CA-M26 ve CA-M29'dur. Ancak bunlardan sadece CA 15-3 ve CA 27.29 FDA (Food and Drug Administration) tarafından metastatik meme kanserinde klinik çizelge takibinde onay almıştır (58).

3.8.2. Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF)

Anjiogenezi uyaran ve anjiogenezin kontrolünde önemli roller üstlenen vasküler endotelial growth faktör (VEGF), fizyolojik ve patolojik anjiogenez,

lenfanjiogenez ve vaskülogenez üzerinde çeşitli etkileri olan büyüme faktörlerinden VEGF-A,B,C,D,E ve plasenta büyüme faktörü-1 (PIGF-1) glikoproteinleri VEGF gen ailesi tarafından kodlanır ve bunların yanında VEGF gen ailesi 3 tirozin kinaz reseptörü içerir (59,60).

VEGF düzeyi embriyonik gelişimin ilk dönemlerinin sonuna doğru azalırken, organogenez sürecinde ekspresyonu oldukça artmaktadır (61).

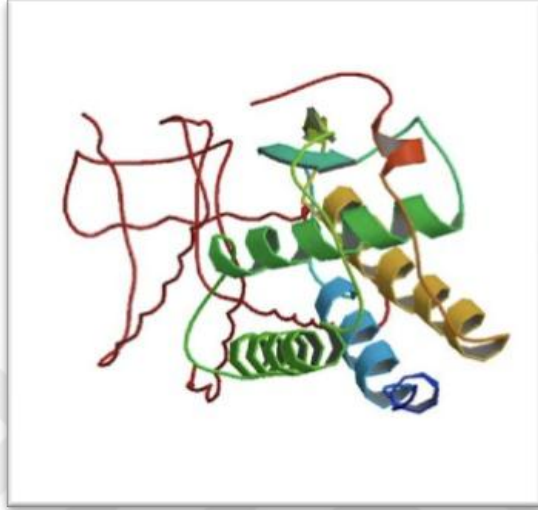
VEGF salınımını arttıran bir diğer faktör glukoz düzeyi ve oksidatif stres olurken nitrik oksit, inflamatuvar sitokinler, onkogenik mutasyonlar ve hipofiz hormonları da VEGF düzeyleri üzerinde etkili olur (62). VEGF-A gen transkripsiyonunu uyaran hormonların östrojen ve testosteron hormonlarının olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiş olup meme kanserli hastalarda VEGF'in tümöral ekspresyonu ile sağkalım arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (63,64).

Lenf nodu olmayan meme kanserli kadınlar arasında yapılan bir çalışmada tümör boyutu ile östrojen, progesteron ve VEGF arasında anlamlı bir şekilde ilişkinin olduğu ortaya koyulmuştur (65). Meme kanseri ile beraber lenf nodu da bulunan hasta kadınlar da yapılan çalışmada ise nüksüz sağkalım ve toplam sağkalımın tahmin edilebileceği düşünülmüştür. Bu bağlamda Rosen LS. ve arkadaşlarının çok değişkenli analizle yaptığı çalışmada VEGF ekspresyonunun toplam sağkalım sayısı üzerinde bağımsız bir şekilde belirleyici bir rolü olduğu gösterilmiştir (66).

3.8.3.Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (M-CSF)

Koloni uyarıcı faktör (CSF-1) olarak da adlandırılan, makrofajların üretimlerini, fonksiyonlarını ve farklılaşmalarını kontrol eden bu yapılar sitokin

mezenkimal hücreleri tarafından salınırlar. Kromozom 1'in kısa kolundan (p21-p13) kodlanan ve molekül ağırlığı 70 kDa olan makrofaj koloni uyarıcı faktör reseptörü (M-CSF) CD115 olarak da adlandırılır ve cc-fms protoonkogeni tarafından kodlanır (67).

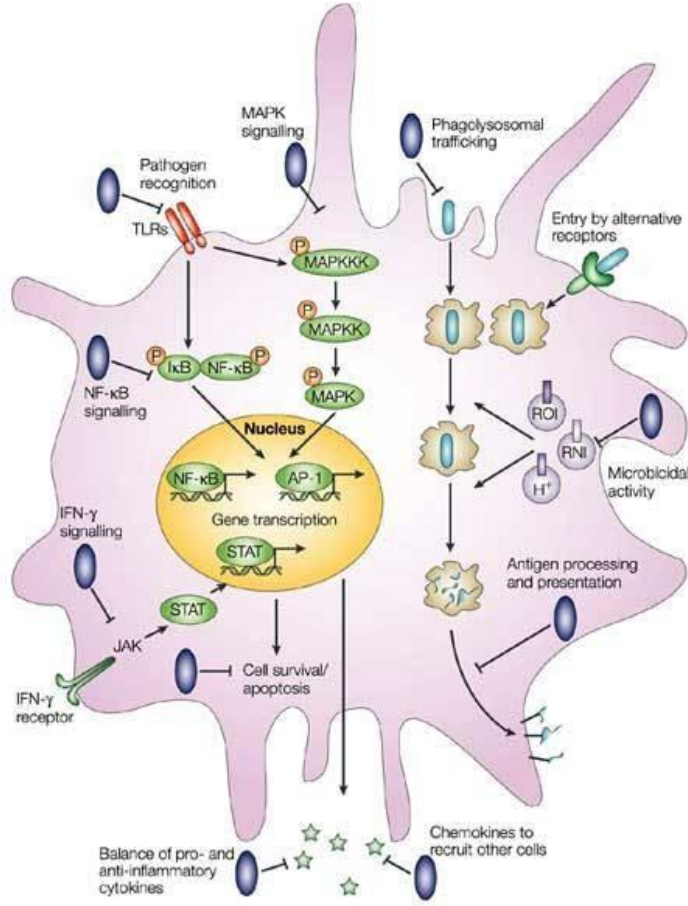


Şekil 6. M-CSF'nin moleküler yapısı

CD115 in M-CSF tarafından uyarılmasıyla fosfatidil inozitol 3 kinaz (PI3K) aktive olur ve ikincil haberci olarak çalışan fosfainozit bağımlı protein kinaz-1 (PDK1)'i fosforiller, PDK1'de protein kinaz B (PKB veya AKT)'yi fosforilleyerek aktive eder (68). AKT ailesinin AKT1 AKT2 ve AKT3 olmak üzere üç üyesi vardır. Bunlardan AKT1 apoptozu inhibe ederken (69), AKT2 insülin sinyal yolağında görev alır (70). AKT3 hakkında fazla veri mevcut olmadığı gibi ağırlıklı olarak beyinde üretildiği bilinmektedir.

Kanser hücrelerinin proliferasyonuna yardım ettiği düşünülen makrofajlar; hipoksik bir ortam meydana getiren tümör hücreleri etrafında kronik enflamasyon oluşturmakta ve salgıladıkları tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ile nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) gen ekspresyonunu arttırmaktadır. NF- κ B apoptozu

engelleyen proteinleri sentezletirmekte ve hücre proliferasyonunu arttırmaktadır (71).



Şekil 7. Makrofajın görevleri

3.8.4. Matriks metalloproteinaz 9 (MMP-9)

Hücrelerin DNA'sında ve kromozomların etkin yerlerinde bulunan genlerde olan değişiklikler nedeniyle kontrol dışı bölünüp çoğalması ile kanser meydana gelir. Fakat kanserin oluşması için kontrolsüz çoğalma yeterli olmadığı gibi hücrenin invazyon ve metastaz özelliklerini de kazanması gerekmektedir (72). Bu bağlamda ekstrasellüler matriks (ESM) elemanları tümörün invazyon ve

metastazında kilit rol oynamaktadır (73). Proteinleri ve proteoglikanları içinde bulunduran ve yalnızca yapısal destek sağlamayan ekstrasellüler matriks, bunun yanında hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve migrasyonu ile yapışmasında görev alan ve aynı zamanda doku morfogenezisi gibi birçok biyolojik olaya etki eden kompleks bir yapıdır. Tümör dokusunun büyümesini ve tümör hücresinin metastazını engellemek için primer bir bariyer olarak görev yapan ekstrasellüler matriksi aşmak için tümör hücreleri metalloproteinazları kullanırlar (74). Matriks metalloproteinazlar (MMP) fizyolojik ve patolojik doku yıkımında görev alan ekstrasellüler proteazlardır (75).

Kollajen tip IV ve diğer ekstrasellüler matriks bileşenlerini ortadan kaldıracı ve jelatinaz B olarak da adlandırılan MMP-9 kanserin büyümesinde ve invazyonunda büyük bir etken olarak görülmektedir. Böylece, hastalığın kötü prognozu ile MMP-9' un aşırı ekspresyonu arasında korelasyon olduğu ortaya konulmuştur (76,78).

MMP-9 faktörünün artışı meme kanserli hastalarda tümörle ilgili olan nötrofil, makrofaj ve lenfosit değerlerinde artışa sebep olur (79).

3.8.5. Doku Matriks Metalloproteinaz İnhibitörü-1 (TIMP-1)

Altı adet disülfüt bağı bünyesinde bulunduran doku matriks metalloproteinaz inhibitörü çok çeşitli hücrelerden eksprese edilir ve dört çeşidi vardır. Bunlardan biri olan TIMP-1 birçok doku ve vücut sıvısında bulunmakla birlikte yüksek ısı ve uygunsuz pH ortamlarda denatüre olmamasını moleküle direnç kazandıran disülfid bağları sağlar (80,81).

Bu glikoproteinler, kendilerine matriks metalloproteinazları (MMP) geri

dönüşümsüz bir şekilde ve non-kovalent biçimde bağlayarak latent enzim formunun aktivasyonunu ve katalitik aktivitenin sürdürülmesini de engelleyerek MMP'lerin proteolitik aktivitelerini kontrol eder ve böylece ekstrasellüler matriksin homeostaz devamlılığını sağlamasında görev alır.

TIMP'lerin malign süreçte matriks metalloproteinlerin çalışmalarını inhibe ettiğinden dolayı tümör oluşumunda negatif etki gösterebileceği düşünülsede, bu glikoproteinlerin tümör oluşumunda büyümeyi uyarıcı ve antiapoptotik etkileri oldukları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (82,83).

Bazı yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda meme, mide ve böbrek kanserlerinde TIMP-1'in artan immünoreaktivitesi ortaya koyulmuştur ve bununla beraber meme, böbrek, kolorektal, mide, özofagus ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde kan ve dokulardaki TIMP-1 protein düzeyleri ile prognoz arasında korelasyon olduğu görülmüştür (84,85).

3.8.6.Antioksidan Parametreler

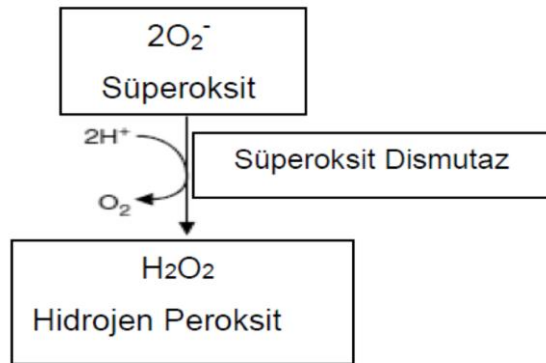
Antioksidanlar denildiğinde reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin zararlı etkilerini enzimatik ve ya nonenzimatik yollarla engelleyen yapılar akla gelir. Bu antioksidan sistemlerden beklenen etkilerin bazıları; serbest olarak dolaşan radikallerin etkilerini engellemek, indirgenmiş şekilde bulunan metallerle şelat oluşturmak, kendilerinden başka antioksidanların ortaya çıkmasında görev almak, gen ekspresyonu sırasında olumlu yönde görev almak, doku ve biyosıvılarda fizyolojik olarak etki gösterebilecek düzeylerde bulunabilmek ve kolay bir şekilde absorbsiyon olmaları beklenmektedir. En etkili antioksidan enzimler arasında

Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutasyon peroksidaz (GPx) bulunmaktadır (86).

3.8.6.1.Enzimatik Antioksidanlar

3.8.6.1.1. Süperoksit Dismutaz(SOD)

Bir metalloenzim olan süperoksit dismutaz, süperoksitin hidrojen perokside dismutasyonunu katalize eder. Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunurlar ve serbest olarak bulunan oksijen radikallerinin toksisitesine karşı defans mekanizmalarını oluşturur. SOD'un bilinen substratı süperoksit radikali olup vücudun mitokondri, sitozol ve ekstraselüler kısımlarında bulunur. Bu enzim vücutta serbest radikallerin oluşmasını engellemesinin yanısıra lipid peroksidasyonunun başlamasını da önler. Vücutta meydana gelen süperoksit anyonu süperoksit dismutaz enzimi tarafından H_2O_2 'ye dönüştürülür. H_2O_2 'nin kendisi serbest radikal olmamasına karşın $OH^\bullet$ radikalinin oluşmasına sebep olduğu için toksik etki gösterebilir bu yüzden H_2O_2 'de katalaz ve glutasyon peroksidaz tarafından zararlı etkisi olmayan bileşiklere çevrilirler (87).



Şekil 8. Süperoksit Radikalinin SOD Tarafından Dismutasyonu

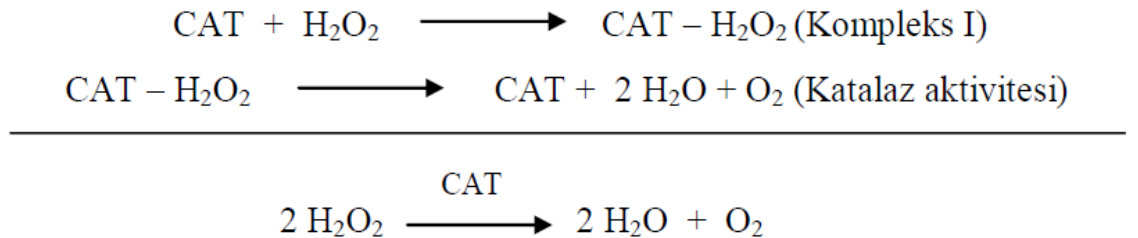
Süperoksit dismutaz enziminin bulunduğu yere ve kullandığı metale göre üç formu vardır;

- 1) SOD-1 : Cu-Zn bağımlı ve sitoplazmada bulunur
- 2) SOD-2 : Mn bağımlı ve mitokondride bulunur
- 3) Ekstraselüler SOD olarak bilinir (88).

3.8.6.1.2.Katalaz (CAT)

Oksido-redüktaz olarak bilinen enzimler indirgenme-yükseltgenme tepkimelerinde rol oynarlar. İşte bu grup içinde yer alan Katalaz (CAT) enzimi, hidrojen peroksit veya diğer organik peroksitleri substrat olarak kullanarak zararlı peroksitlere karşı organizmayı koruyan oksido-redüktazların hidroperoksidaz sınıfında bulunur. Hücre membranlarının yapısını bozarak kanser oluşumuna neden olabilecek serbest radikaller, peroksit bileşiklerinin birikmesiyle meydana gelirler (89).

Katalaz enzimi H_2O_2 'yi hem elektron alıcısı hem de elektron vericisi olarak kullanır ve eğer bu H_2O_2 CAT ile dönüştürülmez ise vücutta zararlı olan serbest radikallerin oluşmasına yol açar



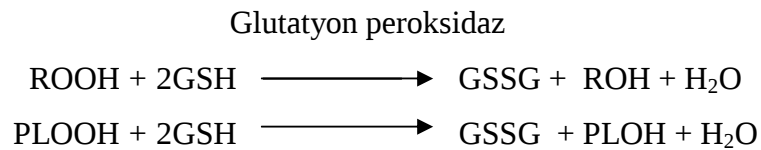
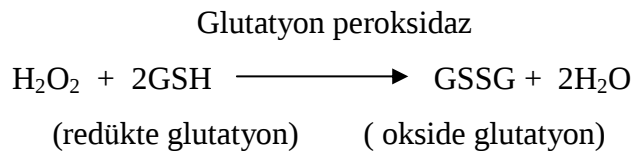
Yukarıdaki tepkimelerde görüldüğü gibi CAT, H_2O_2 'i substrat olarak, elektron alıcısı ve elektron vericisi olarak kullanmaktadır (90).

3.8.6.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Memeli hücrelerinin mitokondrilerinin matriksinde ve hücrenin sitozolünde bulunan GSH-Px, oksidatif hasarı engelleyen enzimler arasında önemli bir yere sahiptir (91). Bulunduğu yerde süperoksit dismutazın meydana getirdiği hidrojenperoksit ve hidroperoksitlerin serbest halde kalmasını engelleyerek onları su ve ilgili alkollere dönüştüren antioksidan özelliğe sahip bir enzimdir. Fakat bu radikalleri dönüştürebilme yeteneği sınırlı olduğu için düşük hidrojen peroksit yoğunluğunda etkisini gösterebilmektedir (92,93). Altı adet izoenzimi bulunan glutatyon peroksidaz enziminin GSH-Px 5 izoenzimi dışındaki diğer beş izoenzimi selenyum elementine bağlı olarak aktivite gösterir (94).

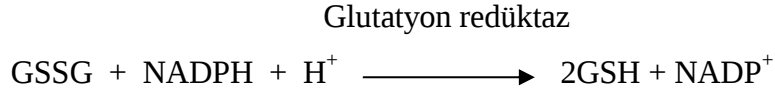
GSH-Px enzimi hücrelerde H_2O_2 'in suya indirgenmesini sağlarken aynı zamanda lipidlerin perokside olmasını engelleyen ve hücrede peroksizom dışında meydana gelen H_2O_2 'in uzaklaştırılmasında görev alan önemli koruyucu enzimlerden biridir. İnsan vücudunda hemoglobinlerden dolayı meydana gelebilecek oksidatif yıkımlara karşı eritrosit membranlarını muhafaza eder. Bundan dolayıdır ki bu enzimin yetersiz olduğu kişilerde hemolitik olayların görülme olasılığı daha fazladır (95,96).

GSH-Px'in katalizlediği tepkimeleri gösterecek olursak;



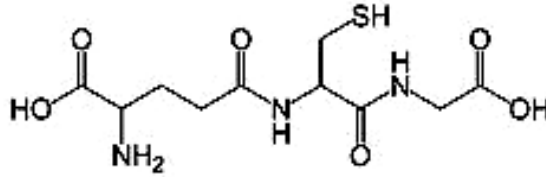
(ROOH=Lipid peroksidleri, PLOOH=fosfolipid peroksidleri temsil etmektedir)

Bu tepkime sonucunda oluşan GSSG, glutatyon redüktazın katalizörlünde NADPH eşliğinde yeniden GSH'a dönüşür.



3.8.6.1.4.Glutatyon (GSH)

Yapısında glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerini bulunduran bir tripeptittir. Bu molekülün hücreleri oksidatif hasara karşı korumada görev aldığı bilinmektedir (97).



Şekil 9.GSH'ın moleküler yapısı

3.8.6.1.4.1.Glutatyon Metabolizması

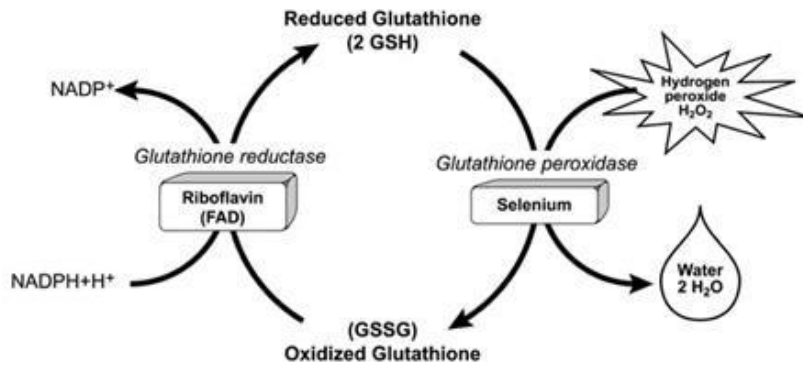
Bütün memeli dokularında bulunan glutatyon başta karaciğer olmak üzere tüm organlarda sentezlenmektedir. Bu bileşiğin antioksidan özelliği olduğu ve bu özelliğini bünyesinde bulundurduğu sistein kısmındaki tiyol (-SH) grubu ile gerçekleştirdiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (98).

Vücutta toplam GSH'ın büyük bir kısmı (~ % 85-% 90'ı) sitozolde bulunur. Kalan kısmı ise mitokondri ve diğer organellerdedir. Mitokondrinin kendi bünyesinde bulunan GSH sentezinde görev alan enzimlerin miktarı yetersiz

olduğu durumlarda sitozolden takviye yapılarak döngünün devam etmesi sağlanır (99).

Vücutta bulunan glutatyon çoğunlukla serbest halde bulunur. Sadece % 15 oranında proteinlere bağlıdır. Serbest halde bulunan glutatyon hücrelerde genellikle redükte formdadır. Böylece oksidatif stres durumunda okside forma dönüştürülerek hücrenin maruz kalabileceği oksidatif hasar önlenmiş olur. Bu yüzden hücrede redükte ve okside formlarının oranı (GSH/GSSG) antioksidan özellik açısından çok önemli bir yeri vardır (100).

Vücutta karaciğer ve böbrek, organlar arası GSH döngüsünün korunmasında görev yapan en önemli birimlerdir. Ama bunların yanısıra lens, dalak, eritrosit ve lökositler de bu döngünün sağlanmasına yardımcı olurlar. Hücredeki GSH içeriğinin devamlılığının sona ermesi geri döndürülemeyen hücre hasarlarına bağlıdır. Bu yüzden birçok patolojik olayın tahmin edilebilmesi için vücutta bulunan GSH konsantrasyonunun önemi büyüktür (101).



Şekil 10. Glutatyon Oksidasyon-Redüksiyon (Redoks) Döngüsü

3.8.7. Oksidan Parametre

3.8.7.1. Malondialdehit (MDA)

Malign hastalıklar ve birçok inflamatuvar oluşumda hücre metabolizması ile meydana gelen serbest radikallerin sayısı artar. Bu durum karşısında vücuttaki antioksidan savunma sistemleri yetersiz kaldığında hücre membranındaki yağ asitleri serbest radikaller ile etkileşime girerek peroksidasyona uğrarlar (102).

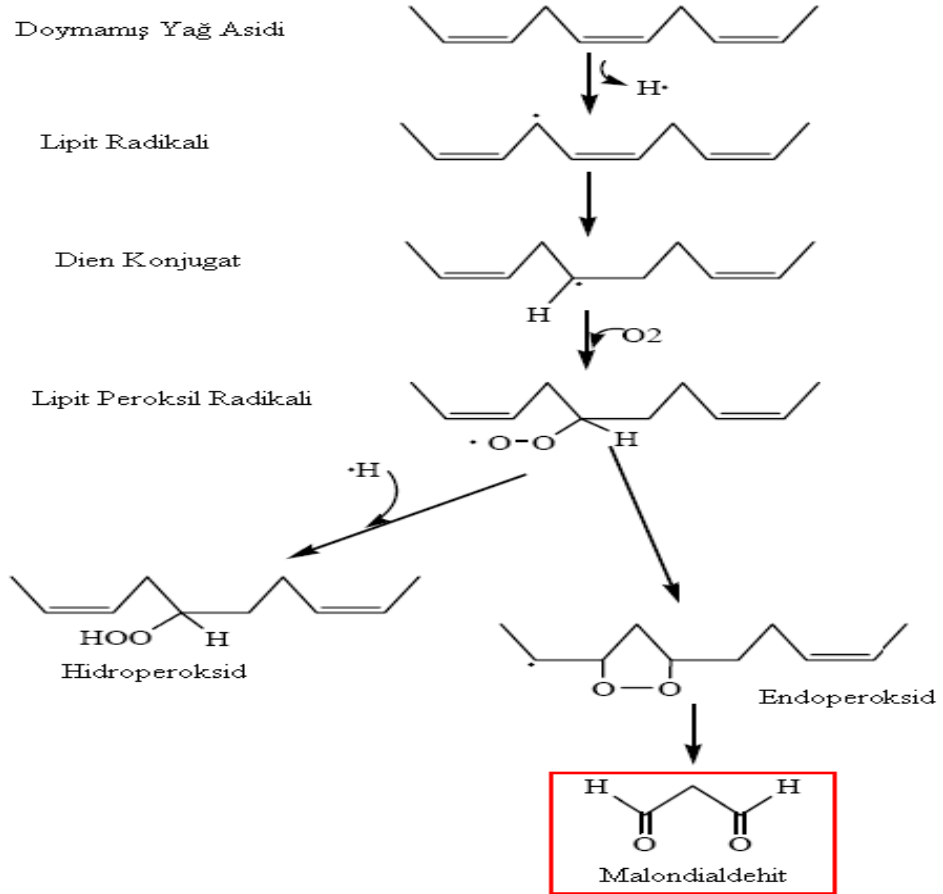
Lipid peroksidasyonu; fosfolipid, steroid gibi vücutta bulunan bileşiklerin yapısındaki doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile reaksiyona girerek çeşitli aldehit, alkol, hidroksi asit gibi ürünlere dönüşmesini içeren ve bunun sonucunda genel olarak yıkıcı etki gösteren birbirini takip eden zincir reaksiyonları olarak bilinir. Bu reaksiyonlar sonucunda meydana gelen membran hasarlarının geri dönüşümü mümkün değildir (103).

Organizmada, serbest radikaller aracılığı ile membrandaki doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen koparılmasıyla lipid peroksidasyonu başlamış olur ve bu olay ortamda malondialdehid (MDA) miktarının artmasına sebep olur (104,105). Vücuttaki lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde bu peroksidasyon reaksiyonunun son ürünü olan MDA düzeyi kullanılır (106). Kan plazmasında kolay bir şekilde tayin edilebilmekte olan ve oksidatif stres parametreleri arasında önemi bir yere sahip olan MDA, idrar numunelerinde de tespit edilebilmektedir (107).

Malondialdehit üretimi üç ya da daha fazla çift bağı bünyesinde bulunduran yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda olmaktadır (Şekil 11). MDA'nın mutajenik, karsinojenik ve genotoksik özellikte olmasının

nedenlerinden bazıları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Membranın yapısında bulunan bileşenlerin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olur.
- Hücre membranlarında neden olduğu deformasyonlar ile şekil ve biçim bozukluklarına sebep olur.
- Enzim aktivitesi, iyon transportu gibi iç membranın bazı özelliklerini değiştirerek yapısını bozar.
- DNA'nın nitrojen bazları ile etkileşime girerek yapısında değişikliklere neden olabilir (107,108).



Şekil 11. Yağ asitlerinin peroksidasyonu ve malondialdehit oluşumu (92).

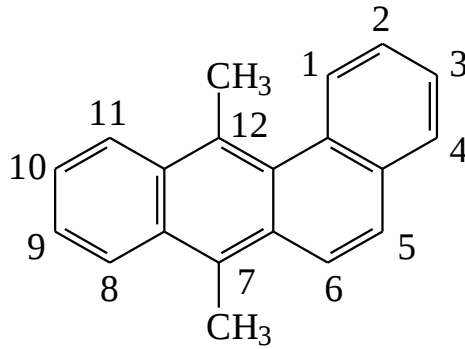
3.9. Kullanılan Karsinogen Ajan

3.49.1. [7,12]-Dimetilbenzantrasen (DMBA)

Serbest radikallerin oluşumunda rol oynayan polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) karsinogenenezi tetiklediği bilinmektedir. Bir PAH türü olan 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) molekülü de hücrede oksidatif hasara sebep olarak hidroksi, süperoksit, peroksidler gibi reaktif oksijen radikallerini oluşturur. Bu etkisini DNA bağlarındaki kırılma veya lipid peroksidasyonu gibi yollarla meydana getirerek mutajenik ve karsinojenik etki gösterir (109).

Gerek kemirgenler üzerinde yapılan in vivo çalışmalarda gerekse de mutajenik hücrelerde yapılan in vitro çalışmalarda DMBA' ya maruz bırakılma sonucunda tümörlü hücre miktarında önemli bir artış olduğu görülmüştür (110).

DMBA metabolizması sırasında meydana gelen ara bileşikler DNA'ya bağlanarak genetik mutasyona sebep olur (111). Bu şekilde yapısı bozulan DNA lipid peroksidasyonuna sebep olarak hücre içinde hidroksi ve süperoksit anyonların çoğalmasıyla serbest radikallerin sayısını artırır ve böylece karsinojenik etkisini gösterir (112).

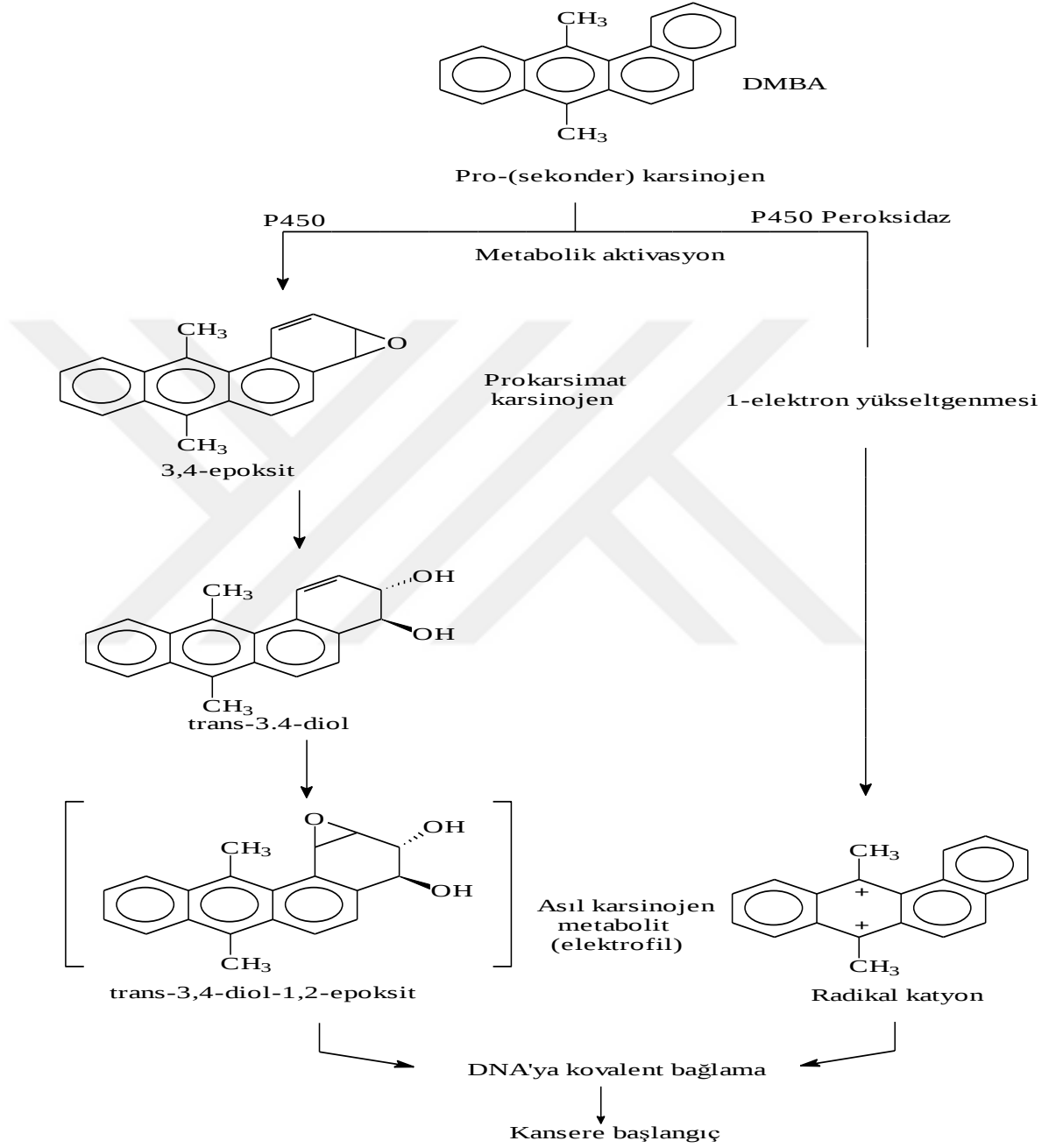


Şekil 12. 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) molekülü

Molekül Formülü : C₂₀H₁₆

Molar kütlesi : 256,34

Erime Sıcaklığı : 122-123 °C



Şekil 13. 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen'in olası metabolik aktivasyon yolları (113).

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1.Gereç

4.1.1. Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenmeleri

Çalışmada toplam 32 adet yaklaşık 100-150 gram Wistar-Albino ırkı dişi sıçan kullanılmıştır. Araştırmaya başlamadan önce Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan araştırma için etik kurul izni (Protokol No: 2016/57) alınmıştır. Deney hayvanları; Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden (FÜDAM) temin edilmiş olup hayvanlar optimal şartlarda sabit sıcaklık (22-24 °C) ve nem altında (% 60±5), aydınlık/karanlık (12/12 saat) sikluslarının olduğu klimalı odalarda özel kafeslerde korunarak standart yem ile beslenmiş ve musluk suyu *ad libitum* sağlanmıştır (Tablo 4).

Tablo 4 Standart Yem Bileşenleri

Yem Bileşeni	Yüzdesi
Su (en çok)	% 12
Ham protein (en az)	% 24
Ham selüloz (en çok)	% 7
Ham kül (en çok)	% 8
HCl’de çözünmeyen kül (en çok)	% 2
NaCl (en çok)	% 1
Mineral Karması*	% 1,25
Vitamin Karması**	% 1,25
Metabolik Enerji	2650 kcal/kg

*Mineral Karması: Kalsiyum (% 1.0-2.8), Fosfor (% 9), Sodyum (% 0.5-0.7), Mangan (10 mg/kg), Çinko (4 mg/kg)

**Vitamin Karması: Vitamin A (300 IU/kg), Vit D₃ (1000 IU/kg), Vit E (60 mg/kg, Vit B₂ (4mg/kg)

4.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmaları ve ürün kodları aşağıda Tablo-5'te verilmiştir

Tablo 5. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Madde	Üretici Firma ve Ürün Kodu
DMBA	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. Tokyo, Japan, (Cat No: D0677)
Raloksifen	Combi-Blocks Company, San Diego, CA, USA, (Cat No: QA-8277)
Fluoksetin	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. Tokyo, Japan, (Cat No: F0750)
Rat VEGF ELISA Kiti	YL Biont, Shanghai YL Biotech Co., Ltd. (Cat No: YLA0190RA)
Rat M-CSF ELISA Kiti	YL Biont, Shanghai YL Biotech Co., Ltd. (Cat No: YLA0427RA)
Rat MMP-9 ELISA Kiti	YL Biont, Shanghai YL Biotech Co., Ltd. (Cat No: YLA0585RA)

4.1.3. Kullanılan Gereçler

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri ve üretici firmaları aşağıda Tablo-6 te verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan Gereçler

Kullanılan Cihazlar	Üretici Firma
Analitik Terazî	Sartorius, Germany
ELİSA Cihazı	Biotek ELX 800
Soğutmalı Santrifüj Cihazı	Heraeus D-37520, Germany
Etüv	Nüve EN 400,Türkiye
Homojenizatör	Ultra-Turrax, T25, Germany
Metabolik İnkübatör	Thermo-shaker MBS100-4A, Poland
Distile Su Cihazı	PV-PP(AQUA) Water System, İtaly
Manyetik Karıştırıcı	Snijders hot plate magnetic stirrer 34532, Holland
Vorteks	VELP SCIENTIFICA,F20220176, Europe
UV/ VisibleSpektrofotometre	T60 UV-Visiblespectrophotometer
Qubit Florometre	Qubit® Fluorometer, Israel

4.1.4. Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışı

Kanserojen ajan olan DMBA'nın 80 mg/ kg'ı 1 mL zeytinyağı içerisinde çözündürüldü. Tedavi ajanlarından biri olan Raloksifenin 3 mg/kg dozu 1 mL DMSO içinde çözündürülürken, diğer bir tedavi ajanı olan Fluoksetin'in 30

mg/kg'ı 1mL distile su içerisinde çözündürülerek kullanıma hazır hale getirildi. Tedavi ajanları uygulama yapılan günlerde hazırlanıp taze bir şekilde uygulanmıştır.

5.1.5. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Çalışma gruplarını oluşturan toplam 32 adet deney hayvanı öncelikle her bir grupta en az 8 sıçan olacak (deney protokolü nedeni ile oluşabilecek sıçan kayıplarını önlemek ve istatistiksel değerlendirmelerin sağlıklı bir şekilde yapılmasını sağlamak amacı ile) şekilde 4 farklı gruba ayrılmıştır. Çalışmanın başlangıcında, çalışma süresi boyunca haftada bir kez ve çalışma sonunda hayvanlar dekapite edilmeden önce tüm gruplardaki hayvanların vücut ağırlıkları ölçülmüştür.

Grup I (DMBA Grubu): Çalışma başlangıcının 15. gününde, DMBA (1 mL zeytinyağı içinde 80 mg/kg dozda, gavaj yoluyla, tek doz) uygulanmıştır. Sıçanlar 90 gün boyunca beslenerek meme kanserinin oluşumu palpasyon ile gözlenmiştir.

Grup II (DMBA+ RAL Grubu): DMBA ile meme kanseri oluşturulmuş sıçanlara Raloksifen (RAL) 1 mL DMSO içinde çözülerek 3 mg/kg dozda gavaj yolu ile 6 hafta boyunca haftada 3 kez verilmiştir.

Grup III (DMBA+FLX Grubu): DMBA ile meme kanseri oluşturulmuş sıçanlara Fluoksetin (FLX) 6 hafta boyunca günde 30 mg/kg dozda 1mL distile suda çözülerek gavaj yolu ile verilmiştir.

Grup IV (DMBA+RAL+FLX Grubu): DMBA ile meme kanseri oluşturulmuş sıçanlara yukarıda belirtilen dozlarda Fluoksetin (FLX) ile Raloksifen (RAL) eş zamanlı olarak verilmiştir.

4.1.6. Kan Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmada biyokimyasal analizlerin tayini için kullanılan kan örnekleri her bir sıçandan 1 adet olmak üzere uygun şekilde Etilen DiaminTetra Asetik Asit (EDTA) içeren tüplere alınmıştır. Alınan kan örnekleri 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrılmıştır. Çalışılacak parametrelere bağlı olarak plazma örnekleri, eppendorf tüplere porsiyonlar halinde bölünerek analizler yapılincaya kadar -80°C’de saklanmıştır. Plazma örneklerinde; Kanseri Antijen 15-3 (CA 15-3), Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF), Makrofaj Koloni Stimulan Faktör (M-CSF), Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9), ve onun spesifik Doku İnhibitörü Metalloproteinaz-1 (TIMP-1) düzeyleri enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemiyle uygun ticari kitlerle prosedürüne uygun olarak tayin edilmiştir.

4.1.7. Dokuların Homojenizasyonu

Tümörlü dokuyu içeren meme dokusu eksize edilerek çıkartıldıktan sonra bir kısmı histopatolojik incelemeler için ayrılırken diğer bir kısmı ise % 0,9’luk soğuk (+4°C) sodyum klorür (NaCl) ile yıkandıktan ve kurutma kâğıdı ile kurutulduktan sonra dokular 0, 01M’lık PBS (1/10) çözeltisi içinde, 16000 rpm’de 3 dakika uygun şartlarda homojenize edilmiştir. Homojenat 5000xg’de 1 saat (+4°C’de) santrifüj yapılarak süpernatantları ayrılmış ve analiz zamanına kadar -80°C’de bekletilmiştir. Protein içeriği Lowry yöntemi ile tayin edilmiştir (114).

Doku süpernatantlarında, antioksidan enzimlerinin aktiviteleri tayin edilmiş olup antioksidan enzimlerden Glutasyon Peroksidaz (GPx), Süperoksid Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) aktiviteleri, Redükte Glutasyon (GSH) ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan Malondialdehid (MDA) düzeyleri uygun yöntemler kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ayrıca doku süpernatantlarında; plazma örneklerinde olduğu gibi ELISA yöntemi ile VEGF, M-CSF, MMP-9 ve TIMP-1 düzeyleri de tayin edilmiştir.

4.2. Yöntem

4.2.1. Enzim İmmün Ölçümler

ELISA yöntemi, özgül antijen-antikor bağlanması reaksiyonu ile antikorlara alkalen fosfataz veya horse radish peroksidaz gibi bir enzim bağlanması ve bu enzim substratının renkli ürünlere dönüştürülmesi suretiyle gösterilmesi esasına dayalı immünokimyasal bir ölçüm tekniğidir. Çalışmamızda seçilen parametrelere özgü sıçanlardan alınan monoklonal antikor, 96 gözlü plate'ler üzerine önceden kaplanmış olarak kit içeriğinde bulunmaktadır. Plazma ve doku örnekleri ile standartlar platelerde bulunan uygun kuyucuklara eklendikten sonra, 37 ° C'de inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon gerçekleşikten sonra, plate'ler yıkanmış ve kuyucuk içerisinde çözelti kalmamasına dikkat edilmiştir. Daha sonra enzim substratı ortama eklenmiştir. Absorbanslar ELX 800 ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm'de okutulmuştur. Plate yıkamalarında ise otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX 50 (BioTekInstruments, USA) kullanılmıştır.

4.2.1.1. Plazma VEGF Düzeylerinin Ölçümü

Plazma VEGF düzeyleri, sıçan VEGF- ELISA kiti (YL Biont, Shanghai. YL BiotechCo., Ltd. Katalog No: YLA0190 RA) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Sonuçlar ng/mL olarak belirtildi. Kitin ölçüm aralığı kit prosedüründe 10 - 3000 ng/mL, sensitivitesi < 5,01 ng/ml olarak belirlenmiştir.

4.2.1.2. Plazma M-CSF Düzeylerinin Ölçümü

Plazma M-CSF düzeyleri, sıçan M-CSF- ELISA kiti (YL Biont, Shanghai. YL BiotechCo., Ltd. Katalog No: YLA0427RA) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Sonuçlar ng/mL olarak belirtildi. Ölçüm aralığı 20 - 2000 ng/ml, sensitivitesi < 11,24 ng/ml'dir.

4.2.1.3. Plazma MMP-9 Düzeylerinin Ölçümü

Plazma MMP-9 düzeyleri, sıçan MMP-9 ELISA kiti (YL Biont, Shanghai. YL BiotechCo., Ltd. Katalog No: YLA0585RA) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Sonuçlar ng/ml olarak belirtildi. Ölçüm aralığı 0,05 - 10 ng/ml, sensitivitesi < 0,01 ng/ml olarak kitte belirtilmiştir.

4.2.1.4. Plazma TIMP-1 Düzeylerinin Ölçümü

Plazma TIMP-1 düzeyleri, sıçan TIMP-1 ELISA kiti (YL Biont, Shanghai. YL BiotechCo., Ltd. Katalog No: YLA0572RA) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Sonuçlar ng/ml olarak belirtildi. Kitin ölçüm aralığı 0,05 - 10 ng/ml, sensitivitesi < 0,02 ng/ml olarak belirtilmiştir.

4.2.2. Doku Numunelerinde Antioksidan ve Oksidan Parametrelerin Ölçüm Yöntemleri

4.2.2.1. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyi

MDA düzeylerini belirlemede Ohkawa ve arkadaşları tarafından önerilen metod kullanılmıştır (114). Sonuçlar doku için nmol/g protein olarak tanımlandı. Sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\text{MDA} = \frac{\text{Örneğin Absorbansı}}{\text{Standartın Absorbansı}} \times \text{Standartın Konsantrasyonu}$$

4.2.2.2. Doku Glutasyon Peroksidaz(GSH-Px) Aktivitesi

Glutasyon Peroksidaz aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının (116) metodu kullanılarak belirlendi. GSH-Px; hidrojen peroksit varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG) yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, Glutasyon Redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın NADP⁺'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunması ile tayin edildi.

$$U/L (\mu\text{M}/\text{min}/L) = \frac{\Delta A/t \times V_t \times 10^6}{\epsilon \times V_s \times L}$$

ϵ = NADPH 'ın ekstinksiyon sabiti ($6,22 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

V_t = Total reaksiyon hacmi (mL)

V_s = Total reaksiyon içindeki numune hacmi (mL)

L = Küvet çapı (1cm)

$\Delta A/t$ = Dakikadaki absorbans değişimi

⁶
10 = Molü μM 'e çevirmek için kullanılan faktör

$$\text{GSH} - \text{Px Spesifik Aktivitesi (U/g protein)} = \frac{\text{GSH} - \text{Px (U/L)}}{\text{Protein (g/L)}}$$

4.2.2.3. Doku Katalaz (CAT) Aktivitesi

Katalaz aktivitesini ölçmek için Aebi (117) metodu kullanılmıştır. CAT, H_2O_2 'in yıkılımını katalize eder. H_2O_2 'in CAT tarafından yıkım hızı, H_2O_2 'in 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Hesaplamalar aşağıdaki formüle göre yapılmıştır;

$$k = (2,3/30) \times (\log A_1/A_2) \times \text{Dilüsyon}$$

Dokuda CAT aktivitesi k/g protein olarak hesaplanmıştır.

4.2.2.4. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesi tayininde Sun ve ark. tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı (118). Yöntemin prensibi ksantin oksidaz ile ksantin oksidasyonu sırasında açığa çıkan O_2^- 'nin Nitroblue Tetrazolium (NBT)'u redükleyerek, formazan oluşturması esasına dayanmaktadır. SOD aktivitesi yükseldikçe, NBT ile reaksiyona giren O_2^- miktarı azalacak ve formazan oluşumu azalacaktır.

Örneęe ait hesaplanan yüzde inhibisyon değerine karşılık gelen SOD değeri standart eğri kullanılarak bulunur. SOD aktivitesi U/g protein birimi olarak verilmiştir.

4.2.2.5. Doku Redükte Glutasyon (GSH) Tayini

GSH tayini kanser ve tedavi grubu sıçanların meme dokularında gerçekleştirilmiştir. Sıçanlardan alınan meme doku örnekleri soğuk % 0,9'luk sodyum klorür çözeltisiyle yıkanmış, 2 ml sodyum klorür ile homojenize edilmiştir. Homojenize doku örnekleri 7000 rpm'de 5 dakika 4°C'de santrifüjlenmiş, elde edilen süpernatantlarda GSH analizi Beutler ve arkadaşlarının (119) önerdiği yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Dokudan elde edilen süpernatantlar triklorasetik asit (TCA) ile % 10 (v/v) olacak şekilde muamele edilip santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantların üzerine disodyum hidrojen fosfat çözeltisi ile ditiyorbisnitro benzoik asit içeren Elman ayracı eklenmiş ve 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunmuştur. Sonuçlar $\mu\text{mol/g}$ protein olarak ifade edilmiştir.

4.2.3. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler

4.2.3.1. Histopatolojik İncelemeler

Sakrifiye edilerek meme dokuları çıkarılan sıçanlarda yapılan makroskopik değerlendirmeler sonunda resimleri çekildi. Histopatolojik inceleme için çıkarılan meme dokusuna ait lümen içeriği serum fizyolojik ile temizlendi ve doku % 10'luk formaldehit içinde tespit edildi. Tespiti yapılan dokulardan, rutin histolojik takiplerinden sonra parafin bloklar hazırlanarak mikrotomda 5 μm kalınlığında seri kesitler alındı. Daha sonra histolojik kesitler, hematoksilen-eozin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi. Lezyonlar Olympus BX43 ışık mikroskobu ile incelenerek, Olympus DP72 görüntüleme cihazı ile fotoğraflandı. Saptanan lezyonlar histopatolojik olarak sınıflandırıldı. Bu sınıflandırma

deneyimli ve birbirinden bağımsız iki patoloji uzmanı tarafından yapıldı ve gruplardaki histopatolojik lezyonların sayısı belirlendi.

4.2.3.2. Doku Örneklerinin Alınması

Histolojik çalışma için her gruptan alınan meme dokuları formol solüsyonunda tespit edildikten sonra rutin histolojik takip serilerinden (Tablo 7) geçirilerek dehidrate edildi. Dokular daha sonra ksilolde parlatılıp parafin bloklara gömüldü.

Tablo 7. Histolojik Takip Serileri

İşlem Sırası	İşlem	Süre
1	% 70 Alkol	2 saat
2	% 80 Alkol	1,5 saat
3	% 96 Alkol I	30 dakika
4	% 96 Alkol II	30 dakika
5	% 100 Alkol I	30 dakika
6	% 100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Xylol 15 dakika	
8	Xylol I	15 dakika
9	Xylol II	15 dakika
10	Yumuşak parafin + Xylol	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 saat
12	Yumuşak parafin + Sert parafin	1,5 saat
13	Sert parafin	3 saat

4.2.3.3. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda Apop Tag Plus Peroxidase InSitu Apoptosis Detection Kit (Chemicon, Cat No: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi.

Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. % 0.05'lik proteinaz K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3 hidrojen peroksit ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dakika Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37° C'de nemli ortamda çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + % 30 TdT Enzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. Stop/WashBuffer'da 10 dakika bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Peroksidaz ile 30 dakika muamele edildi. Diaminobenzidin (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntülendi. Harris hematoksilen ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 1000 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 8).

Tablo 8. TUNEL Boyama Prosedürü.

	İşlem	Süre
1	60°C etüv	Bir gece
2	Xylol	3X15 dakika
3	%100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS	5 dakika
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
6	1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7	PBS	3X5 dakika
8	Endojen peroksit blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9	PBS	3X5 dakika
10	Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11	Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) 37°C'de	60 dakika
12	Stop/Wash Buffer (2ml) + Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	3X5 dakika
15	DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16	PBS	3X5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Harris hematoksilin	1-5 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	%80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21	Xylol	2X5 dakika
22	Kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kapatma.	

4.2.3.4. İstatistiksel Analiz

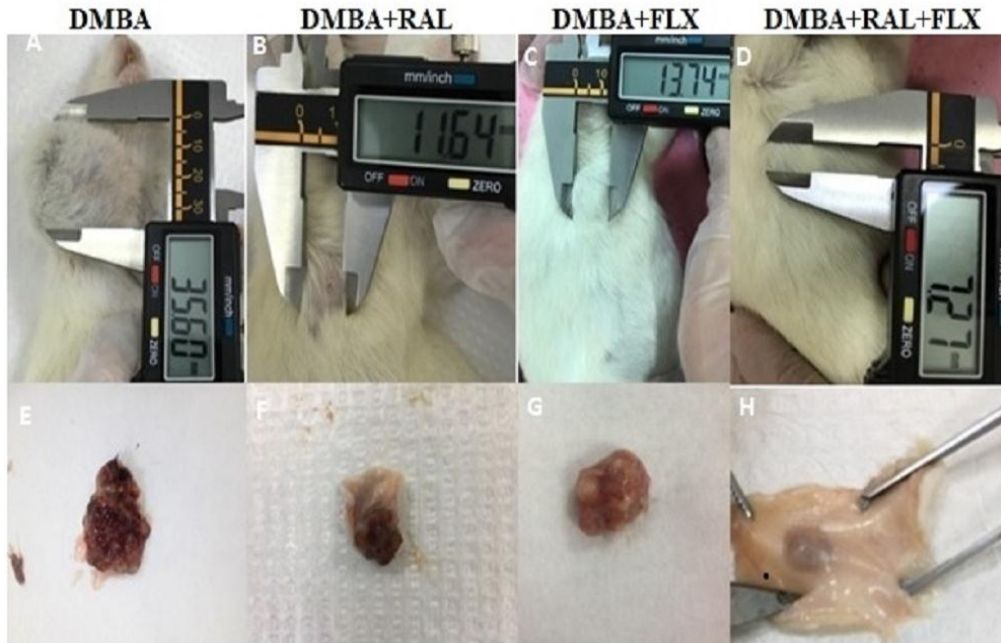
İstatistiksel analiz için Fırat Üniversitesine ait lisansı olan SPSS version 22 programı kullanıldı. Elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak belirlendi. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA ve posthoc Tukey testi ile yapıldı. $p < 0,05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



5. BULGULAR

5.1. Meme Tümör Dokusunun Makroskopik ve Histopatolojik Değerlendirilmesi

Kanserojen bir ajan olan DMBA ‘nın bir deneysel protokole bağlı olarak sıçanlara uygulanması sonucu meme dokusunda tümör oluşumu tespit edilmiştir. Meme karsinomunun varlığı makroskopik ve histolojik değerlendirme ile doğrulanmıştır (Şekil 14, 15). Tüm gruplarda oluşan meme karsinomunun görünür boyutları karşılaştırıldığında, tümörün DMBA grubunda nispeten daha büyük olduğu saptanmıştır. RAL+FLX’ inin kombine uygulandığı grupta ise tümör boyutunun neredeyse yarı yarıya küçüldüğü gösterilmiştir. Bu veriler kombine ilaç tedavisinin DMBA’nın neden olduğu kimyasal karsinogenezin yıkıcı etkisini azaltabileceğini göstermektedir.



Şekil 14. Meme Karsinomunun Makroskopik Değerlendirilmesi

5.2.Terapötik Ajanların Kilo Artışı ve Büyüme Oranı Üzerine Etkisi

Çalışma süresince tüm sıçanların kiloları haftalık periyodlarda tartılarak kaydedilmiştir. Tüm gruplardaki sıçanların kilo alımları çalışma süresince normal bir seyir gösterirken sıçanların başlangıç kiloları ile deneysel uygulamanın sonundaki kiloları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Tedavi ajanlarının uygulandığı gruplarda kilo alımı, sadece DMBA uygulanmış gruptaki sıçanlara göre bir artış gösterirken en fazla artış kombine tedavinin (RAL+FLX) uygulandığı gruptaki hayvanlarda gözlenmiştir. Büyüme oranları değerlendirildiğinde ise sadece DMBA uygulanmış ratlara oranla kombine tedavi gören sıçanlarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0,05$)(Tablo 9).

Tablo 9. DMBA ve Tedavi Gruplarındaki Sıçanların Ağırlık Değişimleri ve Büyüme oranları

	Başlangıç(g)	Final(g)	Kilo Alımı(g)	Büyüme** Oranı
DMBA	280,44±37,56	300,50±47,86	18,06±12,93	0,14±0,10
DMBA+RAL	282,75±25,31	300,88±32,96	18,13±10,37	0,14±0,08
DMBA+FLX	292,13±30,68	310,38±40,32	19,50±11,52	0,15±0,09
DMBA+RAL+FLX	294,63±24,40	329,25±28,14	34,63±10,49*	0,26±0,08*

* $p < 0,05$, DMBA grubu ile karşılaştırıldığında; sonuçlar $\bar{X} \pm SD$ şeklinde verilmiştir.

** Büyüme oranı = (Son vücut ağırlığı - Başlangıç vücut ağırlığı) / Toplam uygulama gün sayısı

Bu durum kombine tedavinin, DMBA ile uyarılmış meme karsinogenezine karşı optimum iyileştirici etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

5.3. Plazma ELISA Parametrelerinin Gruplara Göre Değişimi

Plazma CA 15-3, VEGF, M-CSF, MMP-9 ve TIMP-1 düzeylerinin meme kanseri oluşturulan grup ile tedavi gruplarındaki değişimi Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Terapötik Ajanların Ölçülen Plazma Parametreleri Üzerindeki Etkisi

Gruplar	CA15-3 (μ IU/mL)	VEGF (ng/mL)	M-CSF (ng/L)	MMP-9 (ng/mL)	TIMP-1 (ng/mL)
DMBA	32,46 $\pm$ 79,98	580,86 $\pm$ 58 $\pm$ 42	523,65 $\pm$ 91,11	1,14 $\pm$ 0,44	1,86 $\pm$ 0,42
DMBA+RAL	21,83 $\pm$ 4,74**	461,34 $\pm$ 34,26*	515,60 $\pm$ 74,14	1,00 $\pm$ 0,32	1,36 $\pm$ 0,40**
DMBA+FLX	23,65 $\pm$ 5,36	398,98 $\pm$ 57,20***	458,29 $\pm$ 86,85	0,92 $\pm$ 0,14	1,18 $\pm$ 0,21***
DMBA+RAL+FLX	20,58 $\pm$ 8,21**	231,74 $\pm$ 93,30***	446,97 $\pm$ 108,34	0,65 $\pm$ 0,21**	1,30 $\pm$ 0,23**

* DMBA grubuyla kıyaslandığında; p=0,005, ** DMBA grubuyla kıyaslandığında; p<0,05

*** DMBA grubuyla kıyaslandığında; p<0,005

Plazma CA15-3 düzeyleri DMBA grubu ile karşılaştırıldığında tüm tedavi gruplarında azalmış olup en etkili azalma kombine tedavi grubunda gözlenmiştir, Plazma CA15-3 düzeyindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Plazma VEGF düzeyleri ise, tüm tedavi gruplarında DMBA grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma göstermiştir (p<0,05). Plazma M-CSF düzeyleri açısından tedavi gruplarında anlamlı olmayan bir azalma saptanmıştır. Tedavi ajanı olarak RAL+ FLX kombinasyonu uygulanan grupta DMBA grubuna oranla plazma MMP-9 düzeylerinin istatistiksel olarak önemli ölçüde azaldığı

saptanmıştır ($p<0,05$). Plazma TIMP-1 düzeyleri ise DMBA grubu ile karşılaştırıldığında tüm tedavi gruplarında anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$). En etkili azalma tedavi ajanı olarak kullanılan FLX grubunda gözlenmiştir ($p<0,005$) (Tablo 10).

5.4. Doku ELISA Parametrelerinin Gruplara Göre Değişimi

Doku CA 15-3, VEGF, M-CSF ve MMP-9 düzeyleri DMBA uygulanmış grup ile karşılaştırıldığında DMBA+RAL, DMBA+FLX ve DMBA+RAL+FLX gruplarında azaldığı görülmüştür. Tüm tedavi gruplarında CA 15-3 ve M-SCF düzeylerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunurken RAL+FLX grubu dışındaki grupların VEGF düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Tablo 11. Terapötik Ajanların Ölçülen Doku Parametreleri Üzerindeki Etkisi

Gruplar	CA15-3 (IU/g protein)	VEGF (ng/L protein)	M-CSF (ng/Lprotein)	MMP-9 (ng/Lprotein)	TIMP-1 (ng/mLprotein)
DMBA	363,78±70,43	5346,54±1144,79	5,77±0,57	12,91±2,69	10,91±2,20
DMBA+RAL	174,13±45,99***	4374,00±567,99	4,65±0,75*	7,73±1,28**	13,20±2,63
DMBA+FLX	231,84±56,26**	4537,37±866,94	4,59±0,66*	10,06±3,15	13,71±2,52
DMBA+RAL+FLX	213,98±60,03***	4063,05±894,79*	4,29±0,81**	9,04±2,74*	18,32±2,76***

* DMBA grubuyla kıyaslandığında; $p<0,05$;** DMBA grubuyla kıyaslandığında; $p<0,005$

***DMBA grubuyla kıyaslandığında; $p=0,001$

Bununla birlikte, MMP-9 düzeylerindeki en etkili azalma RAL ile tedavi edilen grupta görülmüştür. TIMP-1 düzeyleri ise kombine grupta istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p=0,001$) (Tablo 11). Elde edilen bulgular

ışığında en önemli TIMP-1 düzeyindeki değişikliklerin gözlemlendiği grubun DMBA+RAL+FLX grubu olduğu düşünülmektedir.

5.5. Doku GSH, MDA Düzeyleri ile Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Gruplara Bağlı Olarak Değişimi

Doku MDA düzeyleri incelendiğinde, DMBA grubuna göre tüm tedavi gruplarında bir azalma gözlenmiştir, ancak bu azalma sadece DMBA+FLX grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). DMBA grubu ile karşılaştırıldığında meme dokusu SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri DMBA+RAL ve DMBA+RAL+FLX gruplarında artmıştır. GSH-Px ve CAT aktivitelerinde görülen artışlar DMBA+RAL+FLX grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,05$). DMBA+RAL ve DMBA+RAL+FLX gruplarının doku GSH düzeyleri DMBA grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,05$)(Tablo 12).

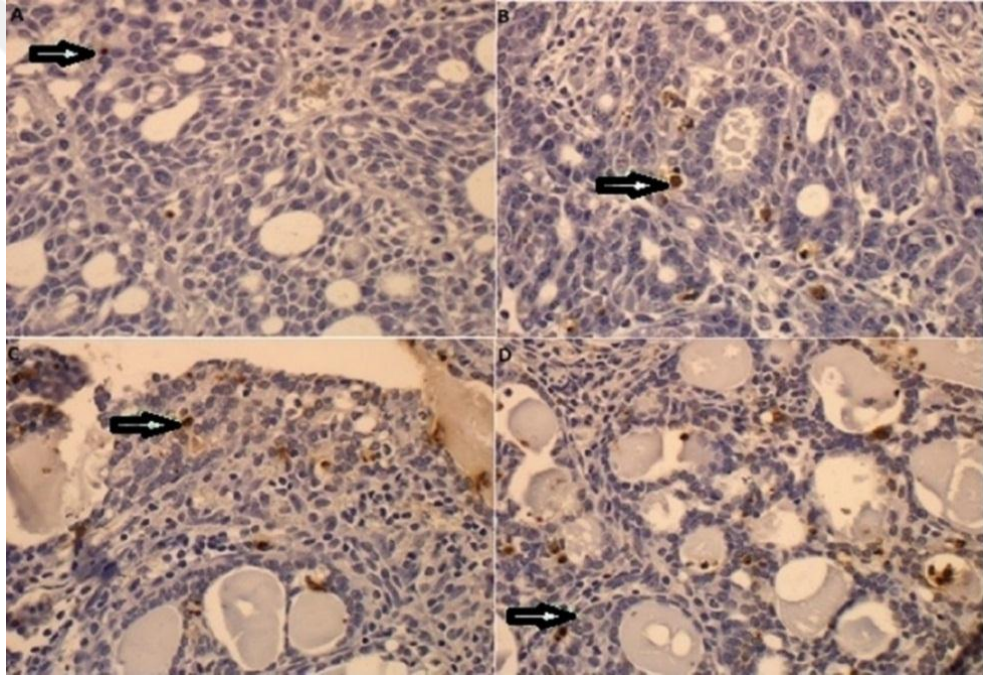
Tablo 12. Meme Dokusunda Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Gruplara Bağlı Olarak Değişimi

Group	MDA (nmol/g protein)	CAT (k/g protein)	GSH-P _x (U/g protein)	SOD (U/g protein)	GSH (μmol/g protein)
DMBA	258,43±77,62	0,12±0,06	198,47±46,74	383,10±120,39	224,02±2,69
DMBA+RAL	137,22±70,47**	0,17 ± 0,09	284,62± 71,85	500,85 ± 91,76	30,07±2,38**
DMBA+FLX	210,24±92,07	0,17 ± 0,10	271,84± 68,80	443,56±153,40	227,62±1,35
DMBA+RAL+FLX	118,28±60,20**	0,39±0,26**	411,25±141,35*	556,55±156,27	30,89±7,01**

* $p<0,001$ DMBA grubu ile karşılaştırma; ** $p<0,05$ DMBA grubu ile karşılaştırma

5.6. Meme Dokusunun Gruplarda Histopatolojik Değerlendirmesi

Işık mikroskobu altında apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyama incelenmesi sonucunda; DMBA grubu ile karşılaştırıldığında (Şekil 2A), TUNEL pozitifliği DMBA+RAL (Şekil 2B), DMBA+FLX (Şekil 2C) ve DMBA+RAL + FLX (Şekil 2D) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,05$). Kombine tedavi (DMBA+RAL+FLX) grubu tek başına tedavi edilen gruplarla karşılaştırıldığında TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bir şekilde artmıştır (Şekil 15). Tüm gruplara ait apoptotik indeks (%) değerleri Tablo 13'de özetlenmiştir.



Şekil 15. DMBA (A), RAL (B), FLX (C) ve RAL + FLX (D) gruplarında TUNEL boyama ile apoptotik hücrelerin görünüşü.

Table 13. Apoptotik İndeks Değerleri

Gruplar	Apoptotik İndeks (%)
DMBA	1,57±0,78
DMBA+RAL	5,14±2,26 ^a
DMBA+FLX	6,16±1,60 ^a
DMBA+RAL+FLX	15,85±1,67 ^a

^aDMBA grubuyla kıyaslandığında ($p<0,05$).

6. TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda en sık rastlanan malignitelerden biri olup, dünyada en fazla görülen ikinci kanser türüdür (120). Sitokimyasal karsinojen olan DMBA, deneysel sıçanlarda meme karsinomunu indüklemek için yaygın olarak kullanılan bir maddedir. DMBA, karsinogenezden sorumlu genlerdeki mutasyonları başlatarak veya teşvik ederek etkisini gösterir (121). Çalışmamızda, meme kanserini indüklemek için kimyasal bir ajan olarak DMBA kullanılmıştır. DMBA etkisi ile oluşturulan deneysel meme kanser modelinde tedavi edici ajanlar olarak Raloksifen ve Fluoksetinin tek başına veya kombine kullanılması ile meme kanseri üzerindeki koruyucu ve tedavi edici etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda meme dokusu CA 15-3 düzeyleri DMBA grubu ile her iki tedavi ajanının ayrı ayrı ve beraber olarak uygulandığı gruplar arasında karşılaştırıldığında uygulanan ajanların varlığında düzeyinin azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu bulguların plazma CA 15-3 düzeyleri ile anlamlı bir ilişki gösterdiği bulunmuştur. Bu durum Fluoksetin ve Raloksifen'in kanserli meme dokusunun büyümesini engellediğini göstermektedir. Literatürde bu tedavi ajanları ile ilgili CA 15-3 düzeylerini araştıran çalışmaların sınırlı olduğu görülmüş olup kanser hücrelerindeki yüksek CA 15-3 düzeyleri ile meme dokusu arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Nitekim Liu ve ark. (122) ile Aksu ve ark.'nın (123) yaptıkları çalışmalarda erken evre meme kanseri hastalarında plazma ve serum CA 15-3 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızın sonuçları da yukarıda belirtilen çalışmaların bulguları ile paralellik göstermiştir. Ancak, Agrawal ve ark.'nın (124) yapmış oldukları çalışmada CA 15-3 düzeylerindeki artışın invaziv duktal karsinomlu

hastalarda anlamlı bir korrelasyon göstermediği belirtilmiş olsada, yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda CA 15-3'ün kanserli hücrelerin metastazında rol oynadığı gösterilmiştir. Böylece kullandığımız tedavi ajanları ile CA 15-3'ü azalttığımız taktirde kanserli hücrenin gelişimini önleyebileceğimizi söyleyebiliriz.

VEGF, trombosit türevli büyüme faktörü gen ailesinin bir üyesidir, fizyolojik ve patolojik anjiogenez, lenfanjiogenez ve vaskülogenezde farklı etkileri olan 3 tirozin kinaz reseptörü ve 5 büyüme faktörü içerir (125). Çalışmamızda DMBA ile meme kanseri oluşturulan sıçanlarda RAL ve FLX tedavisi, bu parametrenin doku düzeylerini önemli ölçüde azaltmıştır ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bununla birlikte, RAL+FLX kombine tedavisinin DMBA ile indüklenen sıçanlara uygulanması ile VEGF doku düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0,05$). Plazma VEGF düzeyleri incelendiğinde ise tedavi ajanlarının ayrı ayrı ve birlikte kullanıldıkları tüm tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir. Şimdiye kadar yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, bu sitokinin aşırı ekspresyonunun kanser büyümesine ve metastaza yol açtığını, VEGF'in inhibe edilmesinin ise tümör gelişiminin baskılanmasıyla sonuçlandığını ortaya koymuştur (126,127). Shivakumar ve ark.'nın yaptığı çalışmada meme kanserli hastalarda serum VEGF düzeylerinin arttığı ve malignite arttıkça VEGF düzeylerinin daha da yükseldiği gösterilmiştir. (128). Yine meme ve jinekolojik neoplazilere sahip hastaların plazmalarında önemli ölçüde artmış VEGF düzeyleri bulunmuştur (126). Artmış VEGF düzeyi, VEGF'in yeni kan damarı üretimine ve tümör gelişimine neden olduğu savını destekler niteliktedir. Bizim çalışmamızda DMBA ile uyarılmış sıçanlara terapötik ajanların

verilmesinden sonra VEGF düzeylerinde görülen azalmalar, TUNEL bulguları ile uyum içerisinde olup özellikle RAL ve FLX'in kombine kullanılması kanserli hücrelerdeki artmış anjiogenezi inhibe ederek bu hücrelerin besin alımını etkin bir şekilde engellediğini ve böylece apoptozu uyararak tümör hücrelerinin büyümesini yavaşlattığını düşündürmektedir. Bu nedenle VEGF inhibisyonu, meme kanserine karşı bir tedavi hedefi olarak görülebilir.

Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (M-CSF), hematopoetik hücrelerin büyümesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyen ana büyüme faktörüdür (129). Monositlerin ve makrofajların tümöre ciddi şekilde infiltrasyonu, tümör büyümesi ve ilerlemesi için gerekli olan besinleri kalıcı olarak sağlayan anjiyogenezi kolaylaştırdığı bilinmektedir (130). M-CSF'nin dolaşım düzeyi, hastaların prognozunu tahmin etmek için sıklıkla kullanılır (131). Over kanserli hastaların asitlerinde ve serumlarında artmış M-CSF ve M-CSF reseptörü düzeyleri kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (131). Kaciński ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada ise, meme kanserli hastalarda M-CSF düzeylerinin arttığı, en yüksek M-CSF konsantrasyonlarının ileri evre meme kanseri türlerinde olduğu gösterilmiştir (132). Çalışmamızda; doku M-CSF düzeylerinin DMBA uygulaması ile anlamlı olarak arttığı, tedavi gruplarının tümünde DMBA grubuna göre doku M-CSF düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmaların olduğu tespit edilmiştir. En önemli azalmaların iki tedavi ajanının birlikte uygulandığı grupta olduğu gözlenmiştir. Yine DMBA grubuna oranla tüm tedavi gruplarındaki plazma M-CSF düzeylerindeki azalmalar ise istatistiksel olarak anlamsız iken, bu düşüşlerin dokudaki bulgularla paralel olması tedavi ajanlarının doku düzeyindeki sitokinleri daha etkin bir şekilde bastırdığını ve plazmaya bu durumun yansıması

için belirli bir sürecin geçmesi gerektiğini düşündürmektedir. DMBA ile artmış M-CSF düzeyleri meme kanserli hücre oluşumlarını tetiklerken, tedavi ajanlarının kombine uygulanmaları anjiogenezi artırıcı özellikli M-CSF'nin etkisini bastırmış gibi yorumlanabilir. Çalışmamızın TUNEL bulguları ile doku/plazma M-CSF düzeylerinin uyumlu olduğu, kombine tedavi ajanlarının kullanımı ile M-CSF'nin inhibe edilmesinin kanserli hücreleri apoptoza götürdükleri şeklinde de yorumlanabilir. Ancak, bu düşüncelerin daha somut bulgulara dönüşebilmesi için daha ileri yolak çalışmaları ile desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

MMP'nin bazı üyeleri meme kanseri olan hastalarda tanı, prognoz, kanserin erken saptanması, risk değerlendirmesi, tümör nüksü, metastatik yayılım ve tedaviye yanıt için kullanılmaktadır (133). Meme kanseri, epitel kaynaklı, güçlü invazyon ve metastaz yeteneği olan bir malign tümördür. Bazal membrandaki matriks degradasyonu, çeşitli alt tiplerde MMP aktivitesi ve TIMP düzeyleri ile yakından ilişkilidir (134). MMP-9, tip IV kollajen, fibronektini degrade etmek ve hücre adezyon gücünü etkilemek için enzimojen formda hücrelerden salgılanır, böylece tümör hücre büyümesi, infiltrasyon ve metastaza neden olur (135) MMP'lerin doku inhibitörü olarak görev yapan TIMP'lar, MMP-9 aktivitesi üzerine spesifik inhibe edici fonksiyonlar gösterebilmesi için doku kompleksi oluşturmak üzere MMP-9 enzimogen formunun katalitik alt birimine veya doku kompleksini oluşturmak için aktive edilmiş enzimlere spesifik olarak bağlanırlar (136,137). TIMP-1'in meme kanseri de dahil olmak üzere birçok insan kanserinde sıklıkla aşırı eksprese edildiği ortaya koyulmuştur (138). Başka bir çalışmada da TIMP-1'in sıklık D1 düzeylerini azaltarak MCF-10A normal meme epitel hücrelerinde hücre büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir. TIMP-1'in

antiproliferatif etkinliğinde birçok farklı sinyal yolağının ve reseptörün görev aldığı bilirse de (139), meme kanseri alt tiplerinde TIMP-1'in bu rolünün altında yatan mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır.

Çalışmamızda, DMBA ile indüklenmiş meme kanserli sıçanlarda artan doku MMP-9 düzeylerinin RAL ve kombine tedavi ajanlarının uygulanması ile istatistiksel olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Plazma MMP-9 düzeyleri ise sadece kombine tedavi ajanı kullanılan grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır. Çalışmamızda DMBA grubuna göre tüm tedavi gruplarında doku TIMP-1 düzeyleri artmış, TIMP-1 plazma düzeyleri ise azalmış olarak tespit edilmiştir. Bu durum;

1-TIMP-1'in lokalizasyonundan kaynaklanmış olabilir. Çünkü, TIMP-1'in plazmaya geçebilmesi için belirli bir süreç gerekmektedir. Bu yüzden doku kaynaklı artmış TIMP-1 düzeylerinin plazma değerlerine yansımadığını düşünmekteyiz.

2- Çalışmamızda artmış doku TIMP-1 düzeylerinin MMP-9 düzeylerini azaltmak için artmış olabileceğini düşünüyoruz ki bu da onarım sürecinin homeostazisinin bir göstergesi olabilir.

Rashad ve ark.nın (140) çalışmasında, sadece meme kanseri olan hastalarda plazma MMP-9 düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Yuan J. ve ark.'nın yaptığı çalışmada meme kanserli hastalarda kemoterapi sonrası tüm hastaların serum MMP-9 düzeylerinde düşüş gözlenirken, TIMP-1 seviyelerinde artış tespit edilmiştir (135). Elde edilen bu sonuçlar çalışmamızla paralellik göstermektedir. Özellikle tedavi ajanlarını kombine olarak kullandığımız grupta azalan doku/plazma MMP-9 ve artan doku TIMP-1

düzeylerinin kimyasal karsinojen olan DMBA'nın tümörögenez etkisini inhibe ettiği ve meme kanseri hücrelerinin hücre dışı göç ve invazyonunu önlediği şeklinde yorumlanabilir.

MDA, lipid peroksidasyonunun ikincil bir ürünü olarak bilinir ve birçok zincir reaksiyonundan kaynaklanan doku hasarının bir belirteci olarak kullanılır (141). Böbrek ve diğer dokularda artmış MDA düzeylerinin fonksiyonel bozulmaya neden olduğu uzun süredir bilinmektedir; Bu nedenle, komplikasyonlara yol açan hayati dokunun bozulması, dolaylı olarak artan oksidatif strese bağlı olabilir (142). Doku MDA düzeylerinin değerlendirildiği çalışmamızda, tedavi gruplarımızın tümünde DMBA grubuna göre doku MDA düzeylerinin düştüğü tespit edilmiştir. Ancak en anlamlı düşüşler DMBA+RAL ve DMBA+RAL+FLX gruplarında gözlenmiştir. Literatür ile bu çalışmadan elde edilen bulgular kıyaslandığında Özden ve ark. (143) tarafından yapılan çalışma bulguları ile zıt yönlü olduğu ancak bazı çalışmaların (144,145) bulguları ile paralellik gösterdiği görülmektedir. Çalışmamızda, DMBA+RAL ve DMBA+RAL+FLX gruplarında anlamlı azalan MDA düzeylerinin DMBA ile indüklenmiş meme karsinogenez sürecinde meydana gelen oksidatif stres sonucu artan lipid peroksidasyonunun Raloksifen tarafından baskılandığını düşündürmektedir. Tek başına tedavi ajanı olarak Raloksifen uygulanan gruba göre, Raloksifen ve Fluoksetinin beraber kullanıldığı grupta MDA değerlerinin daha fazla düşmesi, bu iki ajanın meme kanserli sıçanlar üzerinde kombine kullanılması ile lipid peroksidasyonunu baskılamada sinerjistik etki gösterdikleri söylenebilir (Tablo 12).

Yaptığımız çalışmada, DMBA grubu ile karşılaştırıldığında tüm tedavi

gruplarının meme dokusu SOD, GSH-Px ve CAT aktivitelerinde artışlar izlenmiştir. GSH-Px ve CAT aktivitelerindeki istatistiksel olarak anlamlı artışlar sadece DMBA+RAL+FLX tedavi grubunda saptanmışken, doku SOD aktivitelerindeki artışların tüm tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (Tablo 12). Aşırı büyüyen ve çoğalan kanser hücrelerindeki yetersiz oksijenasyondan dolayı SOD enzim aktivitesinin azaldığını düşünmekteyiz. Çünkü tüm tedavi gruplarındaki SOD aktivitelerindeki artışların anlamlı olmadığı görülmüştür. Bu da SOD aktivitesinin süperoksit anyonlarının detoksifiye etme mekanizmasında ortamdaki oksijen miktarındaki düşüşle paralel olarak yetersiz kalabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca iki ajanın kombine kullanıldığı tedavi grubunda CAT ve GSH-Px'in oksijen yetersizliğine ve lipid peroksidasyonuna bağlı olarak meydana gelen hidroksil radikalleri ve hidroperoksitleri detoksifiye ederek antioksidan özelliklerini gerçekleştirdiklerini düşünmekteyiz. Ayrıca çalışmamızda DMBA gruplarına göre doku GSH düzeyleri tüm tedavi gruplarında artmış olup istatistiksel olarak anlamlı artışlar DMBA+RAL ($p=0,026$) ve DMBA+RAL+FLX ($p=0,009$) gruplarında izlenmiştir. Bu tedavi ajanlarının kombine olarak kullanılan grup ile tek başına Raloksifen kullanılan gruba kıyasla daha anlamlı bir şekilde artması, bu iki ajanın beraber kullanımı ile nonenzimatik antioksidan yolak üzerine sinerjistik etki göstererek enzimatik antioksidan sistemle birlikte antikanserojenik etki gösterdiğini söyleyebiliriz. Literatürde kanser üzerine Fluoksetin'in ve Raloksifen'in ayrı ayrı ve kombine şeklinde kullanılmalarının antioksidan etkilerini araştıran çalışmalar kısıtlı olup Kabel ve ark. (146) tarafından yapılan meme kanseri çalışmasının bulguları ile bizim çalışmamızın bulguları birlikte

değerlendirildiğinde; araştırmacılar bu iki teröpatik ajanın uygulanması ile DMBA grubuna oranla doku CAT ve GSH-Px aktivitelerinin sonuçları bizim çalışmamızla örtüşmekte iken SOD aktivitesinde iki çalışmada da artmış olmasına rağmen bizim çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre tedavi ajanı olarak uygulanan Fluoksetin ve Raloksifen'in kombine kullanımlarının DMBA ile oluşturulmuş meme kanseri üzerindeki terapötik etkilerini; enzimatik/nonenzimatik antioksidan sistemi kullanarak ortaya çıkardığı şeklinde düşünülebilir.



KAYNAKLAR

- 1) Ruddon, W.R. Cancer Biology Fourth Edition. Oxford University Press Inc., New York, USA, 2007.
- 2) Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. Nat Rev Cancer. 2006; 6:924-35.
- 3) Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. CA Cancer J Clin. 2016;66 :7-30.
- 4) Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Türkiye Sağlık İstatistikleri. Ankara 2017
- 5) Moscow JA, Cowan KH. Biology of Cancer. In: Goldman L, Schafer AI. (Editors). Cecil Medicine. 24 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 1184.
- 6) Breast Cancer Facts & Figures 2018”. <https://www.cancer.org>. 05.12.2018.
- 7) Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. CA Cancer J Clin. 2014;64:9-29.
- 8) “Kanser Taramaları”. <http://kanser.gov.tr> 18.05.2018.
- 9) Driedger SM, Eyles J. Organochlorines and breast cancer: the uses of scientific evidence in claims making. Soc Sci Med. 2001; 52: 1589-1605.
- 10) Colak T, Akca T, Dirlik M et al. Signet ring cell carcinoma of the breast as a source of pelvic floor metastatic mass. Acta Chir Belg. 2005; 105: 224-226.
- 11) Topuz E, Aydın A, Dinçer M. Meme Kanseri. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2003: 349-350.
- 12) Aslan FE, Gürkan A. Kadınlarda meme kanseri risk düzeyi. Meme Sağlığı Dergisi. 2007; 3: 63-68.
- 13) Hiatt RA, Haslam SZ, Osuch J; Breast Cancer and the Environment Research Centers. The breast cancer and the environment research centers: transdisciplinary research on the role of the environment in breast cancer etiology. Environ Health Perspect 2009;117:1814-22.
- 14) “International Agency for Research on Cancer, IARC.” <http://www.iarc.fr/> 19.05.2018.
- 15) Jones JL, Hughes KS, Kopans DB et al. Evaluation of hereditary risk in a mammography population. Clin Breast Cancer. 2005; 6:38-44.

- 16) Topuz E., Aydiner A., Karadag, A. Klinik Onkoloji Kitabı. İstanbul. Tunç Matbaası 2000; 35-39.
- 17) Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. CA Cancer J Clin. 2006; 56 :37-47.
- 18) Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000; 406:747-752.
- 19) Sorlie T, Tibshirani R, Parker J et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100:8418-8423.
- 20) Parker JS, Mullins M, Cheang MC et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. J Clin Oncol. 2009; 27:1160-1167.
- 21) Eliyatkin N, Yalcın E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way J Breast Health 2015; 11: 59-66.
- 22) Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. Oncologist. 2004; 9: 361-377.
- 23) Öztürk M. Meme Kanserinin Genetiği ve Risk Faktörleri. Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No: 54. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, 2006;15-26.
- 24) Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, et al. HER-2 testing by local, central and reference laboratories in specimen from the North Central Cancer Treatment Group N9831 inter group adjuvant trial. J Clin Oncol 2006; 24: 3032-3038.
- 25) Yip KW, Reed JC: Bcl-2 family proteins and cancer. Oncogene. 2008; 27: 6398-6406.
- 26) Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. Eur J Cancer 1999; 15: 531-539.
- 27) Puget N, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D et al. An Alu-mediated 6-kb duplication in the BRCA1 gene: a new founder mutation? Am J Hum Genet. 1999; 64:300-302.
- 28) Lixia M, Zhijian C, Chao S, Chaojiang G, Congyi Z. Alternative splicing of breast cancer associated gene BRCA1 from breast cancer cell line. J Biochem Mol Biol. 2007 31;40:15-21.

- 29) Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*. 2002; 108:171-182.
- 30) Abaji C, Cousineau I, Belmaaza A. BRCA2 regulates homologous recombination in response to DNA damage: implications for genome stability and carcinogenesis. *Cancer Res*. 2005; 65:4117-25.
- 31) Ayoub N, Rajendra E, Su X et al. The carboxyl terminus of BRCA2 links the disassembly of Rad51 complexes to mitotic entry. *Curr Biol*. 2009; 19:1075-85.
- 32) Orelli BJ, Bishop DK. BRCA2 and homologous recombination. *Breast Cancer Res*. 2001; 3:294-298.
- 33) Latonen L, Laiho M. Cellular UV damage responses--functions of tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1755:71-89.
- 34) Brooks SA, Harris A. SDS-PAGE and Western Blotting to Detect Proteins and Glycoproteins of Interest in Breast Cancer Research In: Osborne C, Brooks SA, editors. *Breast Cancer Research Protocols*. Totowa. New Jersey, Humana Press, 2006; 120; 217-229.
- 35) Hanazono K, Natsugoe S, Stein HJ et al. Distribution of p53 mutations in esophageal and gastric carcinomas and the relationship with p53 expression. *Oncol Rep*. 2006; 15: 821-824.
- 36) Van Den Brandt Pa¹, Spiegelman D, Yaun SS et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol*. 2000 ;152 :514-527.
- 37) Xue F, Michels KB. Diabetes, metabolic syndrome, and breast cancer: a review of the current evidence. *Am J Clin Nutr*. 2007; 8:823-835.
- 38) Osborne MP. Breast development and anatomy. In: Haris JR, Lippman ME, MorrowM, Hellman S,Eds. *Diseases of the breast*. New York: Lippincott-Raven 1996: 1–14.
- 39) Ross MH, Romrell LJ. *Histology. A text and atlas*. Baltimore: Williams and Wilkins,1989.
- 40) Romrell LJ, Bland KI. Anatomy of the breast, axilla, chest wall, and related metastatic sites. In: Bland KI, Copeland EM III, eds. *The breast: comprehensive management of benign and malignant diseases*, 4th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2009 :21–38.

- 41) Kirby IB, Coppeland EM. Breast. Principles of surgery, vol 1. Eds. Seymour IS, Shires GT, Spencer FC, Husser WC. 6th edition. Mc Graw Hill, New York: 1994;531: 93.
- 42) Steiner M, Brown E, Trzepacz P et al. Fluoxetine improves functional work capacity in women with premenstrual dysphoric disorder. Arch Womens Ment Health. 2003;6:71-77.
- 43) Taylor MJ, Rudkin L, Hawton K. Strategies for managing antidepressant-induced sexual dysfunction: systematic review of randomised controlled trials. J Affect Disord. 2005; 88:241-254.
- 44) David DJ, Samuels BA, Rainer Q et al. Neurogenesis-dependent and independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. Neuron. 2009; 62:479-493.
- 45) Kayaalp O. Akılcıl Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2012;651-825.
- 46) Stahl SM. Stahl'ın Temel Psikofarmakolojisi: İstanbul Tıp Kitabevi; 2015; 268-298.
- 47) Dai J, Liao N, Shi J, Tao JQ. Study of prevalence and influencing factors of depression in tumor patients and the therapeutic effects of fluoxetine. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2017; 21: 4966-4974.
- 48) Khovidhunkit W, Shoback DM. Clinical effects of raloxifene hydrochloride in women. Ann Intern Med. 1999; 130:431-439.
- 49) Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators - Mechanisms of action and application to clinical practice. N Engl J Med 2003; 348: 618-629.
- 50) Zanchetta JR, Talbot JR. Raloxifeno. In Osteoporosis. Buenos Aires (Argentina). Ed, Panamericana, 2001; 359-65.
- 51) Hibner M, Magrina JF, Lefler SR et al. Effects of raloxifene hydrochloride on endometrial cancer cells in vitro, Gynecologic Oncology 2004; 93: 642-646.
- 52) Martino S, Cauley JA, Barrett-Connor E et al. Continuing outcomes relevant to evista: breast cancer incidence in postmenopausal osteoporotic women in a randomized trial of raloxifene, Journal of the National Cancer Institute 2004; 96: 1751-1761.
- 53) Bryant HU. Mechanism of action and preclinical profile of raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders 2001; 2: 129-138.

- 54) Martino S, Cauley JA, Barrett-Connor E et al. Cummings SR, Continuing outcomes relevant to evista: breast cancer incidence in postmenopausal osteoporotic women in a randomized trial of raloxifene, Journal of the National Cancer Institute 2004; 96: 1751-1761.
- 55) Cauley JA, Norton L, Lippman ME et al. Continued breast cancer risk reduction in postmenopausal women treated with raloxifene: 4-year results from the MORE trial, Breast Cancer Research and Treatment 2001; 65, 125–134.
- 56) Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. Nat Rev Cancer 2009; 9: 874-85.
- 57) Antony W. Burch, Nicole A. Massol, Alex A. Pappas. Tumor markers in Clinical Chemistry. Principles, procedures, correlations. Michael L. Bishop Janet L. Duben, Engel Kirk Edward P. Fody, Eds. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, 4th edd. 2000: 522-36.
- 58) Türkçapar N., Özden A. Tümör markırları ve klinik önemi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Kültür ve Spor Dairesi, İç Hastalıkları ve Romatoloji Bölümü 1, Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Ankara 2005;2-6.
- 59) Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. Clin Sci (Lond). 2005; 109:227–41.
- 60) Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. Crit Rev Oncol Hematol 2007; 62: 179–213.
- 61) Demirci, U. Karaciğer Hastalıklarında Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) Düzeyleri. Uzmanlık Tezi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi 3. İç Hastalıkları Kliniği, 2006); 24-39.
- 62) Erol, N. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü ve Anti- VEGF Ajanlar. Ret- Vit Özel Sayı 2007; 15: 35-40.
- 63) Tonbalaklar PB. Romatoid Artritli Hastalarda Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Düzeylerinin Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı, İstanbul 2008; 21-28.

- 64) Linderholm B, Lindh B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. p53 and vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) expression predicts outcome in 833 patients with primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 2000; 89: 51-62.
- 65) Linderholm B, Grankvist K, Wilking N et al. Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1423-1431.
- 66) Rosen LS. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control* 2002; 9: 36-44.
- 67) Entrez Gene: CSF1 colony stimulating factor 1 (macrophage) URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1435> 20.05.2018.
- 68) Akt signaling pathway. Product Pathways. Cell Signaling Technology, Inc. <http://www.cellsignal.com/pathways/akt-signaling.jsp>. 21.05.2018.
- 69) Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* 2005; 9 :59–71.
- 70) Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K et al. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J. Clin. Invest.* 2003; 112:197–208.
- 71) Gary S. A Malignant Flame. *Scientific American* 2007;46–9.
- 72) Aliustaoğlu M. Temel Kanser Fizyopatolojisi. *Klinik Gelişim* 2009; 22: 46-49.
- 73) Öncel M. Matriks Metalloproteinazlar ve Kanser. *Eur J Basic Med Sci* 2012;2: 91-100.
- 74) Apakkan Aksun S, Bayındır O, Özmen D, Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili Fizyolojik ve Patolojik Durumlar. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri* 2001; 21: 332–42.
- 75) Soydinç HO, Çamlıca H, Duranyılmaz D, et al. Matriks metalloproteinazlar ve akciğer kanseri. *Türk Onkoloji Dergisi* 2006; 21:53–56.
- 76) Michael Lieberman ADM. Marks' Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach: Lippincott Williams & Wilkins; Third, North American Edition edition 2008.
- 77) Fingleton B. Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. *Front Biosci* 2006; 11:479-491.
- 78) Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV et al. Expression of matrix metalloproteinase

- (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. Clin Cancer Res 2004; 10:7621-7628.
- 79) Manicone AM, Mc Guire JK. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. Semin. Cell Dev Biol 2008; 19: 34–41.
 - 80) Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Biochim Biophys Acta. 2000; 1477:267-283.
 - 81) Lambert E, Dasse' E, Haye B, Petitfre're M. TIMPs as multifacial proteins. Critical Reviews in Oncology/Hematology 2004; 49: 187–198.
 - 82) Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. FEBS Letters 1992; 298: 29-32
 - 83) Li G, Fridman R, Kim HR. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. Cancer Research 1999; 59: 6267-6275.
 - 84) Joo YE, Seo KS, Kim HS et al. Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in gastric cancer. Digestive Diseases and Sciences 2000; 45: 114-121.
 - 85) Steffensen KD, Waldstrøm M, Christensen RK et al. Lack of relationship between TIMP-1 tumour cell immunoreactivity, treatment efficacy and prognosis in patients with advanced epithelial ovarian cancer. BMC Cancer 2010; 10: 185.
 - 86) Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact. 2006; 160:1-40.
 - 87) Bayraktar M, Kılıç S, Özdemir İ, Aydemir S, Ulu R, The Investigation of Serum Malondialdehyde Levels and Erythrocyte Antioxidant Enzymes in Hypertension Patients. J Healt Sci. 2005; 14: 76-81.
 - 88) Michael Lieberman ADM. Marks' Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach: Lippincott Williams & Wilkins; Third, North American Edition edition 2008.
 - 89) Nicholls P, Fita I, Loewen PC, Enzymology and Structure of Catalases. Advances in Inorganic Chemistry 2000;51: 51-106.
 - 90) Dan E. Robertson, Catalases, U.S.P. No: 20040005655, 2004.

- 91) Burk RF, Nishiki K, Lawrence RA, Chance B. Peroxide removal by selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidases in hemoglobin-free perfused rat liver. J Biol Chem. 1978 ; 253:43-46.
- 92) Yazıcıoğlu Ç. Fetal Hidrosefali ve Nöral Tüp Defekti Olan Gebelerde Total Oksidan Seviye, Total Antioksidan Kapasite, Oksidatif Stres İndeksinin Değerlendirilmesi: Prospektif Kontrollü Klinik Çalışma. Tıpta Uzmanlık Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, 2008.
- 93) Murray R, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's Biochemistry. 26th ed. Mc Graw Hill Co, 2003.
- 94) Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Derg.1997;3: 92-95.
- 95) İnan, D.Cu Zn SOD, GSH-Px ve TAS düzeylerinin diabetik vakalara verilen antioksidan tedavi sonrası değişimi. Biyokimya Uzm. Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Ankara Numune Hastanesi, 1998.
- 96) Necheles TF, Boles TA, Allen DM. Erythrocyte glutathione peroxidase deficiency and hemolytic disease of the newborn infant. The Journal of Pediatrics, 1968;72: 319-324.
- 97) Oztürk, M., Güzelhan, Y., Sayar, K., Tüzün, U. Yaygın gelişimsel bozukluğu olan çocuklarda plazma malondialdehit ve glutatyon düzeylerinin araştırılması. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni 2001; 11:155-159.
- 98) Meister, A. Larsson, A. Glutathione synthetase deficiency and other disorders of the γ -glutamyl cycle. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic basis of inherited disease. 6th ed. New York: McGraw-Hill 1989; 855–868.
- 99) Martensson, J. Lai, JCK. Meister, A. High affinity transport of glutathione is part of a multi-component system essential for mitochondrial function. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990); 87: 7185–7189.
- 100) Chai YC, Ashraf SS, Rokutan K, Johnston RB Jr, Thomas JA. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. Arch Biochem Biophys 1994; 310:273-281.

- 101)** Reed DJ, Fariss MW. Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol Rev* 1994; 36: 235–335.
- 102)** Deveci HA. Mastitisli (meme iltihabı) ineklerde kan MDA ve GSH düzeylerinin araştırılması, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kars, 2007.
- 103)** Yerer MB, Aydoğan S. Oksidatif stres ve antioksidantlar. *Erciyes Üniv Sağlık Bilimleri Dergisi* 2000; 9: 49-53.
- 104)** Esterbauer H, Cheeseman KM, Dianzani MU, Poli G, Slater TF. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidations stimulated in rat liver microsomes. *Biochem J*. 1982; 208: 129-140.
- 105)** Yerer MB, Aydoğan S. Oksidatif stres ve antioksidantlar. *Erciyes Üniv Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2000; 9: 49-53.
- 106)** Bolaman Z, Demir S, Köseoğlu MH, Enli Y, Kadıköylü G, Aslan D. Multipl myelomalı hastalarda lipid peroksidasyonu (ön çalışma). *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2000; 1:13-15.
- 107)** Akkuş İ Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya,1995.
- 108)** Yoneyama Y, Sawa R, Suzuki S, Doi D, Yoneyama K, Otsubo Y, Araki T. Relationship between plasma malondialdehyde levels and adenosine diaminase activities in pre-eclampsia. *Clin Chim Acta* 2002; 322: 169-173.
- 109)** Batcioglu K., Karagözler AA., Ozturk IC et al. Comparison of chemopreventive effects of vitamin E plus selenium versus melatonin in 7,12- dimethylbenz(a)anthracene induced mouse brain damage, *Cancer Detection and Prevention* 2005; 29: 54–58.
- 110)** Khaidakov M., Bishop ME., Manjanatha MG., et al. 2001, Influence of dietary antioxidants on the mutagenicity of 7,12- dimethylbenz(a)anthracene and bleomycin in female rats, *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2001;163: 480–481.
- 111)** DiGiovanni J, Juchau MR. Biotransformation and bioactivation of 7, 12- dimethylbenz[a]anthracene (7, 12-DMBA). *Drug Metab Rev*. 1980;11: 61-101.

- 112) Batcioglu K, Karagözler AA, Ozturk IC, et al. Comparison of chemopreventive effects of vitamin E plus selenium versus metatoinin in 7,12-Dimethyl benz[a]anthracene-induced Mouse brain damage. *Cancer Detect Prev* 2005;29: 54-58.
- 113) Keskin, E. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlardan Benzo[A]Piren Ve 7,12 Dimetilbenz[a]Antrasen'in Kalem Grafit Elektrot Kullanarak Adsorptif Sıyırma Voltametrisi Yöntemiyle Redoks Özelliklerinin İncelenmesi Ve Miktar Tayini. Doktora tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van, 2009.
- 114) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL andRandall RJ. 1951 Protein measurementwiththefolinphenolreagent. *Journal of BiologicalChemistry* 193: 265-275.
- 115) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assayforlipidperoxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95: 351-358.
- 116) Paglia DE, Valentine WN. Studies on the Quantitive and Qualitative Characterization of Erythrocyte GPx. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-69.
- 117) Aebi, H. Catalase. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press 1974; 673e678.
- 118) Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988; 34: 497-500.
- 119) Beutler E, Dubon O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 1963; 61: 882-888.
- 120) Amoury M, Kolberg K, Pham AT et al. Granzyme B-based cytolytic fusion protein targeting EpCAM specifically kills triple negative breast cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in a subcutaneous mouse tumor model. *Cancer Lett*. 2016; 372:201-209.
- 121) Karnam KC, Ellutla M, Bodduluru LN et al. Preventive effect of berberine against DMBA-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. *Biomed Pharmacother*. 2017 Aug; 92:207-214.
- 122) Liu C, Sun B, Xu B, et al. A panel containing PD-1, IL-2R α , IL-10, and CA15-3 as a biomarker to discriminate breast cancer from benign breast disease. *Cancer Manag Res*. 2018; 10: 1749–1761.

- 123) Aksu G, Duman C, Gurbuz Y, Ercin C, Canturk Z, Utkan Z, Dulger M. Correlation between c-erbB2 expression, lymphovascular invasion and other biological and clinical prognostic factors and pre-operative tumor markers in patients with early-stage and locally advanced breast cancer. *J Buon* 2011; 16:52-57
- 124) Agrawal AK, Jelen M, Rudnicki J et al. The importance of preoperative elevated serum levels of CEA and CA15-3 in patients with breast cancer in predicting its histological type. *Folia Histochem Cytobiol.* 2010; 48: 26-29.
- 125) Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 62: 179–213.
- 126) Byrne GJ, McDowell G, Agarawal R et al. Serum vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Anticancer Res.* 2007; 27(5B):3481-3487.
- 127) Saharinen P, Eklund L, Pulkki K, Bono P, Alitalo K. VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis. *Trends Mol Med.* 2011; 17:347-62.
- 128) Shivakumar S, Prabhakar BT, Jayashree K, Rajan MGR, Salimath BP. Evaluation of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density (MVD) as prognostic indicators in carcinoma breast. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135:627–36.
- 129) Chockalingam SY, Ghosh SS. Macrophage colony-stimulating factor and cancer: a review. *Tumour Biol.* 2014; 35: 10635-44.
- 130) Bock F, Onderka J, Dietrich T et al. Blockade of VEGFR3-signalling specifically inhibits lymphangiogenesis in inflammatory corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008; 246:115–119.
- 131) Chambers SK, Kacinski BM, Ivins CM, Carcangiu ML. Overexpression of epithelial macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and CSF-1 receptor: a poor prognostic factor in epithelial ovarian cancer, contrasted with a protective effect of stromal CSF-1. *Clin Cancer Res.* 1997; 3: 999-1007.
- 132) Kaciński BM. CSF-1 and its receptor in ovarian, endometrial and breast cancer. *Ann Med* 1995; 27: 79-85.
- 133) Wu ZS, Wu Q, Yang JH et al. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int J Cancer.* 2008; 122:2050-6.

- 134) Fernandez-Garcia B, Eiró N, Marín L, González-Reyes S et al. Expression and prognostic significance of fibronectin and matrix metalloproteases in breast cancer metastasis. *Histopathology*. 2014;64:512-522.
- 135) Yuan J, Xiao C, Lu H et al. Effects of various treatment approaches for treatment efficacy for late stage breast cancer and expression level of TIMP-1 and MMP-9. *Cancer Biomark*. 2018:1-7.
- 136) Katunina AI, Gershtein ES, Ermilova VD et al. Matrix metalloproteinases 2, 7, and 9 in tumors and sera of patients with breast cancer, *Bull Exp Biol Med* 2011;151: 359–362.
- 137) Bucan V, Mandel C, Bertram A et al. LEF-1 regulates proliferation and MMP-7 transcription in breast cancer cells, *Genes Cells* 2012; 17: 559–567.
- 138) Ries C . Cytokine functions of TIMP-1. *Cell Mol Life Sci*. 2014; 71: 659-72.
- 139) Kobuch J, Cui H, Grunwald B et al. TIMP-1 signaling via CD63 triggers granulopoiesis and neutrophilia in mice. *Haematologica*. 2015; 100:1005–1013.
- 140) Rashad YA, Elkhodary TR, El-Gayar AM, Eissa LA. Evaluation of serum levels of HER2, MMP-9, nitric oxide, and total antioxidant capacity in Egyptian breast cancer patients: correlation with clinico-pathological parameters. *Sci Pharm*. 2013; 82: 129–145.
- 141) Shao Y, Sun X, He Y, Liu C, Liu H. Elevated Levels of Serum Tumor Markers CEA and CA15-3 Are Prognostic Parameters for Different Molecular Subtypes of Breast Cancer. *PLoS One*. 2015;10(7):e0133830
- 142) Nieder C, Dalhaug A, Haukland E, Mannsaker B, Pawinski A. Prognostic Impact of the Tumor Marker CA 15-3 in Patients With Breast Cancer and Bone Metastases Treated With Palliative Radiotherapy. *Journal of clinical medicine research J Clin Med Res*. 2017;9: 183-187.
- 143) Özden TA, Beyhan Ö, Saner G, et al. MDA, ZN and GSH Levels in Breast Cancer. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2004; 2: 59-64.
- 144) Huang YL, Sheu JY, Lin TH. Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clin Biochem*. 1999; 32:131-136.

- 145)** Wang M, Dhingra K, Hittelman WN et al. Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996 ;5:705-710.
- 146)** Kabel AM, Elkhoely AA. Ameliorative potential of fluoxetine/raloxifene combination on experimentally induced breast cancer. *Tissue and Cell* 2016; 48: 89–95.



ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Elazığ'da doğdum. İlkokulu Tevfik Yaramanoğlu İlköğretim Okulunda tamamladım. Orta ve Lise Öğrenimimi Bilgem Kolejinde 2004 yılında tamamladım. 2005 yılında yapılan Üniversiteye Giriş Sınavı sonucunda Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde yükseköğrenimime başladım. 5 yıllık temel eczacılık eğitimimi 2011 yılında tamamlayarak aynı fakülteden mezun oldum. Vatani görevimi, 2012 yılında Şırnak 23.cü Jandarma Sınır Tümen Komutanlığı Askeri Hastanesinde tamamladım. Halen Elazığ'da serbest eczacı olarak görev yapmaktayım. Evli ve 2 çocuk babası olup iyi derecede İngilizce bilmekteyim.