

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

SIÇAN MEME KANSER MODELİNDE NAR EKSTRESİ ve
TANGERETİNİN KORUYUCU ETKİNLİĞİ

DOKTORA TEZİ

Hüseyin Fatih GÜL

ELAĞIĞ, 2018

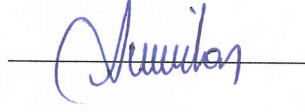
ONAY SAYFASI



Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu Tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

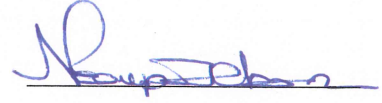


Prof. Dr. Nevin İLHAN

Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Necip İLHAN



Danışman

Doktora Tezi Sınavı Jüri Üyeleri

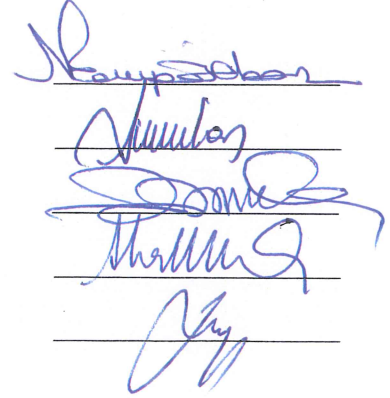
Sayın Prof. Dr. Necip İLHAN

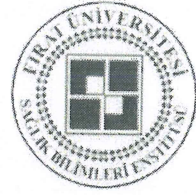
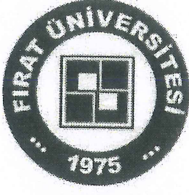
Sayın Prof. Dr. Nevin İLHAN

Sayın Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU

Sayın Prof. Dr. Aslıhan AVCI

Sayın Prof. Dr. B. İmge ERGÜDER





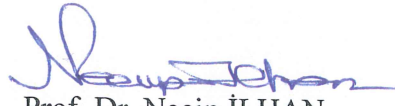
ETİK BEYAN

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.

HÜSEYİN FATİH GÜL

TARİH 12/09/2018

İMZA


Prof. Dr. Necip İLHAN

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ELAZIĞ

TEŞEKKÜR

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki, doktora eğitimimde, her konuda desteğini esirgemeyen ve özellikle pratik ve teorik olarak yetişmemde büyük emeği olan aynı zamanda böyle bir tezin ortaya çıkmasında büyük yardımlarını gördüğüm danışmanım ve çok Kıymetli Hocam Prof. Dr. Necip İLHAN'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Doktora eğitimim ve tez aşamamda her konuda bilgi ve tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemediği gibi kendisinden çok şey öğrendiğim sayın Anabilim Dalı Başkanımız ve Değerli Hocam Prof. Dr. Nevin İLHAN'a ve Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Ferit GÜRSU, Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ, Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU, Prof. Dr. Süleyman AYDIN, Prof. Dr. Dilara KAMAN'a teşekkür ve saygılarımı sunarım. Çalışmam sırasında desteklerinden dolayı Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Değerli Hocam Prof. Dr. İbrahim Hanifi ÖZERCAN'a, Histoloji Anabilim Dalı Dr. Öğretim Üyesi Tuncay KULOĞLU'na ve emeği geçen asistan arkadaşlarıma katkılarından dolayı teşekkür ederim. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında görevli ve çok kıymetli Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı çalışanları, Bingöl Üniversitesi Merkez Laboratuvarında görevli tüm personellere yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Son olarak tez çalışmalarımın dolaylı ihmal ettiğim biricik oğlum Yiğit Gül'e ve eşim Öğr. Gör. Meltem Gül'e ve tüm ailemize teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu tez çalışmasını TF. 16.37 no'lu proje ile destekleyen FÜBAP, ÖYP birimlerine ve FÜDAM personellerine desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Arş. Gör. H. Fatih GÜL

İTHAF

*Değerli hocam Prof. Dr. Necip İLHAN'a,
Canım ailem ve biricik oğluma*



İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	iii
İTHAF	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
KISALTMALAR LİSTESİ	xv
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Meme	7
3.1.1. Memenin Embriyolojisi	7
3.1.2. Memenin Anatomi ve Histolojisi	8
3.1.3. Memenin Fizyolojisi ve Biyokimyası	11
3.1.4. Sıçanlarda Meme Anatomisi ve Histolojisi	15
3.2. Kanser ve Karsinogenez Süreci	17
3.3. Karsinogenez Sürecine Etki Eden Faktörler	19
3.3.1. Serbest Radikaller ve Etkileyen Faktörler	19
3.3.1.1. Lipid Peroksidasyonu ile İlgili Parametre	20
3.3.1.1.1. MDA	20
3.3.2. Antioksidanlar ve Etkileyen Faktörler	23
3.3.2.1. Enzimatik Antioksidanlar ile İlgili Parametreler	24
3.3.2.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1.)	24
3.3.2.1.2. Katalaz (CAT) (EC, 1.11.1.6)	25

3.3.2.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) (EC 1.11.1.9)	25
3.3.3. Anjiyogenez ve Etkileyen Faktörler	28
3.3.3.1. Anjiyogenez ile İlgili Parametreler	31
3.3.3.1.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF, VPF)	31
3.3.3.1.2. Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9, Jelatinaz B)	33
3.3.3.1.3. Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB)	37
3.3.4. Hücre Siklusu ve Proliferasyonunu Etkileyen Faktörler	41
3.3.4.1. Hücre Siklusu ve Proliferasyonu ile İlgili Parametreler	44
3.3.4.1.1. Hücre Replikasyonunda Siklin D1 (cyc/cln, CCND1)	44
3.3.4.1.2. Hücre Proliferasyonunda Spesifik Sinyal Yolu Wnt/β-katenin	46
3.3.5. Apoptozis ve Etkileyen Faktörler	50
3.3.5.1. Apoptozis ile İlgili Parametreler	52
3.3.5.1.1. Apoptozis Regülasyonunda p53 (TP53, tümör proteini 53)	52
3.3.5.1.2. Apoptozis Regülasyonunda Bcl-2 ve Bax	54
3.4. Meme Kanseri	56
3.4.1. Meme Kanseri ve Tarihçesi	56
3.4.2. Meme Karsinomlarının Epidemiyolojisi	58
3.4.3. Meme Karsinomlarının Etiyolojisi ve Risk Faktörleri	63
3.4.3.1. Demografik Özellikler	64
3.4.3.2. Endokrin Etkenler	65
3.4.3.2.1. Reprodüktif Öykü	65
3.4.3.2.2. Endojen Hormonlar	67
3.4.3.2.3. Ekzojen Hormonlar	69
3.4.3.3. Aile Hikayesi ve Genetik Yatkınlık	70
3.4.3.4. Çevresel Etkenler	72

3.4.3.5. Diğer Etkenler	74
3.4.4. Meme Kanserinin Sınıflandırılması	77
3.4.4.1. Meme Kanserlerinde Histopatolojik Sınıflandırma	77
3.4.4.2. Meme Kanserinin Moleküler ve İmmunohistokimyasal Sınıflandırılması	79
3.4.5. Meme Kanserlerinin Evrenmesi	80
3.4.6. Meme Kanserinde Prognostik, Prediktif Faktörler ve Tümör Belirleyicileri	82
3.4.6.1. Aksiller Lenf Nodu Tutulumu	82
3.4.6.2. Tümör Çapı	83
3.4.6.3. Tümörün Histolojik Karakteri	83
3.4.6.4. Tümörün Differansiyasyon Derecesi	83
3.4.6.5. Proto-Onkogen Aktivasyonu	83
3.4.6.6. Hücre Proliferasyon Belirteçleri	84
3.4.6.6.1. Proliferasyon Belirteci Ki-67 İndeksleme (Tutulumu, Histoskoru)	85
3.4.6.7. Hormon Reseptörleri	86
3.4.6.7.1. Östrojen Reseptörleri ve Meme Kanseri ile İlişkileri	86
3.4.6.8. Meme Kanseri ile İlişkili Tümör Belirteçleri	92
3.4.6.8.1. Karsinoembriyjenik Antijen (CEA)	93
3.4.6.8.2. Kanseri Antijen 15-3 (CA 15-3)	94
3.4.7. Meme Kanseri Önlemede Fitoterapinin Yeri ve Polifenol Bileşikler	95
3.4.7.1. Narın Yapısı ve Koruyucu Etkileri	98
3.4.7.1.1. Nar'ın Kanseri Üzerine Koruyucu Etkileri	100
3.4.7.1.2. Narın Meme Kanseri ile İlişkisi	104
3.4.7.2. Tangeretin'in Yapısı ve Koruyucu Etkileri	108

3.4.7.2.1. Tangeretin'in Kanser Üzerine Koruyucu Etkileri	109
3.3.7.2.2. Tangeretin'in Meme Kanseri ile İlişki	119
3.4.8. Kimyasal Karsinogenler ve Deneysel Kanser Modeli	123
3.4.8.1. Deneysel Meme Kanseri Modeli	123
3.4.8.2. DMBA ve Etki Mekanizması	124
4. GEREÇ ve YÖNTEM	127
4.1. Gereç	127
4.1.1. Hayvan Materyali ve Deney Grupları	127
4.1.2. DMBA İle İndüklenmiş Meme Kanseri Protokolünün Oluşturulması	130
4.1.3 Kullanılan Kimyasal Ajanlar ve Hazırlanışları	131
4.1.4. Hayvan Materyallerinden Numunelerin Alınması, Hazırlanması ve Saklanması	132
4.1.4.1. Kan Numunelerinin Alınması, Hazırlanması ve Saklanması	132
4.1.4.2. Doku Numunelerinin Alınması, Hazırlanması ve Saklanması	133
4.2. Yöntemler	133
4.2.1. Biyokimyasal Yöntemler	133
4.2.1.1. Enzim İmmun Ölçüm Yöntemleri	133
4.2.1.1.1. Plazma CA 15-3 Düzeylerinin Belirlenmesi	134
4.2.1.1.2. Plazma CEA Düzeylerinin Belirlenmesi	136
4.2.1.1.3. Plazma VEGF Düzeylerinin Belirlenmesi	136
4.2.1.1.4. Plazma MMP-9 Düzeylerinin Belirlenmesi	137
4.2.1.1.5. Plazma NF- κ B Düzeylerinin Belirlenmesi	137
4.2.1.2. Doku Numunelerinin Homojenizasyonu	138
4.2.1.3 Lowry Yöntemine Göre Protein Düzeylerinin Tayini	138
4.2.1.4. Doku Numunelerinde Oksidan-Antioksidan Parametrelerin Belirlenmesi	139

4.2.1.4.1. Doku MDA Düzeyinin Belirlenmesi	139
4.2.1.4.2. Doku SOD Aktivitesinin Belirlenmesi	140
4.2.1.4.3. Doku CAT Aktivitesinin Belirlenmesi	141
4.2.1.4.4. Doku GSH-Px Aktivitesinin Belirlenmesi	142
4.2.1.4.5. Doku GSH Düzeyinin Belirlenmesi	143
4.2.1.5. Western Blot Yöntemi	144
4.2.1.5.1. Western Blot Analizi için Dokuların Hazırlanması ve Total Protein Tayini	145
4.2.1.5.2. Western Blot Analizinin Uygulama Aşamaları	146
4.2.2. Histopatolojik, İmmunohistokimyasal ve TUNEL Analizleri	154
4.2.2.1. Histopatolojik Analizler	155
4.2.2.2. İmmunohistokimyasal Analizler	155
4.2.2.3. TUNEL Metodu	157
4.2.3. İstatistiksel Analizler	159
5. BULGULAR	161
5.1. Gruplara Ait Genel Makroskopik Değerlendirmeler	161
5.2. Gruplara Ait Vücut Ağırlıkları ve Büyüme Oranları	164
5.3. Gruplara Ait Biyokimyasal Bulgular	165
5.3.1. Plazma CA 15-3 ve CEA Düzeyleri	165
5.3.2. Plazma VEGF, MMP-9 ve NF-κB Düzeyleri	168
5.3.3. Doku Oksidan ve Anti-Oksidan Düzeyleri	171
5.3.4. Doku p53 Proteini Ekspresyon Düzeyleri	177
5.3.5. Doku Bax Proteini Ekspresyon Düzeyleri	178
5.3.6. Doku Bcl-2 Proteini Ekspresyon Düzeyleri	179
5.3.7. Doku β-katenin Proteini Ekspresyon Düzeyleri	180
5.3.8. Doku Siklin D1 Proteini Ekspresyon Düzeyleri	181

5.4. Histopatolojik, İmmunohistokimyasal Değerlendirme ve TUNEL Analizi	182
5.4.1. Histopatolojik Bulgular	182
5.4.2. İmmunohistokimyasal ve TUNEL Analiz Bulguları	187
6. TARTIŞMA	196
7. KAYNAKLAR	225
8. ÖZGEÇMİŞ	252



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Tümöral Anjiyogenez Sürecine Etkili Parametrelerden Bazıları	31
Tablo 2. Uluslararası Kansere Ajansı (IARC) Tarafından Yayınlanan Globocan 2012 Verilerine Göre Kadınlarda En Sık Görülen İlk Beş Kanser Dağılımı	59
Tablo 3. Meme Karsinomlarının Histopatolojik Sınıflandırılması	78
Tablo 4. AJCC'ye Meme kanserinde gözden geçirilmiş TNM Sınıflaması	81
Tablo 5. Çeşitli Nar Kısımlarının Moleküler İçerikleri	99
Tablo 6. Hayvanlara Verilen Pellet Yemin İçeriği	127
Tablo 7. ELISA Yöntemi için Gerekli Sarflar ve Gereçler	134
Tablo 8. CA 15-3 ELISA Kitinin içeriği	135
Tablo 9. Western Blot Analizinde Kullanılan Malzemeler	147
Tablo 10. Qubit Florometre İle Total Protein Düzeyleri Belirlenen Doku Süpernatantlarından Jele Yüklenecek Olan Protein Karışımının Hazırlanmasını Gösteren Örnek Hesaplama	148
Tablo 11. Western Blot Analizinde 3. Basamakta Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	152
Tablo 12. Histolojik Takip Serileri	154
Tablo 13. TUNEL Boyama Prosedürü	158
Tablo 14. Gruplar Arasındaki Canlı Ağırlık (CA) Kazanç Farkları	165
Tablo 15. Plazma Tümör Belirteçleri Düzeyleri	166
Tablo 16. Plazma Anjiyogenez Düzeyleri	169
Tablo 17. Gruplararası Oksidan ve Anti-Oksidan Düzeylerinin Karşılaştırılması	173
Tablo 18. Gruplara Göre Tümör Tutulumu ve İnsidansı, Ortalama Tümör Hacimleri, Tümör Ağırlıklarının Dağılımı	187
Tablo 19. İmmunohistokimya Histoskorları ve Apoptotik İndeks (%)	195

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Normal Meme Yapısı	11
Şekil 2. Dişi Sıçanlarda Meme Bezlerinin Anatomik Lokasyonu.	16
Şekil 3. Kanserojeniz Basamakları	18
Şekil 4. GSH-Px'in Etki Mekanizması ve GSH Döngüsü	26
Şekil 5. GSH'ın Tripeptit Yapısı	27
Şekil 6. Anjiyogenez Oluşumunun Şematizasyonu	30
Şekil 7. MMP-9'un Genel Yapısı	34
Şekil 8. Kanonik ve Alternatif NF- κ B Yolaklarının Kareografisi	39
Şekil 9. Hücre Siklus Fazları ve Kontrol Noktaları	43
Şekil 10. Wnt/ β -katenin Sinyal Mekanizması	49
Şekil 11. Amerika'da 2017 Yılına Ait Tahmini Yeni Kansere Tanısı Alan ve Kansere Ölen Kişilerin Sayısı ve Oranları	60
Şekil 12. Kadınlarda Görülen Meme Kanserinin Yaşa Standardize İnsidans Hızlarının 2002,2009-2014 Yılları Arasındaki Dağılımı (Dünya Standart Nüfusu,100.000 Kişide), Türkiye	61
Şekil 13. Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kansere Türünün Toplam Kanser İçindeki (%) Dağılımı, 2014, Türkiye	62
Şekil 14. Meme Kanserinin Kadınlarda Yaşa Özel Hızları Türkiye	62
Şekil 15. ER- α 'nın Domain Yapısı	88
Şekil 16. ER'nin Sinyal Yolakları	92
Şekil 17. Flavonoidlerin Heterosiklik Yapısı	97
Şekil 18. Diyetteki Bazı Nutrasötiklerde Bulunan Flavonoid Çeşitleri	98
Şekil 19. Nar Meyvesinin Terapötik Faydalı Olduğu Hastalıklar	100
Şekil 20. Çeşitli Kansere Üzerine Narın Karıştığı Bazı Moleküler Sinyal Yolakları	107
Şekil 21. Tangeretinin Kimyasal Yapısı	108

Şekil 22. Tangeretin'in İnsan Gastrik Kanserli Hücre Hattı Üzerine Apoptoz Yolağı	117
Şekil 23. Tangeretin'in Anti-Kanser Mekanizmaları	122
Şekil 24. DMBA'nın Moleküler Yapısı	125
Şekil 25. Plazma CA 15-3'ün Düzey Tayininde Kullanılan ELISA Standart Grafiği	136
Şekil 26. MDA Çalışmasında Standart Eğri Grafiği	140
Şekil 27. GSH Çalışmasında Standart Eğri Grafiği	144
Şekil 28. Kontrol Grubundaki Sağlıklı Hayvanların Genel Görüntüsü	162
Şekil 29. DMBA Grubundaki Hayvanlarda Gözlemlenen Makroskopik Değişikler	162
Şekil 30. Sakrifiye İşleminde sonra DMBA Grubundaki Hayvanların Organlarında Gözlemlenen bazı Makroskopik Değişikler	163
Şekil 31. Gruplara Ait Plazma CA 15-3 Düzeyleri	167
Şekil 32. Gruplara Ait Plazma CEA Düzeyleri	167
Şekil 33. Gruplara Ait Plazma VEGF Düzeyleri	169
Şekil 34. Gruplara Ait Plazma MMP-9 Düzeyleri	170
Şekil 35. Gruplara Ait Plazma NF- κ B Düzeyleri	170
Şekil 36. Gruplararası Doku MDA Düzeylerinin Karşılaştırılması	174
Şekil 37. Gruplararası Doku SOD Aktivitesinin Karşılaştırılması	174
Şekil 38. Gruplararası Doku CAT Aktivitesinin Karşılaştırılması	175
Şekil 39. Gruplararası Doku GSH-Px Aktivitesinin Karşılaştırılması	175
Şekil 40. Gruplararası Doku GSH Düzeylerinin Karşılaştırılması	176
Şekil 41. Gruplara göre Doku p53 Protein Ekspresyon Düzeyleri (%)	177
Şekil 42. Gruplara göre Doku Bax Protein Ekspresyon Düzeyleri (%)	178
Şekil 43. Gruplara göre doku Bcl-2 Protein Ekspresyon Düzeyleri (%)	179
Şekil 44. Gruplara göre Doku β -katenin Protein Ekspresyon Düzeyleri (%)	180

Şekil 45. Gruplara göre Doku Siklin D1 Protein Ekspresyon Düzeyleri (%)	181
Şekil 46. Kontrol Grubuna Ait Normal Meme Dokusunun Histopatolojik Görünümü (H&E 200X)	182
Şekil 47. DMBA Grubuna Ait İnvaziv Duktal Karsinomlu Meme Dokusunun Histopatolojik Görünümü (H&E 200X)	183
Şekil 48. DMBA Grubuna Ait Memedeki Tümör Tutulumunun, Hacminin ve Ağırlığının Makroskopik Görünümü	184
Şekil 49. D+P Grubuna Ait Memedeki Tümör Tutulumunun, Hacminin ve Ağırlığının Makroskopik Görünümü	185
Şekil 50. D+T Grubuna Ait Memedeki Tümör Tutulumunun, Hacminin ve Ağırlığının Makroskopik Görünümü	186
Şekil 51. A, B, C, D ER- α 'nın Gruplara Ait İmmunohistokimyasal Boyanma Özellikleri	188
Şekil 51 E, F, G, H ER- α 'nın Gruplara Ait İmmunohistokimyasal Boyanma Özellikleri	189
Şekil 52 A, B, C, D Ki-67'nin Gruplara Ait İmmunohistokimyasal Boyanma Özellikleri	190
Şekil 52. E, F, G, H Ki-67'nin Gruplara Ait İmmunohistokimyasal Boyanma Özellikleri	191
Şekil 53. A, B, C, D Gruplara Ait TUNEL Boyanma ile Apoptotik Hücrelerin Gösterilmesi	193
Şekil 53. E, F, G, H Gruplara Ait TUNEL Boyanma ile Apoptotik Hücrelerin Gösterilmesi	194

KISALTMALAR LİSTESİ

Ab	: Antikor
Ab^x	: İşaretli Antikor
ACTH	: Adrenokortikotropik Hormon
AF-I	: Aktivasyon Fonksiyon –I
AF-II	: Aktivasyon Fonksiyon – II
Ag	: Antijen
AI	: Apoptotik İndeks
AJCC	: American Joint Committee on Cancer
AKT	: Protein Kinaz B
AP-1	: Aktif Protein Kompleksi -1
APC	: Adenomatöz Poliposis Koli
ATM	: Ataksi Telenejiktazi Geni
BAFF	: B Hücre Aktivasyon Faktörü
BCM,	: Meme Kanseri Musin Antijeni
BRCA-1	: Meme Kanseri Duyarlılık Geni-1
BRCA-2	: Meme Kanseri Duyarlılık Geni-2
C₆H₅Na₃O₇	: Trisodyum Sitrat Çözeltisi
CA 15-3	: Kanser Antijeni 15-3
CAT	: Katalaz
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CDKI	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
CEA	: Karsinoembriyonik Antijen
CHECK-2	: Kontrol Noktası Kinaz Geni-2
CK	: Kazein Kinaz
COX-2	: Siklo Oksijenaz-2
CREs	: Camp Yanıt Elemanı

CUCI₂	: Bakır II Klorür
DBA	: Dibenzantrasen
DBD	: DNA Bağlayıcı Kısım
DCIS	: Duktal Karsinoma İn-Situ
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DHEAS	: Dehidroepiandrosteron Sülfat
DMBA	: 7,12-Dimetilbenz [a] antrasen
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DTNB	: 5,5'-Ditiyobis -2-nitrobenzoik asit
DVL	: Dishevelled (karmaşık) Protein
ECD	: Ekstra Sellüler Domaini
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EIA	: Enzim İmmün Ölçüm Yöntemi
ELISA	: Enzim Bağlı İmmunosorbent Ölçüm
EMIT	: Enzim-Multipl İmmün Ölçüm Tekniği
ER -	: Östrojen Reseptörü Negatif
ER +	: Östrojen Reseptörü Pozitif
ERE	: Östrojen Yanıt Elemanları
ERK	: Ekstrasellüler Sinyal-Düzenleyici Kinaz
ESM	: Ekstra Sellüler Matriks
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotid Fosfat
FADH₂	: Flavın Amid Adenin Dinükleotid Fosfat'ın Hidrojenlenmiş Hali
FAS/FASL	: Ölüm Reseptörleri
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FSH	: Folikül Stimulan Hormon

FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
FZ	: Frizzled
G6PD	: Glukoz 6-P Dehidrogenaz
GCSF	: Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
GH	: Büyüme Hormonu
GS	: Glutasyon Sentetaz
GSH	: Redükte Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSH-R	: Glutasyon Redüktaz
GSK	: Glikojen Sentaz Kinaz
GSSG	: Okside Glutasyon
GST	: Glutasyon S- Transferaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
HIF1	: Hipoksi İle İndüklenebilen Faktör-1
HMACF	: Yüksek Çokluklu Anormal Kript Odağı
HOCl	: Hipokloröz Asit
HPL	: İnsan Plasental Laktojeni
HRT	: Hormon Replasman Tedavisi
HSP	: Isı Şok Protein
IARC	: Dünya Sağlık Örgütü Uluslararası Kanser Ajansı
IC50	: Tam İnhibisyon için Gerekli Konsantrasyonun Yarısı
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFR-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IκK	: Çoklu İnhibitör Kappa-B Kinaz
IDK	: İnvaziv Duktal Karsinom
İLK	: İnvaziv Lobüler Karsinom

İP	: İntra Peritoneal
KH₂PO₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
L•	: Lipid Radikali
LBD	: Ligand Bağlayıcı Kısım
LCIS	: Lobüler Karsinoma İn-Situ
LEF	: Lenfoid Artırıcı Faktör
LH	: Luteinizan Hormon
LOO•	: Lipid Peroksil Radikali
LOOH	: Lipid Hidroperoksit
LPS	: Lipopolisakkarid
MAPK	: Mitojen Aktif Protein Kinaz
MCA	: Musinoz Karsinoma Antijeni
MDA	: Malondialdehit
MISS	: Membran Yolu İle Başlatılan Steroid Sinyali
MMP	: Matriks Metaloproteinaz
MNU	: Metil-N-nitrozüre
MSA	: Memeli Serum Antijeni
MSH	: Mutasyon S Protein Homolog Geni-2
Na₂HPO₄	: Disodyum Hidrojen Fosfat
Na₂HPO₄:	: Sodyum Hidrojen Fosfat Çözeltisi
NaCl	: Sodyum Klorür
NADP	: Nikotin Amid Adenin Dinükleotid Fosfat
NADPH	: Nikotin Amid Adenin Dinükleotid Fosfat'ın Redükte Formu
NaN₃	: Sodyum Azid
NBT	: Nitroblue Tetrazolium
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa Beta
NISS	: Nükleer Yolu İle Başlatılan Steroid Sinyali

NLS	: Nükleer Lokalizasyon Sinyali
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NRP	: Nörofilin
NSAID	: Non-Steroid Anti-İnflamatuvar
(NH₄)₂SO₄	: Amonyum Persülfat
[•]OH	: Hidroksil Radikali
¹O₂	: Singlet Oksijen
O₂	: Oksijen Molekülü
O₂⁻	: Süperoksit Radikali
OKS	: Oral Kontraseptifler
PA	: Plazminojen Aktivatör
PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PBS	: Fosfat Tampon solüsyonu
PCP	: Düzlemsel Hücre Polaritesi Wnt/Planar yolağı
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGE₂	: Prostaglandin E ₂
PGF	: Plasental Büyüme Faktörü
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PIH	: Prolaktin İnhibe Edici Faktörü
PMF	: Polimetoksiflavon
pRb	: Retinoblastoma Proteini
PTEN	: Fosfat Tensin Homolog Geni
PUFA	: Poliansatüre Yağ Asiti
PVDF	: Poliviniliden Diflorit
RANKL	: NF-κB Ligandının Reseptör Aktivatörü
RHD	: Rel-Homoloji Alanları
RNS	: Reaktif Nitrojen Türleri

ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poli Akrilamid Jel elektroforezi
SH	: Tiyol grubu
SHBG	: Seks Hormonu Bağlayıcı Globulin
SOD	: Süperoksit Dismutaz
STK-11/LKB-1	: Serin Treonin Geni-11/1
TBA	: Tiyobarbitürik Asit
TBARS	: Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddesi
TCA	: Triklorasetik Asit
TCF	: T-Hücrel Faktör
TCI	: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.
TDLU	: Terminal Lobüler Ünit
TGF-α	: Transforme Edici Büyüme Faktörü- alfa
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü- beta
TLR	: Toll Benzeri Reseptör
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör- alfa
TPA	: Doku Polipeptit Antijen
TSH	: Triod Stimulan Hormon
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	: VEGF Reseptörü
WG	: Wingless Geni
WNT	: Winglessve Int-1 Genleri

1. ÖZET

Dünyada olduğu gibi Türkiye’de de kadınlarda en yaygın görülen kanser türü olan meme kanseri hala en önemli sağlık problemlerinden biridir. Bu çalışmada, DMBA ile oluşturulan sıçan meme kanser modelinde nar ekstresi ve tangeretin’in tek başlarına ya da birlikte uygulanmalarının koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 8-10 haftalık, toplam 68 adet dişi sıçan, randomize olarak 8 gruba ayrıldı. İlk 4 grup kanser ve tedavi gruplarının kontrolleri olarak tasarlandı ve sırası ile Kontrol, Pomegranat (P), Tangeretin (T) ve Pomegranat+Tangeretin (P+T) gruplarından oluşturuldu. Diğer 4 grup ise kanser ve tedavi grupları olarak tasarlandı ve sırasıyla DMBA (D) ve DMBA+Pomegranat (D+P), DMBA+Tangeretin (D+T), DMBA+Pomegranat+Tangeretin (D+P+T) gruplarından oluşturuldu. 23 hafta süren uygulamalar sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan elde edilen plazma numunelerinden tümör belirteçleri ve anjiyogenez parametreleri çalışıldı. Meme doku numunelerinde ise histopatolojik, immunohistokimyasal ve TUNEL analizleri, oksidan-antioksidan düzey ölçümleri, apoptozise ve hücre siklusuna etki eden spesifik proteinlerin ekspresyonları gerçekleştirildi.

Histopatolojik olarak DMBA grubunda % 71,42 oranında tümör tutulum insidansı izlenirken tedavi gruplarında bu oranın düştüğü tespit edildi. DMBA grubunda, kontrollere göre plazma CA15-3, CEA, VEGF, MMP-9 ve NF- κ B düzeylerinde anlamlı artışlar gözlenirken, tedavi gruplarında ise MMP-9 hariç bu parametrelerde anlamlı azalmalar saptanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla DMBA grubunda doku MDA düzeyleri anlamlı artarken, SOD, CAT, GSH-Px aktiviteleri

ve GSH düzeyleri anlamlı olarak azalmıştır. DMBA grubu ile tedavi grupları karşılaştırıldığında ise doku MDA düzeyleri sadece D+P+T grubunda anlamlı azalırken, antioksidan parametrelerden de sadece GSH düzeyleri tüm tedavi gruplarında anlamlı olarak artmıştır. Apoptotik belirteçlerden p53 ve Bax ekspresyonları kontrole göre DMBA grubunda anlamlı azalırken Bcl-2, β -katenin ve Siklin D1 ekspresyonlarının ise anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir. DMBA grubuna göre p53 ve Bax ekspresyonlarının hem D+P hem de D+P+T gruplarında anlamlı arttığı gözlemlenirken bu bulgular TUNEL ve immunohistokimyasal bulgular ile desteklenmiştir. Siklin D1 ekspresyonlarının ise sadece D+T grubunda anlamlı olarak düştüğü tespit edilmiş, TUNEL ve immunohistokimyasal bulgular ile desteklenmiştir. İmmunohistokimyasal ER- α ve Ki-67 immun reaktiviteleri DMBA grubunda kontrole göre anlamlı olarak artarken, tedavi gruplarının tümünde ise anlamlı azalmalar saptanmıştır.

Çalışma sonuçlarımız, Nar ekstresi ve Tangeretin'in kombine uygulanmasının meme kanseri gelişimini engellemede daha faydalı olabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: DMBA, Nar Ekstresi, Tangeretin, Meme Kanseri, Kemopreventif

2. ABSTRACT

PROTECTIVE EFFECTIVENNES OF POMEGRANATE AND TANGERETIN ON RAT BREAST CANCER MODEL

Breast cancer, which is the most common type of cancer in women in Turkey as well as in the world, is still one of the most important health problems. In this study, it was aimed to investigate the protective effects of pomegranate extract and tangeretin, both alone and in combination, on a DMBA-induced rat breast cancer model.

In this study, a total of 68 female rats aged 8-10 weeks were randomly divided into 8 groups. The first 4 groups were designed as the controls of cancer and treatment groups and were composed of the Control, Pomegranate (P), Tangeretin (T) and Pomegranate+Tangeretin (P+T) groups, respectively. The other 4 groups were designed as cancer and treatment groups and were composed of the DMBA (D) and DMBA+Pomegranate (D+P), DMBA+Tangeretin (D+T), DMBA+Pomegranate+Tangeretin (D+P+T) groups, respectively. Tumor markers and angiogenesis parameters were studied from plasma samples obtained from the rats sacrificed at the end of the 23-week treatment. In breast tissue samples, histopathological, immunohistochemical and Tunnel analyses, oxidant-antioxidant level measurements, and the expressions of specific proteins acting on apoptosis and cell cycle were performed.

Histopathologically, while there was a 71.42 % incidence of tumor involvement in the DMBA group, it was determined that this ratio decreased in the treatment groups. While significant increases were observed in plasma CA15-

3, CEA, VEGF, MMP-9 and NF- κ B levels in the DMBA group compared to controls, significant decreases were found in these parameters except for MMP-9 in the treatment groups. While tissue MDA levels significantly increased in the DMBA group compared to the control group, SOD, CAT, GSH-Px activities and GSH levels significantly decreased. When the DMBA group and the treatment groups were compared, MDA levels significantly decreased only in the D+P+T while only the GSH levels of antioxidant parameters significantly increased in all treatment groups. While p53 and Bax expressions of apoptotic markers significantly decreased in the DMBA group compared to the control group, it was observed that Bcl-2 β -Catenin and cyclin D1 expressions significantly increased. It was observed that p53 and Bax expressions significantly increased in both D+P and D+P+T groups compared to the DMBA group, and these findings were supported by Tunnel and immunohistochemical findings. Cyclin D1 expressions were determined to significantly decrease only in the D+T group, which was supported by Tunnel and immunohistochemical findings. Immunohistochemical ER- α and Ki-67 immunoreactivities significantly increased in the DMBA group compared to the control group, but significant decreases were determined in all of the treatment groups.

Our study results have shown that the combined administration of Pomegranate extract and Tangeretin may be more beneficial in preventing breast cancer development.

Keywords: DMBA, Pomegranate Extract, Tangeretin, Breast Cancer, Chemopreventive

3. GİRİŞ

Kanser vücudun farklı organlarında hücrelerin kontrolsüz büyümesi sonucu oluşan, klinik görünümü, tedavisi ve yaklaşımı birbirinden farklı olan bir hastalık grubu olarak tanımlanmaktadır (1). Kanser hücreleri çoğalarak tümörleri oluştururlar ve orijin aldıkları dokulara göre; akciğer kanseri, karaciğer kanseri, kolon kanseri, mide kanseri, ovaryum ve uterus kanseri, tiroid kanseri, kan kanseri, cilt kanseri, pankreas kanseri, beyin kanseri, prostat kanseri ve meme kanseri vb. olarak adlandırılırlar (2).

Meme kanseri hakkında çok çeşitli tanımlamalar yapılmakla birlikte insanlık tarihinin bilinen en eski habis tümörleri arasında yer almaktadır. M.Ö 3000’li yıllarda Mısır’da yazılmış olan kansere ait ilk yazılı kanıt olarak gösterilen Edwin Smith Papirüsü’nde meme kanserinden “tedavisi yok” diye bahsedilmiş olması, meme kanserinin varlığını ve önemini gözler önüne sermiştir (3). Bugün gelinen noktada ise meme kanseri kadınlarda görülen en yaygın kanser türü olup, tüm kadın kanserlerinin yaklaşık % 23’ünü oluşturmaktadır. Tüm kanser türleri içerisinde meme kanserinden ölümler 5. sırada bulunurken, kadınlarda ise bazı ülkelerde (özellikle gelişmemiş ya da az gelişmiş) 1. sırada bulunmaktadır (4). Bu nedenle meme kanseri, tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de en önemli toplumsal sağlık problemlerinden biri olarak görülmektedir (1).

Meme kanseri, apoptoz ve hücre proliferasyonu arasındaki bir dengesizlik sonucu gelişir. Hücre siklusunun sorunsuz olarak çalışması; hücre büyümesi ve hücre proliferasyonu ile sıkı ilişkilidir (5). Meme kanserlerinin tanı ve tedavisi bireyler arasındaki farklılıklar ve hastalığın prognozuna bağlı olarak değişkenlik

göstermesi nedeni ile güçtür. Özellikle, nonsteroidal anti-östrojen tedavide kullanılan tamoksifen'in, meme kanserli hastaların ancak üçte birinde etkili olduğu açıklanmıştır (6).

Son zamanlarda meme kanseri ile mücadelede klasik kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen dirençle ilgili olarak ilaçların yetersiz etkinliği ve bu ilaçların uzun süre kullanımlarından doğan yan etkiler göz önüne alındığında meme kanseri tedavisi ve önlenmesinde daha etkili ve daha az toksik olan yeni ilaçların geliştirilmesinin önemi vurgulanmıştır (7, 8). Günümüzde; kanser hücrelerini yok etmek için hedefe yönelik araştırmalar önem kazanmıştır. Özellikle antioksidan aktivitenin artırılması/oksidatif stresin baskılanması, reseptör blokajı, Faz-I ve Faz-II enzim blokajları, apoptozun indüklenmesi, hücre proliferasyonunun inhibisyonu, anjiyogenetik yolların baskılanması, hücre siklus arrestinin indüklenmesi, onkogen ekspresyonunun inhibisyonu, hücre adezyonu ve invazyonunun inhibisyonu gibi çeşitli spesifik yollar temel alınarak, özellikle doğal ürün ya da bitkileri içeren terapötik etkili ajanlar üzerine yapılan çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu konuda yapılacak olan çalışmalar, bitkisel preparatlar ile hastalıklar arasındaki mekanizmaları açıklamak ve meme kanserinin tedavisinde kullanılacak potansiyel kanser ilaçlarının oluşumu için yeni yaklaşımlar sağlayacaktır (9).

Günümüzde yapılan ilaç geliştirme araştırmalarında ön plana çıkan hücre kültürü ve moleküler biyoloji teknikleri sayesinde Pomegranat ve Tangeretin'in bazı kanser türlerinde profilaktik etkilerinin olduğu ve kanser tedavisinde kullanılabileceği ifade edilmiştir. Yapılan literatür taramalarında meme kanseri tedavisinde sınırlı sayıda *in-vivo* çalışma bulunmasına rağmen her iki fitoterapi

ajanının karşılaştırıldığı ve birlikte eş zamanlı etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmadığından bu çalışma bu konuda yapılan ilk araştırma olacaktır.

Meme kanseri klasik tedavi yöntemlerinin maliyetlerinin yüksek olması, kemoterapötik ajanların kullanılması sonucu oluşabilen yan etkilerin varlığı, tedavideki etkilerinin yetersiz olması nedeniyle çalışmalar bitkisel ajanlar üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada ülkemizde yetişmesi, kolay temin ve ekonomik olması nedenleri ile Pomegranat ve Tangeretin gibi flavonoid türevi maddelerin 7,12-Dimetilbenz [a] antrasen (DMBA) ile oluşturulmuş meme kanser modelinde kemopreventif etkilerinin kıyaslanması ve birlikte uygulanmalarının potansiyel etki/etkinliği araştırılacaktır.

3.1. Meme

3.1.1. Memenin Embriyolojisi

Meme bezlerinin gelişimi ter bezlerinin farklılaşması ile meydana gelmektedir. Fötal yaşamın beşinci ve altıncı haftasında ektodermal kökenli bir kabartı olarak aksilladan inguinal bölgeye doğru bir süt çizgisi '*galaktik bant*' şeklinde belirginleşmeye başlamaktadır. Dokuzuncu haftada fötüsün büyümesi ile bu çizgiler atrofiye uğrayıp kaybolurken, geride sadece pektoral bölgedeki meme kabartısı kalmaktadır. Bu kabartı basal hücre kaynaklı meme başı tomurcuğunun oluşumu ile sonuçlanmaktadır (10).

Gebeliğin ilk trimestri sırasında yassı epitel hücreler, yüzeyden pektoral bölgedeki meme başı tomurcuğuna doğru göç etmekte ve meme duktuslarını ve lobüler tomurcukların oluşması için farklılaşırken mezenkimal hücreler ise meme

başı ve areolanın düz kas hücrelerini oluşturmak için farklılaşma sürecine girmektedir.

Gestasyonun ikinci ve son trimesterinde epitelyal tomurcuklanmalar giderek büyümektedir. Gebeliğin son birkaç haftasında artık fetal meme bezleri maternal ve plasental steroidlere karşı duyarlılık kazanarak asiner yapılardaki epitelyal hücreler sekretuar aktivitede bulunmaktadırlar.

Doğumda ise hem kız hem erkek bebeklerde meme dokusunda palpe edilebilir bir büyüme izlenmektedir. Yaşamın birinci ayında anne ve plasental kaynaklı seks steroidlerinin ve prolaktin hormonunun konsantrasyonlarındaki azalmaya bağlı olarak, sekretuar aktivite sonlanmakta, meme bezlerinin büyümesi gerilemekte ve hatta inaktif hale dönüşmektedir. Artık puberteye kadar meme de, progresif alveoler differansiyasyon gözlenmezken, dallı yapılar içeren başlıca laktiferöz duktuslar oluşmuştur (11).

3.1.2. Memenin Anatomi ve Histolojisi

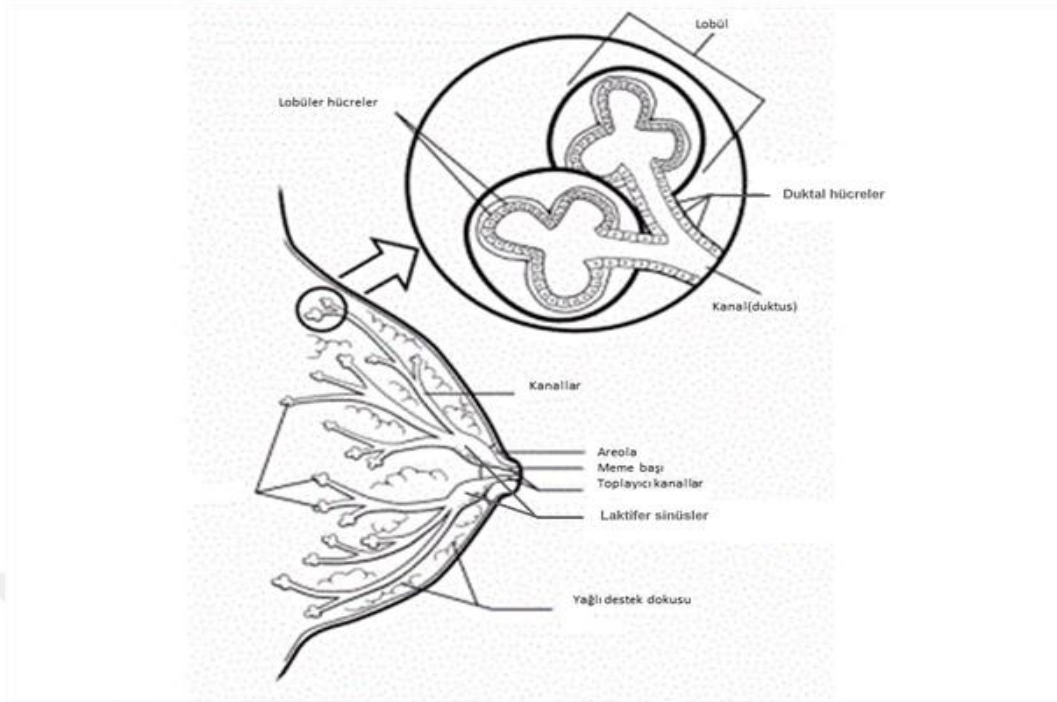
Erişkin bir kadında meme bezleri, göğüs ön duvarının üstte 2-3 ve altta 6-7. kostaları arasında iki taraflı simetrik yerleşimli, medialden sternum, lateralden ise ön ve orta aksiller çizgi ile sınırlandırılmış, yüksek derece özelleşmiş apokrin bezler olarak tarif edilmektedir (12). Erişkin bir bayanda, memenin santral kısmının çapı ortalama on ya da on iki cm, kalınlığı ise beş ya da yedi cm civarı olmakla birlikte, memenin ağırlığı yaklaşık 150-200gr'dır. Laktasyon döneminde ise bu ağırlığın 4 katına kadar çıktığı bildirilmektedir. Memenin sınırları, çapı, kalınlığı ya da ağırlığı gibi anatomik özellikleri kapsayan ifadeler kadından kadına farklılık gösterebileceği gibi aynı bayanda puberte,

erişkin, gebelik, laktasyon, menapoz, postmenapoz hatta yaşlılık dönemlerinde de değişikliklerin olacağı ifade edilmektedir (13).

Meme bezinin ön kısmında yüzeysel fasya, arkasında ise derin fasya bulunmaktadır. Meme derisinden başlayarak derin fasyada son bulan ligamentler “Cooper” ligamentleri olarak adlandırılmaktadır. Bu ligamentler memeyi yerine tespit etmekle görevli oldukları gibi ayrıca kanserin ilk belirtileri ve yayılımını ortaya koymada önem arz etmektedirler. Memenin santralinde ise meme başı ve areola bulunur (14). Meme başından geçen çapraz çizgilere göre her bir meme üst-dış kadran, alt-dış kadran, üst-iç kadran, alt-iç kadran ve areola diye çeşitli bölgelere ayrılmaktadır. Memenin üst-dış kadranı diğer kısımlara nazaran daha fazla bezsel elemanları içerisinde barındırmakta olup, selim ve habis meme tümörlerine potansiyel konum olarak görülmektedir (13). Meme başının etrafında çapı bir buçuk ile altı santimetre arasında değişen, meme derisinden daha fazla pigmente sahip koyu renkli kısım ise aerola olarak adlandırılmaktadır. Bu bölgedeki rengin koyuluğu östrojen düzeyinin yüksekliği ile ilişkilidir (15). Ayrıca meme dokusu zengin damar ve sinir ağına sahiptir. Özellikle interkostal venler, vertebral venöz sistem ve azigos veni ile bağlantılı olduğundan meme tümörlerinin kemik, sinir sistemi ve akciğere niçin sıklıkla metastaz yaptığına dair ipucu vermektedir (16). Memenin lenfatik drenajının en fazla yükünü aksiller lenf düğümleri (%75-98) taşıırken az miktarlarda lenf akımı ise internal mammarian düğümler ve interkostal lenf düğümlerine boşalmaktadır. Meme kanserinde metastazların genellikle lenfatik yollar aracılığı ile olduğu raporlanmıştır (14).

Gelişmiş bir meme dokusunun mikroskopik incelenmesi sonucunda; asinüsler (alveoller), duktuslar (kanallar) ve stromal destek doku elemanlarından

(yağ ve fibroblast gibi) oluştuğu gözlenmektedir (10, 15). Meme dokusu, 12-20 adet ana duktus sisteminin dallanması ve bunların her birinin lobüllere ayrılmasından oluşmuş tübülo-alveoler bez yapısını teşkil etmektedir. Asinüslerin lümenine bakan taraftaki iç kısımlarını, süt salgılayan tek katlı, küboidal ve silindirik hücreler oluştururken dış tarafı ise miyoflement içeren kontraktıl, yassılaştırmış miyoepitel hücrelerden meydana gelir. En dış kısımda ise bağ dokusu, kan ve lenf damarları ile çevrelenmiş bazal membran bulunmaktadır. Miyoepitel hücreler, laktasyon esnasında sütün boşalmasında görevlidir. Memede süt salgılayan bölüm olan asinüsler lobülleri meydana getirirler. Memenin patolojik lezyonlarının en sık cereyan ettiği bölüm olan terminal lobüler unit (TDLU) lobüllerde bulunmaktadır. Lobüllerin 20-40 tanesinin birleşmesiyle ise loblar oluşmaktadır. Her meme en az 15-20 lob içerir. Memenin duktal yapısındaki hiyerarşik düzende yukarıda anlatıldığı gibidir, Her asinüs bir kanala sahiptir. Bunlar birleşerek lobüllerin kanallarını, lobüllerinkiler de lobların kanallarını oluşturmaktadır. Her lob meme başına laktifer duktuslar (toplayıcı kanallar) ile ayrı şekilde açılmaktadır ve açılmadan önce areola altında laktifer sinüsler denilen genişlemeler gösterir (Şekil 1). Meme başı çevresindeki bu areola epitelinde de küçük tüyler, yağ ve ter bezleri ile aksesuar meme bezleri bulunurken kıl foliküllerine rastlanmaz. Ayrıca areola etrafında çok sayıda süt de salgılayabilen, sebaceöz karakterde Montgomery bezleri yer almaktadır (11).



Şekil 1. Normal Meme Yapısı (17)

3.1.3. Memenin Fizyolojisi ve Biyokimyası

Meme gelişiminin birçok hormon ve regülatör faktörlerin etkisi altında olduğu bilinmektedir. Bu hormonlar ve faktörlerin başlıcaları arasında; östrojen, progesteron, prolaktin, oksitosin, İnsan Plasental Laktojen (hPL), tiroid, Adrenokortikotropik Hormon (ACTH), androjenler, büyüme hormonu (GH) ve amfiregulin, Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF), Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Transforme Edici Büyüme Faktörü- α (TGF- α), İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF) ve Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) gibi faktörler yer almaktadır. Bu hormonların ve faktörlerin etki mekanizmaları hipotalamus, hipofiz, plesanta ve overlerin nörohumoral kontrolünde gerçekleşmektedir (10).

Östrojenler, hedef hücrelerindeki sitoplazmik ve nükleer yerleşimli reseptörlerine bağlandıktan sonra kendi etkilerini göstermektedirler. Östrojen

reseptörlerinin sentezini, hem östrojen hem de progesteron hormonu uyarabilmektedir. Östrojen hormonunun meme epiteli üzerine proliferatif etkisinin olduğu bilinmekte ve özellikle memenin duktal epitelizasyonunun gelişmesinde görev aldığı bildirilirken, yağ depolama ve memenin stromal doku gelişiminden de sorumludur (18).

Progesteron hormonunun kendi başına memeye bir etkisinden söz edilmezken, meme dokusunda, östrojen reseptörlerinin sentezini uyarmakta ve prolaktin hormonu ile sinerjizm göstermektedir. Progesteron hormonu meme dokusundaki duktal gelişimden ziyade diğer epitel hücrelerinin differansiyasyonu, lobul ve asinilerin gelişiminden sorumlu tutulmaktadır. Ayrıca laktasyonu inhibe etmektedir. Meme dokusundaki progesteron reseptörleri ise östrojen hormonunun kontrolü altındadır.

Over kaynaklı olmayan prolaktin ön-hipofizden salgılanan, bir polipeptid hormondur. Bu hormon meme hücre yüzeyindeki kendi reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterirken ayrıca bu reseptörler östrojen hormonu aracılığı ile indüklenmektedir (19). Prolaktin hormonu yokluğunda, östrojenin meme gelişimini başlatamayacağı ifade edilirken, hipofizi olmayan dişilerde, östrojen replasman tedavisi ile normal meme gelişiminin sağlanmış olması östrojenin prolaktin bağımlı, meme bezi gelişimindeki rolünü tartışmalı hale getirmektedir. Prolaktin, özellikle laktasyon dönemi olmak üzere, meme dokusu büyüme ve gelişiminin her safhasında önemli görevler üstlenen bir hormondur. Nitekim progesteron ile birlikte sinerjizm göstererek lobul ve asini hücrelerinin büyüme ve gelişiminde rol almakta ve laktasyonun gerçekleşmesini sağlayarak, memede süt sentezi ve sekresyonunu uyarmaktadır (20).

Oksitosin hormonu hipotalamustan sentez edilerek nörofizin I aksonu ile hipofizin arka lobuna (nörohipofize) taşınmakta ve burada depo edilmektedir. Oksitosin hormonu gerekli uyarılar gelince kana salınmaktadır. Oksitosin doğum esnasında uterus kasılmalarından sorumludur ve ayrıca memedeki alveolleri çevreleyen miyoepitel hücrelerde de kasılmaya neden olarak sütün alveollerden laktifer duktuslara ejeksiyonunu uyarmaktadır. Yeni doğanlarda emme refleksi sonucunda oksitosin ve prolaktin hormonlarının salınımı uyarılmaktadır (21, 22).

Plasental kaynaklı hPL hormonu, meme de alveoler büyümeyi ve laktogenezi uyarmaktadır. Ayrıca normalde hipofiz kaynaklı olan TSH ve ACTH hormonları pubertede memenin duktal büyümesinde görevli iken, gebelikte bir miktar plasentadan da üretilebilmekte olup östrojenle birlikte lobüloalveolar büyümeyi uyardıkları bildirilmektedir. Androjenler direk olarak memeyi etkilemezken, meme epiteli üzerine oluşturdukları proliferatif etkiler genellikle östrojene dönüştükten sonra izlenmektedir. Büyüme hormonları ya da faktörleri ise pubertede duktal gelişime yardımcı olurken, gebelik ve laktasyonda ise meme epitel hücrelerinin dayanıklılıklarını artırmada ve laktasyonu uyarmada rol almaktadırlar. Tabiki bu etkilerini östrojenin parakrin mediyatörleri olarak gerçekleştirirler (23).

Menstrüel siklus boyunca seks hormonları düzeyinde olan değişiklikler memenin morfolojisini etkiler. Menstrüel döngünün başlangıcı ile ovulasyona kadar olan süreyi (yaklaşık 2 hafta) kapsayan foliküler fazda hipofiz kaynaklı Folikül Stimulan Hormon (FSH) miktarının artması sonucu östrojen seviyelerinde de artış izlenmektedir ve bunun akabinde meme de kan akımı ve interlobüler alanlardaki ödeme bağlı volüm artışları izlenmektedir. Artan östrojen

miktarları FSH üzerine negatif geri bildirim oluştururken aynı zamanda Luteinizan Hormon (LH) seviyesi üzerine ise pozitif etki göstererek pik seviyelere ulaşmasını ve luteal fazın oluşmasını da tetiklemektedir. LH'ın pik seviyeleri folikülün yırtılması ve ovulasyonla sonuçlanırken overdeki granüloza hücrelerinden de progesteron salınımını indüklemektedir. Sonuç olarak meme duktusları dilate olur ve alveolar hücreler sekretuar hücrelere differansiye olmaktadır (24). Yumurtanın d llenmemesi halinde menstrüasyon evresi görülmektedir. Korpus luteumun parçalanması sonucu progesteron ve östrojen seviyelerinin azalması ile birlikte meme epitelinin sekretuar aktivitesinde de düşüşler gözlenmektedir. İlk kanamadan sonraki beşinci ve yedinci günlerde ise artık meme hacmi en minimal düzeye ulaşmıştır. Ayrıca östrojenin sitoplazmadaki reseptör miktarı da menstrüel siklusda değişiklik gösterirken gestasyonun son trimestrinde ve lohusalığın ilk döneminde bu reseptör sayısının stabil olarak arttığı bildirilmektedir.

Gebelikte ise yüksek östrojen ve progesteron düzeyleri hipotalamustan prolaktin inhibe edici faktörü (PIH) baskılayarak 8. haftadan itibaren prolaktin salgılanmasına sebep olurken bir yandan da memedeki prolaktin reseptörlerini inhibe etmek sureti ile süt salgılanmasını engelleyici etki oluşturmaktadır. Sonuç olarak korpus luteum ve plasenta kaynaklı hormonlar memenin tüm kompartmanlarında (duktus, lobül, alveol) belirgin büyümeye neden olmaktadır. Gebelik sırasında memelerde olan bu büyüme epitel proliferasyonlara, alveollerin kolostrumla gerilmelerine, miyoepitel hücrelerin ve stromal dokularının hipertrofilerine bağlı olarak gelişmektedir. Gebeliğin 16. haftasından itibaren yeterli laktasyonu sağlayabilecek kapasiteye ulaşmaktadır.

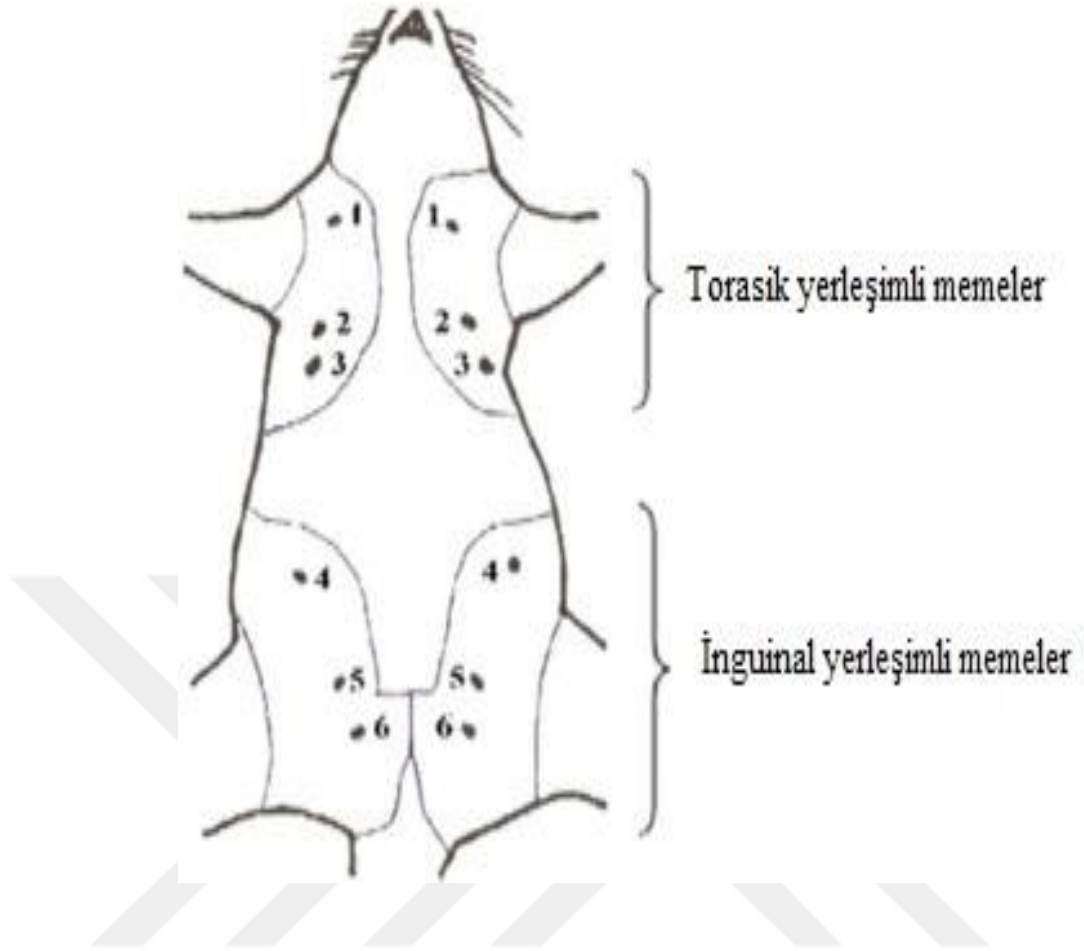
Plasentanın ayrılması (doğum) ile birlikte ani progesteron ve östrojen düzeylerindeki düşüşler, prolaktin üzerindeki etkileri ortadan kaldırarak laktasyonu başlatmakta ve sonrasında prolaktin ve oksitosin hormonları süt sentezi ve sekresyonunu düzeylerindeki azalmalar ile devam ettirmektedir. Emzirmeyen annelerde bu düşüşler emzirenlere göre daha hızlı olmaktadır.

Menapozda ise; overlerdeki aktif dönem sona ererken östrojen ve progesteron salgıları azalmakta ve buna bağlı olarak memenin duktal ve glandüler yapılarında progresif involüsyonlar görülmektedir. Lobüler ünitelerin sayısında düşüşler ve kaçınılmaz atrofiler gelişmekte olup duktal dokular ise yerlerini yağ dokusuna bırakmakta ve meme dansitesi azalmaktadır. Yaşlanma ile birlikte morfoloji iyice değişmektedir (10, 15, 24).

3.1.4. Sıçanlarda Meme Anatomisi ve Histolojisi

Sıçanlarda memenin anatomik özellikleri insan meme yapısı ile farklılıklar arz etmektedir. Dişi sıçanlarda vücudun her bir yarısında simetrik olarak bulunan, 6 çift olmak üzere toplamda 12 adet meme bezi bulunmaktadır. Meme uçları inspeksiyonla görülebilir ya da dışarıdan palpe edilebilirler. Şekil 2’de görüldüğü üzere dişi sıçandaki meme bezlerinin yarısı torasik yarısı ise inguinal yerleşimlidir. Laktasyonda meme başı dikkat çekici bir şekilde büyümektedir (25).

Meme bezindeki mikroskobik yapılar ise insan memesine benzer histoloji içermektedir. Sıçanlarda bulunan her bir meme loblarla şekillenmiş sekretorik alveoller ve dallı yapıya sahip akıtıcı duktuslardan oluşan tubuloalveoler bez özelliği göstermektedir.



Şekil 2. Dişi Sıçanlarda Meme Bezlerinin Anatomik Lokasyonu. (26)

Kübik ya da prizmatik epitel hücreler sekresyon yapma özelliğinde iken bunları dıştan saran miyoepitel hücreler ise kontraksiyonda görev yaparlar (27). Erkek sıçanlarda ancak meme ucu iyi gelişmemiştir. Yaşlanan sıçanlarda akıttıcı kanal dilatasyonları ve pigmentasyonlar görülebilmektedir.

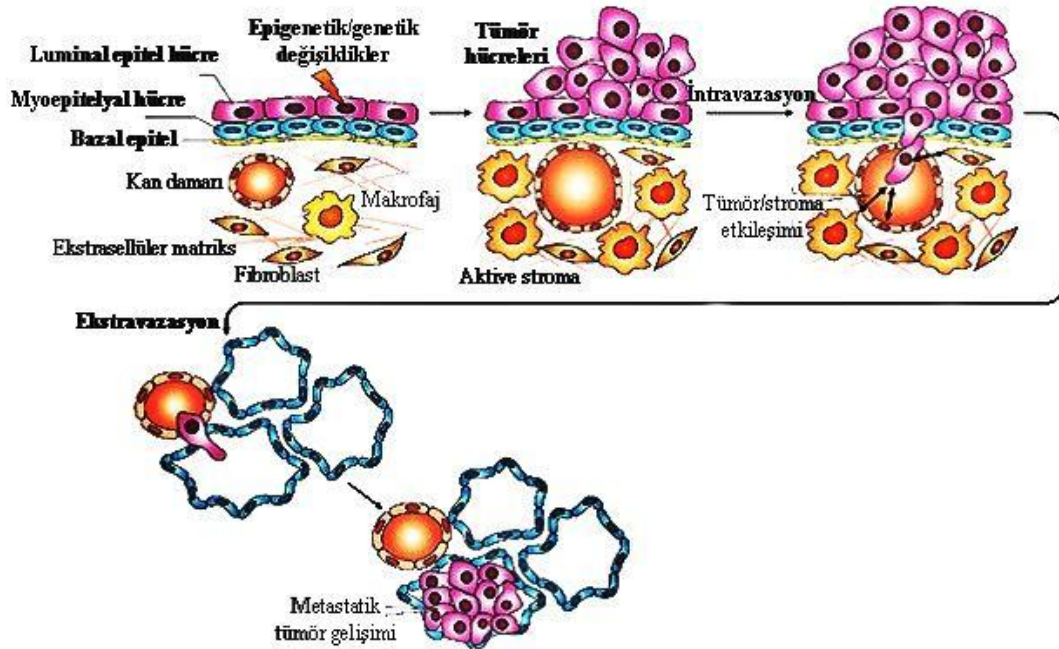
Dişi sıçanların puberteye erişkinlik, östrus siklus, gebelik ve laktasyon süreleri kadınlardan farklılıklar gösterirken, bu dönemlerde memede meydana gelen morfolojik değişikliklerin ve hormon bağımlı fizyolojik olayların mekanizmaları ise benzerlik teşkil etmektedir (28).

3.2. Kanser ve Karsinogenez Süreci

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyüme ve çoğalması sonucunda oluşan kronik bir hastalık olarak tanımlanabilir. Bir hücrenin kanserli hücreye dönüşebilmesi için DNA'sının hasar görmesi şarttır. DNA molekülü, organizmanın hayati fonksiyonlarını düzenleyen genetik bilginin başka nesillere aktarılmasını sağlar. Bu molekülün dış ve iç etkenler nedeni ile hasarlanması sonucunda; hücreler ya bu hasarı tamire çalışır ya da apoptoza gider (29).

Kanser hücreleri ölmek yerine büyümeyi ve sürekli anormal hücreleri üretmeyi tercih ettiklerinde farklı stratejiler geliştirirler; büyüme sinyallerine ihtiyaç duymadan kendi proliferasyonlarını uyarmak (otonomi), büyümeyi baskılayan hücre sinyallerine karşı da duyarsız hale gelme (kontakt inhibisyon göstermezler), sınırsız replikasyon özelliği gösterme (yüksek telomeras aktivitesi) ve apoptozdan kurtulma, dokulara invazyon ve metastaz yapabilme özelliği kazanabildikleri gibi anjiyogenezi sürekli uyaran özellikler de gösterebilirler. Ayrıca tüm bu fenotipik kazanımlara ek olarak kanser hücrelerinde genetik ve epigenetik değişiklikler gözlenirken, metabolik aktiviteleri de normal hücrelerden farklı işlemektedir; protein, lipid ve nükleik asit gibi makro moleküllerin sentezleri artarken glikoliz ve glutaminoliz hariç diğer yıkım yollarının çoğu inaktiftir. Kanserli hücrede metabolik yollar yeni biyomolekül sentezi oluşturma ve enerjiyi verimli kullanma adına çeşitli yollara kayma yönündedir. Bu duruma verilebilecek en güzel örnek ise kanser hücrelerinde 'Wosburg etkisinin' gözlenmesidir (30-33).

Ayrıca normal ve kanserli hücreler gibi benign ve malign olan tümörler arasında da farklılıklar söz konusudur. Malign hücreler köken aldıkları parankimal hücrelere morfolojik ve işlevsel olarak çok az benzemekte (az differansiye) ya da hiç benzememekteyken (anaplazi-undifferansiye), iyi huylu tümörler orjin aldıkları hücreye benzerlik göstermektedir (iyi differansiye). Bening tümörlerin çoğu yavaş gelişimli ve fibröz bağ doku çeperi ile etraftaki sağlıklı dokularla iyi sınırlıdır. Habis tümörler ise hem hızlı gelişim gösterirken hem de lokal invazyon yeteneğine sahiptir ve çevre dokulara infiltrate olarak hasar oluşturma özelliği gösterirler. Malign tümörleri benignlerden ayıran en önemli özellik ise malign tümörü oluşturan hücrelerin, kendi bulundukları bölgeden hematojen ve lenf damarları aracılığı ile uzak doku ve organlara sekonder olarak tutulum göstermeleri yani metastaz yapabilme özellikleridir (Şekil 3) (34-36).



Şekil 3. Kanserogenez Basamakları (32)

3.3. Karsinogenez Sürecine Etki Eden Faktörler

3.3.1. Serbest Radikaller ve Etkileyen Faktörler

Dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşlenmeyen elektron/elektronlar barındıran atom ya da moleküller serbest radikaller olarak adlandırılmaktadır. Serbest radikaller, yapılarındaki eşlenmemiş elektrondan dolayı karşısındaki moleküllere sürekli elektron verme ya da okside etmeye meyilli olan reaktif maddelerdir (37). Serbest radikallerin aerobik hücrelerde en önemli tepkimeleri arasında moleküler oksijen ve reaktif türleri (ROS), peroksitler ve geçiş metallerinin eşlik ettiği tepkimeler sayılabilir (38).

Oksijen molekülü (O_2) eşleşmemiş iki elektron barındırdığı için diradikal olarak adlandırılır ve kendisi radikal olduğu halde ilginç olan şudur ki beklenildiği gibi toksisiteye sahip değildir. Bu da O_2 'deki eşlenmemiş 2 elektronun aynı dönme yönüne sahip olması ile açıklanabilir. Molekülün oksidasyon potansiyeli bu sebeple düşüktür fakat kesinlikle yok sayılmamalıdır. Çünkü Oksijen farklı faktörlerin etkisiyle ya da yüksek konsantrasyonda bulunduğu yerlerde toksik olan ROS adı verilen moleküllere süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\cdot OH$), hipokloröz asit ($HOCl$), singlet oksijen (1O_2) (H_2O_2 ve singlet oksijen eşleşmemiş elektron içermediği için serbest radikal değildir ama oksijene göre daha reaktiftir) dönüşebilir (39). Ayrıca reaktif azot türleri de bulunmaktadır.

Serbest radikaller organizmada hem normal metabolizma esnasında bir yan ürün olarak endojen kaynaklı oluşabildikleri gibi çevresel kaynaklı da oluşabilirler (40, 41).

Tüm bu radikaller organizmada yararlı ve zararlı birçok etkiler doğurabildikleri için sahip oldukları bu zıt etkilerin hassas bir denge halinde korunması biyolojik sistemler için önemlidir. Örneğin ROS'ların düşük ya da orta seviyelerdeki miktarları hücrelerde enfeksiyöz ajanlara karşı korunmada, sinyal iletim yollarının modülasyonunda ve mitojenik uyarılara karşı yanıtın başlatılmasında etkili iken ROS'ların aşırı üretilmesi sonucunda ise hücrelerde oksidatif stres adı verilen hücre hasarı ile seyreden bir durum ortaya çıkmaktadır. Bu durum kanser dahil, enfeksiyon, kronik tahriş veya iltihaplanma gibi birçok patolojilerle ilişkilendirilmektedir (37).

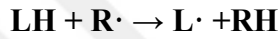
Oksidatif stres sonucu oluşan hasardan temel olarak hücrelerin ve çeşitli organellerin (lizozom, mitokondri, ER vb.) fosfolipid membranlarındaki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sorumlu tutulmaktadır. ROS'lar, lizozom membranı üzerine direkt etki ile hücresel yapı bozukluğunu artıran proteolitik enzimlerden oluşan içeriklerin hücresel sitoplazma içine salınmasına neden olmaktadır (42). Ayrıca hücrede yüksek konsantrasyon ve çeşitlilikte üretilen bu radikallerin eşlenmemiş elektronlarının radikallere kattıkları reaktiviteden ötürü protein, DNA, nükleotid ve lipidler gibi biyolojik yapılara da zarar verebilmeleri söz konusudur (43-46).

3.3.1.1. Lipid Peroksidasyonu ile İlgili Parametre

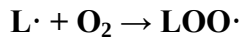
3.3.1.1.1. MDA

Serbest radikaller, hücre zarında lokalize kolesterol ve doymamış yağ asitlerin çift bağları ile reaksiyona girerek peroksitler, alkoller, malondialdehit (MDA), etan ve pentan gibi peroksidasyon ürünlerinin oluşumlarını

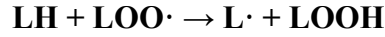
başlatmaktadır. Lipid peroksidasyonu olarak adlandırılan bu süreç aslında poliansatüre (çoklu doymamış) yağ asitlerinin (PUFA) oksidatif yıkımıdır. Otooksidasyonla devam eden ve 2 lipid peroksid radikalının annihilasyonu ile son bulan, bu zincirleme reaksiyonlar sonucu oluşan hücre membranındaki hasar geri dönüşümsüzdür (47). Lipid peroksidasyonunun başlangıç reaksiyonu, oluşmuş serbest radikalın membrandaki PUFA'ların üzerindeki metilen gruplarından (-CH₂) bir hidrojen atomunu uzaklaştırmaları ile gerçekleşmektedir ve oluşan ürün bir lipid radikali (L·) özelliğindedir (48, 49).



Lipid radikallerindeki molekül içi çift bağların pozisyonundaki değişikliklerle konjuge dienler oluşmakta ve daha dayanıksız olan lipid radikalının O₂ ile etkileşme sonucunda ise lipid peroksil radikali (LOO·) meydana gelmektedir.



Lipid peroksil radikalleri, membrandaki hasardan henüz etkilenmemiş komşu PUFA'lar ile lipid radikalleri oluşturmak sureti ile tepkimeye girebilir ya da kendileri de, açığa çıkan hidrojen atomlarıyla lipid hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşebilirler. Bu şekilde reaksiyonlar kısır döngü halinde kendi kendine zincirleme olarak devam etmekte olduğundan bu basamak ilerleme evresi olarakta anılmaktadır (50). Ayrıca lipid hidroperoksitleri, lipid peroksidasyonunda oluşan ilk üründür.



Geçiş metalleri ile etkileşime girerek LOOH'ların yıkılması sonucu çoğu aktif olan MDA ve hidroksinonenal gibi aldehitler oluşmakta ve bu oluşan aldehitlerin bir kısmı hücrede metabolize olurken bir kısmı da hücre hasarına neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA üç veya daha fazla molekül içi çift bağ bulunan yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşmaktadır. Aynı zamanda lipid peroksidasyonunu göstermede sık kullanılan bir parametredir. Hücrelerin farklı kısımlarına diffüzyon aracılığıyla çok kolay girebilmekte ve özellikle membranda lipid ve protein yapıları arasında çapraz polimerleşmelere neden olarak, hücre membran dinamiğinde bir takım değişikliklere (iyon taşınması, enzim aktivitesi ve hücre yüzeyini oluşturan bileşenlerin kümelenmesi gibi) yol açmaktadır. Artan MDA miktarının mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etkileri vardır (51-53).

Oksidatif hasarın bir sonucu olarak oluşan MDA; mutajenik etkisini, DNA yapısındaki bazlarla (özellikle nitrojenik yapıda olan) reaksiyona girerek gerçekleştirmektedir. DNA'ya yakın bölgelerde hidroksil radikalının üretilmesi ile bu radikal DNA'daki bazı bazların oksidatif hasarlarına ve kopmalarına sebebiyet verebilir. Ayrıca genetik mutasyonlara neden olabilir ya da transkripsiyon düzeyinde değişikliklere neden olarak normal süreçlerin işlemesine zarar verebilir. Tüm bunların dışında hidroksil radikalının DNA ile reaksiyona girmesi sonucu kimyasal karsinogeneze de önemli rol oynar. Çok adımlı karsinogenin başlangıç ve ilerleme basamaklarında ROS'un izlerini gösteren güçlü bulgular yer almaktadır (50, 54).

3.3.2. Antioksidanlar ve Etkileyen Faktörler

Hücrelerin zarar görmesini önlemek için organizmadaki ROS konsantrasyonlarının sürekli bir denge halinde olması gerekir. Bu denge sağlanamazsa ROS ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bulunan antioksidan savunma sistemleri devreye girmektedir. Antioksidan sistemi oluşturan enzimler ya da non-enzimatik maddeler farklı etki mekanizmalarını (toplayıcı, bastırıcı, onarıcı ve zincir kırıcı) kullanarak ROS'ların detoksifikasyonunda görev almaktadır (53,55).

Antioksidan sistemi oluşturan enzimlere örnek olarak; Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon-S-Transferaz (GST), Glutasyon Redüktaz (GSH-R), Glukoz 6-P Dehidrogenaz (G6PD), hidroperoksidaz ve mitokondrial sitokrom oksidazlar verilebilir. Bu enzimlerin ROS'un nötralizasyonundan primer olarak sorumludur. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise metabolik (endojen) ve besinsel (diyetsel, ekzojen) antioksidanlar olarak ikiye ayrılırlar. Metabolik antioksidanlara Lipoik Asit, Glutasyon, L-arjinin, Koenzim Q-10, Melatonin, Ürik Asit, Bilirubin, Metal-Bağlayıcı Proteinler, Transferrin gibi moleküller örnek verilebilir. Vücutta üretilmeyen ekzojen kaynaklı vitamin A, E, C, eser elementler (selenyum, mangan, çinko), omega-3-6 yağ asitleri, flavonoid ve bazı fenolik moleküller besinsel antioksidanlara iyi birer örnek olabilir. Antioksidanlar sayesinde serbest radikallerin organizma için tehdit oluşturan zararlı etkilerinin önüne geçilerek, kanser gibi hastalıkların önlenmesi mümkün kılınabilir (43).

3.3.2.1. Enzimatik Antioksidanlar ile İlgili Parametreler

3.3.2.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1.)

Oksijeni metabolize eden tüm canlılarda endojen olarak üretilen SOD, organizmanın serbest radikallere karşı ilk bariyer görevi gören antioksidan bir metallo enzimdir. Spesifik olarak $O_2^{\cdot -}$ (süperoksit) radikallerinin dismutasyonunu katalizleyerek, onu H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürür. CAT ve GSH-Px' ten farklı olarak SOD enziminin substratını aşağıdaki tepkimeden de anlaşılacağı üzere bir serbest radikal oluşturmaktadır (56).



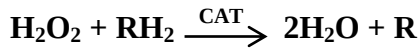
Ayrıca prokaryotlarda demir ve mangan içeren SOD (Fe ve Mn-SOD) ve bazı streptomices bakterilerde nikel içeren SOD (Ni-SOD, aminoasit dizilimi diğer SOD'lardan farklılık arz eder ve siyanid ile inhibe olmaktadır) enzimi (57) bulunurken, ökaryotlarda aminoasit kompozisyonu, aktif metal bölgesi ve hücrel lokalizasyonundaki çeşitliliğe binayen 3 farklı formda SOD izoenzimi tanımlanmaktadır; **Mn-SOD** (homotetramer yapıda, aktif bölgesinde mangan içerir, mitokondride lokalizedir, 88 kDa ağırlığındadır ve süperoksit radikalini uzaklaştıran primer SOD özelliği taşımaktadır, siyanid ile inhibe olmaz), bakır ve çinko içeren SOD (**CuZn-SOD**, dimerik yapıdadır aktif bölgesinde bakır ve çinko bulunur, sitoplazmada lokalizedir, 32 kDa ağırlığındadır, siyanidle inhibe edilir), ekstra-selüler SOD (**EC-SOD**, tetramerik yapıdadır, bu da aktif bölgesinde bakır ve çinko içermektedir, intertisyel aralıklarda, plazma, lenf ve diğer vücut sıvılarında lokalizedir). Oksijen kullanımı yüksek olan dokularda SOD aktivitesi fazladır (58-60).

3.3.2.1.2. Katalaz (CAT) (EC, 1.11.1.6)

Katalaz 240 kDa ağırlığında, tetramerik yapıda olan, aktif bölgesinde 4 tane hem grubu ve ferriprotoporfirin halkasına sahip bir hemoprotein antioksidan enzimdir. Prokaryotik canlıların çoğunda da olan bu enzim ökaryotik organizmalarda eritrosit, karaciğer ve böbrekte yüksek konsantrasyonlarda iken beyin, iskelet ve kalp kaslarında düşük derişimlerde bulunmaktadır. Ayrıca hücrede peroksizomlarda yüksek lokalizasyonlu olup az miktarda sitozolde ve mikrozomal fraksiyonlarda da bulunabilir. Katalaz enziminin antioksidan özelliklerini yansıtan iki önemli redoks tepkimesi vardır. Bunlardan ilki ortamdaki H₂O₂ konsantrasyonları çok hızlı artıyorsa ya da ortamda yüksek miktarda elektron akseptörü yoksa katalaz enzimi bu durumda aşağıdaki tepkimeyi katalizleyerek hidrojen peroksiti suya ve O₂'ye indirgeyerek ortamdan uzaklaştırır (59).



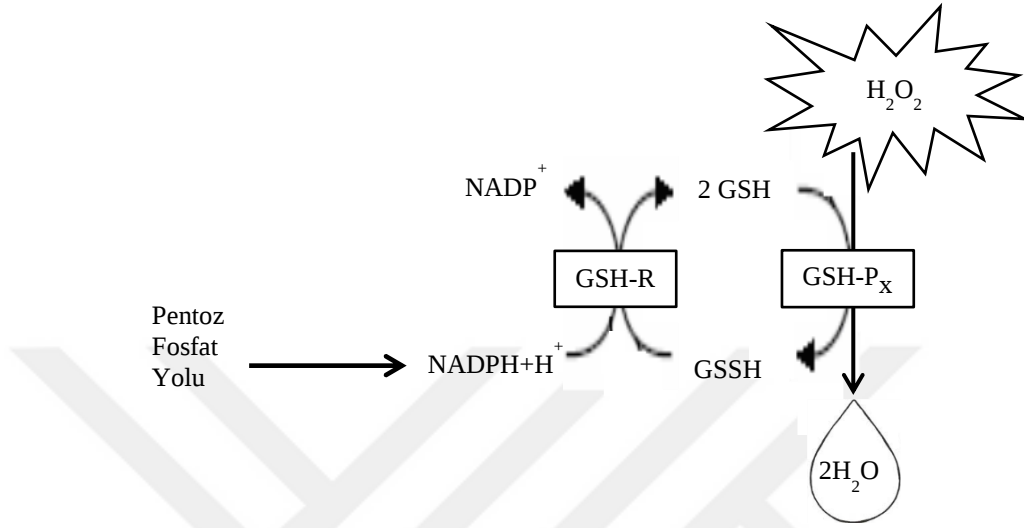
Katalazın antioksidan diğer bir önemli özelliği ise ortamdaki fenol ve aromatik alkollerini peroksidasyona uğratarak detoksifikasyon sağlamaktadır.



3.3.2.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) (EC 1.11.1.9)

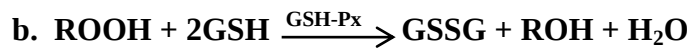
Hücre içi yerleşimli (sitozol ve mitokondri) olan GSH-Px enzimi, 2 adet tiyol grubuna sahip glutatyonun redükte formunu (GSH) glutatyonun disülfid bağı içeren okside formuna (GSSG) dönüştürürken, ortamda bulunan hidroperoksitinde suya redükte olmasını sağlar ve böylece ortamdaki H₂O₂'yi detoksifiye eder. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi için GSSG'nin GSH'a dönüşmesi ya da başka bir ifade ile GSH'ın rejenerasyonunun sağlanması gerekir. Bu reaksiyonu, bir flavoprotein

olan glutatyon redüktaz (GSH-R) enzimi, NADPH'ı kullanarak gerçekleştirir (Şekil 4). Bu noktadan hareketle detoksifikasyon mekanizmasının devamlılığını sürdürebilmesi için pentoz fosfat yolunun sağlıklı işlemesi şarttır (57, 61-63).



Şekil 4. GSH-Px'in Etki Mekanizması ve GSH Döngüsü (51)

GSH-Px, H_2O_2 'nin yanı sıra diğer organik hidroperoksitlerinde (lipid hidroperoksitler ve DNA hidroperoksitler gibi) indirgenme tepkimelerini katalizleyerek (alkollere dönüştürür) lipid peroksidasyonunun başlangıç ve gelişme safhalarını engellemede görev almaktadır. GSH-Px enzimi tetramerik bir yapıdadır ve aktif bölgesinde 4 adet selenosistein içermektedir. Bu enzimin 2 izomeri bulunmaktadır, biri selenyum bağımlı çalışarak hem H_2O_2 'yi hem de lipid hidroperoksitlerin yıkımını kataliz ederken (**a ve b reaksiyonları**), selenyum bağımsız aktivite gösteren çeşidi ise sadece lipidhidroperoksitlerin indirgenmesinde (yıkımında) görevlidir (**b reaksiyonu**).

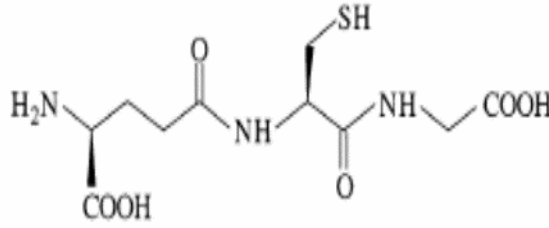


GSH-Px, fagositleri solunumsal patlama sırasında açığa çıkan serbest radikal hasarından koruduğu gibi eritrosit ve hemoglobinleri peroksidasyondan koruyan en önemli antioksidan enzimler arasındadır. Ayrıca GSH-Px'in aktivitesi diyetle alınan selenyum miktarına bağlı olarak artarken, iyodoasetat ve siyanür gibi maddelerle inhibe olmaktadır (60).

3.3.2.2. Nonenzimatik Antioksidanlar ile İlgili Parametre

3.3.2.2.1. Redükte Glutatyon (GSH)

GSH; glutamat, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan bir tripeptiddir (L-γ- glutamil-L-sisteinil-glisin) (Şekil 5)



Şekil 5. GSH'nin Tripeptit Yapısı (64)

Daha çok sitozolik yerleşimli olan bu peptid, hücrelerin oksidatif stres hasarına karşı korunmasında önemli görevler üstlenir. Daha önceden bahsedildiği üzere GSH-Px'in hidroperoksitleri ve lipid peroksitleri suya katalizleyen redoks döngülerinde olduğu gibi ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda görevli olan glutatyon S- Transferaz (GST) enziminin lipid peroksitlerini redükte etmesine bir substrat olarak antioksidan etki göstermektedir. Ayrıca hücre içinde oluşan $\cdot\text{OH}$ radikali ve $^1\text{O}_2$ gibi ROS'lara karşı da direkt etkili bir savunma bariyeri oluşturur. Bu peptide ROS'ları süpürücü antioksidan etkinlik kazandıran en önemli sebep ise yapısındaki sistein amino asidinin içermiş olduğu tiyol (-SH) grubundan ileri gelmektedir (65).

Hücrede milimolar konsantrasyonlarda bulunan glutatyonun primer olarak baskın formu redükte (GSH) halindedir. Ancak okside formu (GSSG) olan disülfüd dimeri halinde de bulunabilir. GSH'ın okside hali ise GSH-R için bir substrat teşkil etmektedir. GSH'ın hücresel derişiminin korunmasında aminoasit taşıyıcılarının yanında glutatyon sentetaz (GS), GSH-Px, GST ve GSH-R gibi çeşitli enzim aktiviteleri rol oynar (64).

3.3.3. Anjiyogenez ve Etkileyen Faktörler

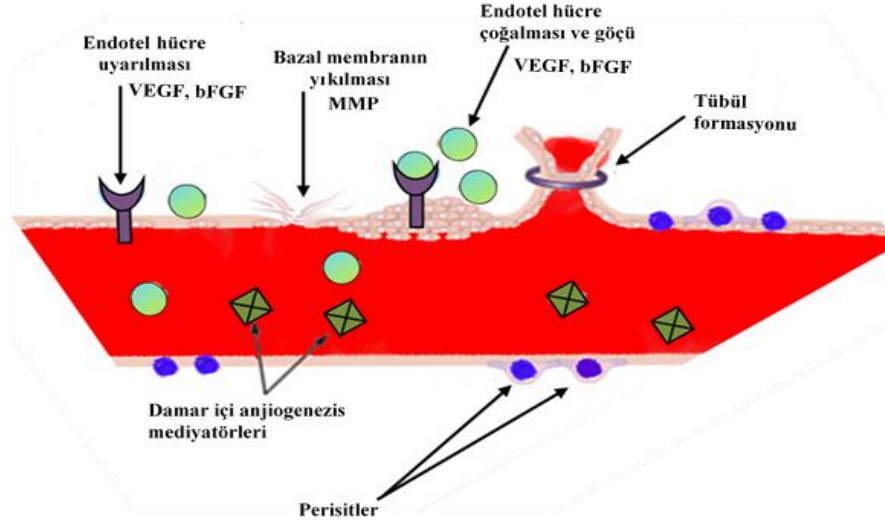
Anjiyogenez kavramı 1935'te ilk kez Herting (66), tarafından literatüre kazandırılmıştır. Organizmanın en küçük birimleri olan hücrelerin yaşamlarını idame ettirebilmeleri için yeni kan damar oluşumları yani vaskulogenezis (embriyonel dönemde kan damarlarının oluşumu) ve anjiyogenez şarttır. Anjiyogenez hem fizyolojik hemde patolojik şartlarda meydana gelebilmektedir. Örneğin; embriyonel dönemde organların gelişiminde, yetişkinlerde ise daha çok hasarlı doku tamirinde (yara iyileşmesi gibi) ya da dişi üreme döngüsünde (menstrüel siklus gibi) fizyolojik olarak gerçekleşirken patolojik olarak ise kanser başta olmak üzere çeşitli otoimmün ve göz hastalıklarında da ortaya çıkmaktadır (67).

Anjiyogenez süreci, birçok molekülün katılımı ile şekillenen kompleks bir mekanizma ile sağlanır. Anjiyogenez aşamaları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- ✓ **Anjiyogenezin başlatılması:** Anjiyogenezin başlayabilmesi için, bir uyarının olması gerekmektedir. Hipoksi ya da enflamasyonun varlığı anjiyogenezi teşvik edici durumlara iyi birer örnek teşkil etmektedir. Ayrıca

anjiyogenezin başlamasında anjiyogenik moleküllerin miktarlarının artmasının dışında anjiyogenez inhibitörlerinin de azalması gerekmektedir.

- ✓ **Bazal membranın yıkımı:** Anjiyogenik faktörler, matriks metalloproteinaz (MMP) ve plazminojen aktivatör (PA) gibi proteolitik enzimleri harekete geçirerek bazal membran ve ekstra sellüler matriks (ESM)'in yıkılmasında görev alır (68).
- ✓ **Endotel migrasyon ve proliferasyon:** VEGF başta olmak üzere anjiyogenik etkenler, endotel hücrelerini kendi almaçları ile etkileşerek aktive ederler ve aktive olan endotel hücreleri ESM'nin içine göç ederler. Artık ESM'e yerleşmiş olan endotel hücreleri büyüme faktörleri sayesinde proliferere olacaktır (69).
- ✓ **Tüp/Tübül formasyonu ve anjiyogenezin sonlanması:** Endotelial hücrelerin çoğalmaları bittikten sonra yapılarında bir takım morfolojik değişikliklere uğrayarak ilk başta bir lumen oluştururlar, sonrasında ise integrinlerinde etkisi ile tüp ya da tübül oluşumu yerine getirilmiş olur (Şekil 6). Perivasküler ve vasküler düz kas hücrelerinin de bu tüp yapısına katılması ile bazal membran ve ESM tekrar sentezlenerek anjiyogenez süreci sonlanmış olur. Henüz yeni oluşmuş bu kapiller olgunlaşır ve anjiyogenez inhibe edilerek damar stabilizasyonu sağlanmış olur. Ayrıca endotel hücrelerinin göçü, proliferasyonu ve damar lümeni oluşum safhalarının hepsi birden tomurcuklanma olarak da ifade edilmektedir (70, 71).



Şekil 6. Anjiyogenez Oluşumunun Şematizasyonu (72)

Folkman (73), tarafından ilk kez 1971 yılında, tümör gelişiminin anjiyogeneze bağımlı olabileceği açıklandıktan sonra devam eden çalışmalar tümöral oluşumların anjiyogenez sürecinin fizyolojik mekanizmalardan farklı olduğunu gözler önüne sermiştir. Fizyolojik anjiyogenez süreci durağandır yani stabildir ve kendi kendine baskılanabilir. Tümöral oluşumlu anjiyogenez ise genellikle hipoksi sonucu gözlemlenirken, kısır bir döngü halinde sınırsız seyredebilir. Çünkü tümör hacmi büyüdükçe ($> 0,5 \text{ mm}^3$) mikro çevresi tekrar hipoksik özellik kazanmakta ve yine anjiyogenez indüklenmesi kaçınılmaz hale gelmektedir (31, 74). Tüm bu durumların dışında bazı deneysel ve klinik araştırmalar, tümöral oluşumlardaki anjiyogenezin, uzak doku metastaz eğilimini ve invazyonu artırdığı bildirilmektedir (70, 75, 76). Özellikle meme ve prostat kanserleri gibi birçok neoplazilerde görülen, hipoksik adaptasyonların kötü prognozla ilişkili olduğu, kemoterapi ve radyasyona karşı daha dirençli ve agresif habis tümörlerin oluşumuna katkı sağlayarak, kanserle mücadeleyi de daha zor bir hale getirdiği kabul edilmektedir.

Endotelial hücrelerinden ve hücre adezyon moleküllerinden salgılanan büyümeyi teşvik edici faktörlerin yanı sıra monositler, fibroblastlar, matriksin kollajen hücrelerinin proteolitik yıkım ürünleri ve tümör hücreleri tarafından salınan birçok ajan tümöral anjiyogenez sürecine müdahil olmaktadır. Tümör anjiyogenez sürecine katılan bir dizi moleküller Tablo 1’de gösterilmiştir (77).

Tablo 1. Tümöral Anjiyogenez Sürecine Etkili Parametrelerden Bazıları (78)

Anjiyogenik etkili parametreler	Anti-Anjiyogenik etkili parametreler
İntegrinler	
PGF (Plasental büyüme faktörü)	Anjiostatin
FGF (Fibroblast büyüme faktörü)	Endostatin
TGF- α (Transforme edici büyüme faktörü- α)	Vazostatin
TGF- β (Transforme edici büyüme faktörü- β)	VEGF inhibitörü
EGF (Epidermal büyüme faktörü)	Trombosit faktör-4 fragmenti
HGF (Hepatosit büyüme faktörü)	Prolaktin derivesi
TNF- α (Tümör nekroz faktör- α)	Restin
PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktörü)	Proliferinle ilgili protein
GCSF (Granülosit koloni uyaran faktör)	İnterferon- α - β
COX-2 (Siklooksijenaz-2)	Anjiopoetin-2
NOS (Nitrik oksit sentaz)	Antitrombin-3 fragmenti
PA (Plazminojen aktivatör)	İnterferon ile indüklenebilen protein-10
Kemokinler	Platelet faktör-4
Efrinler	TIMP (MMP doku inhibitörü)
Proliferin	Osteopontin fragmenti
Anjiyogenin	Maspin
VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktörü)	Trombospondin- 1
VEGFR (VEGF reseptörü)	
MMP’ler (MMP-9, MMP-2 gibi)	

3.3.3.1. Anjiyogenez ile İlgili Parametreler

3.3.3.1.1. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF, VPF)

VEGF, Senger ve arkadaşları (79) tarafından ilk kez tümör hücrelerinde asit sıvılarının birikimini artıran bir vasküler endotelial hücre geçirgenliğini düzenleyici faktör (VPF) olarak tanımlanmıştır. Heparin-bağlayıcı glikoprotein yapısında bulunan bu anjiyogenik faktörün moleküler ağırlığı 34-46 kDa’dur.

Anjiyogenik sinyal yolları arasında en iyi bilinen faktörler arasında yer almakta ve şüana kadar anjiyogenik ajanlar içinde de araştırmalara en fazla konu olan potent bir anjiyogenik sitokin olma özelliğindedir (80).

Bu protein ailesinde: VEGF-A (anjiyogenezele ilgili en çok çalışma yapılan alt aile, MVCD1, İnsan-VEGF'i olarak da adlandırılmaktadır), VEGF-B-C-D-E ve yılan zehiri VEGF'i (VEGF-F) gibi farklı harflerle ifade edilen çeşitlerinin yanında Plasental Büyüme Faktörü (PIGF) ile birlikte bilinen 7 alt tipi ve bu alt gruplarında aminoasit sayılarına göre VEGF-110, 121, 145, 148,165 (en baskın formu), 183, 189 ve 206 olmak üzere 8 farklı izoformu bulunmaktadır (81).

Makrofajlar, monositler, fibroblastlar, keratinosit ve düz kas hücreleri VEGF salınımından sorumlu tutulan hücreleri oluştururken endotel hücrelerinde ise VEGF'in üretimi gerçekleşmez. Ancak bu hücreler VEGF için spesifik reseptörleri barındırdıklarından dolayı anjiyogeneze sürecinde önemlidirler. Ayrıca bu reseptör ve koreseptörler; monosit ve makrofajlarda, hematopoetik hücrelerinde, epitelyal hücrelerde, fibroblastlar, düz kas hücreleri ve miyojenik öncül hücrelerde bulunmaktadır (80). VEGF'in biyoaktivitesini, göstermesinde 3 çeşit transmembran tirozin kinaz ailesi reseptörü sorumludur. Bu reseptörler VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR) ve VEGF-R3 (flt-4) olarak tanımlanmıştır. Kısaca VEGF-R1 ve R2 reseptörleri endotel hücrelerinde bulunurken, VEGF-R3 ise lenf damarları üzerinde yerleşmiştir. Ayrıca VEGF sinyallerinin başlatılmasında, nörofilin (NRP), heparan sülfat, integrinler ve kaderinler gibi çeşitli sellüler komponentlerin VEGF ya da reseptör düzeyinde etkileşimlerinin önemli rolü olduğu bildirilmektedir (81, 82).

Özellikle hipoksi ile indüklenebilen faktör-1 (HIF1- α), inflamatuvar sitokinler, reaktif oksijen radikalleri, nitrik oksit ve hormonların VEGF salınımını uyarması ile reseptörlerinin aktivasyonu sonucu; fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz ve Ras GTPaz aktivatör proteinleri gibi birçok hücre içi sinyal iletim proteini fosforile olmakta ve endotel hücrelerinde proliferasyon, migrasyon ve differansiyasyon gözlenmektedir. VEGF salınımında etkili olan bu faktörlerle reseptörleri arasındaki dengesizlik sonucu kontrol edilemeyen bir inflamatuvar ve anjiyogenez durumunu ortaya çıkarmaktadır. Bu da kanser başta olmak üzere bir dizi patoloji ile ilişkilendirilmektedir (83).

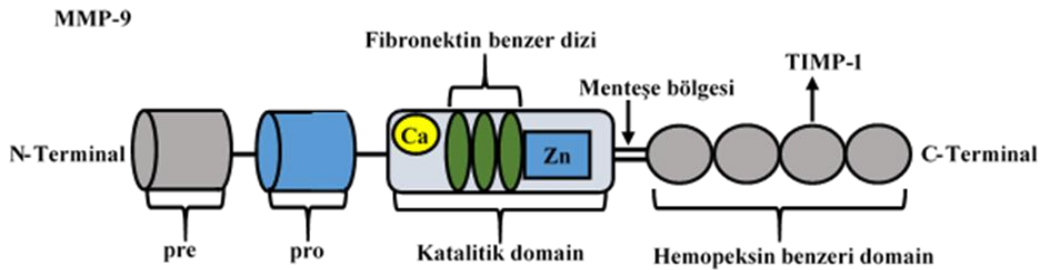
Çeşitli deneysel ve klinik çalışmalar meme karsinomunun anjiyogeneze bağlı bir tümör olduğunu ortaya koymuştur. VEGF, meme kanserinde lenf anjiyogenezini teşvik ederek kanserin ilerleyişini hızlandırdığı gibi östrojen ve çeşitli steroid transkripsiyon faktörlerinin VEGF geni üzerinde bulunan östrojen yanıt elemanlarına (ERE) bağlanmak suretiyle yüksek VEGF ekspresyonuna ve onun mRNA'sına yol açtığı bildirilmektedir (84-86). VEGF'ün ayrıca meme kanseri ile ilgili güçlü bir prognostik faktör olabileceği gibi bu yolağın inhibisyonu meme kanserine karşı etkili bir tedavi stratejisi olarak görülmektedir (84).

3.3.3.1.2. Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9, Jelatinaz B)

Matriksinler olarak bilinen matriks metalloproteinazlar (MMP); ESM ile bazal membran dinamiğini oluşturan komplementleri parçalayan, aktif merkezlerinde çinko bulunan, kalsiyum bağımlı fonksiyon gören bir homolog ekstra-sellüler yerleşimli proteaz ailesini oluşturmaktadır (87).

MMP'ların büyük bir çoğunluğu bağ dokusu hücrelerinde olmak üzere enflamatuvar fagositler tarafından da salınabilmektedir (88). MMP ailesi bünyesinde, fizyolojik ve patolojik doku yıkımından sorumlu olan 28 farklı enzim bulunurken, yapı ve substrat farklılıkları göz önüne alındığında; kollajenazlar, stromelisinler, jelatinazlar (MMP-2, 9), membran tipi MMP'ler (MT-MMP) ve sınıflandırılmayan MMP'ler olmak üzere 5 alt aile tanımlanmaktadır (89).

Jelatinazların iki üyesinden biri olan MMP-9, bazal membrandaki özellikle tip-IV kollajeni yıkan bir endopeptidazdır (Tip-IV kollejenaz) (90). Molekül ağırlığı 92 kDa olan bu enzim grubu ayrıca MMP ailesinin en büyük üyesi olma özelliğini taşımaktadır. MMP-9 enzimi çoğu MMP'lar gibi, yapısında ortak olarak bulunan 5 farklı gen bölgesi ihtiva eder; sinyal peptid dizisi, propeptid dizisi, katalitik domain (çinko bağlama bölgesi içerir), kanca (menteşe) bölgesi ve hemopeksin benzeri domain (Şekil 7)(91).



Şekil 7. MMP-9'un Genel Yapısı (91)

Propeptit bölge ile katalitik çinko bağlayan bölge etkileşerek enzimin inaktif halde kalmasını sağlar ('Sistein switch' modeli) (88). N-terminal uçta bulunan 80 amino asitlik propeptid bölgenin proteolitik yıkımı ile 100 amino asitlik katalizör bölgeden ayrılması sonucu, katalizör bölgedeki çinko iyonlarının serbest kalması ile enzimin aktivitesi ortaya çıkmaktadır. MMP-7 ve MMP-26 dışındaki diğer MMP'ların C terminallerinde bulunan hem bağlayıcı, hemopeksin benzeri

domainler ise endojen doku inhibitörleri olan TIMP'ların jelatinaz grubu MMP'lara (MMP-2, MMP-9) ve MMP-13'e bağlanmasından sorumlu kısımdır, TIMP'lar bu enzimlerin aktivitelerinde ve inhibisyonlarında görev alırken hemopektin benzeri domain ayrıca jelatinazların substrat özgüllüğünü belirlemede de önemli rol oynamaktadır (91). Katalitik bölge ve hemopeksin benzeri bölge arasında menteşe adı verilen prolinden zengin bağlayıcı birim yer almaktadır. Ayrıca katalitik bölgede bulunan fibronektin benzeri dizinin ise kollajen ve jelatinlere bağlanmayı kolaylaştırdığı düşünülmektedir (89).

Bu enzim ailesinin aktiviteleri çeşitli uyaranlar tarafından düzenlenmektedir. İntegrinler, onkogenler, tümör promotörleri, hormonlar, kimyasal ajanlar veya fiziksel etkenler MMP'lerin ekspresyonlarını değiştirdiği gibi tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) ve interlökin 1 beta (IL-1 β), IL-1 ve IL-6 dahil olmak üzere pro/inflamatuvar sitokinlerin promotörlerine, mitojen aktif protein kinaz (MAPK) , nükleer faktör kappa beta (NF- κ B) ve aktivatör proteini (AP-1) gibi birkaç farklı transkripsiyon faktörlerinin bağlanması yoluyla gen ekspresyonunu artırarak MMP genleri aktive edilebilir (örneğin, ultra viole ışınlarına maruziyet sonrasında MMP-9'un ekspresyonu artmaktadır) (92). Endojen inhibitörler yolu ile örneğin; dolaşımdaki α -2-makroglobulin spesifik olmayan endojen bir MMP inhibitörü rolündeyken, dokuda ise bu görevi spesifik inhibitörle TIMP'lar üstlenmektedir. Ancak bu TIMP'lar aynı zamanda MMP'lerin aktifleşmesi içinde gereklidir. Ayrıca MMP'lerin aktivasyonu, inaktif zimojenler aracılığı ile ya da başka ifade ile proenzimin aktif hale getirilmesiyle sağlanabilir ki bu en karmaşık yoldur. Hücreden salınan MMP' ların çoğu inaktif moleküller olarak salınmaktadırlar. Propeptid dizisi içeren inaktif MMP'ler,

otokataliz, doku veya plazma proteinazları, oportunistik bakterial proteinazlar, ürokinaz plazminojen aktivatör/plazmin sistemi veya diğer membran tip MMP'lar (MT-MMP) ile aktifleşirler (88). Stabil formda olan bir pro- MMP-9 'un aktifleşmesi için, kendisinin hemopeksin benzeri domainin, TIMP-1'in C-terminal bölgesi ile birleşmesi gerekmektedir oluşan non-inhibitör kompleksin, hücre yüzeyinde bulunan MT-MMP-1'in aktif domaini ile birleşmesi sonucu bu üçlü kompleks ise MMP-9'un aktivasyonunu sağlar (93). Bu aktivasyon mekanizmasından farklı olarak, TIMP-1 aynı zamanda MMP-9'un hemopeksin C- alanı bölgesine bağlanmak süreti ile MMP-3'ü de içeren bir inhibitör trimoleküler kompleks oluşturmak üzere MMP-9'un inaktivasyonunda da rol oynamaktadır (94).

MMP'lar kanser gelişim sürecinde inflamasyon, anjiyogenez, invazyon ve metastaz süreçlerine katılmaları sebebi ile birçok kanser çalışmalarına konu olmuştur. Malign dokularda tümör saldırganlığını ve metastatik potansiyel ile en fazla ilişkisi saptanan MMP'lar MMP-9 ve MMP-2 dir (90). Bu bağlamda çalışmalar invaziv ve metastatik tümörlerde ekspresyondaki değişiklikleri ve bu enzimlerin artmış proteolitik aktivitesini doğrulamıştır. MMP'lerin tümörün yayılımındaki aktivitesi hem doğrudan hem de dolaylıdır. Neoplastik hücrelerin proliferasyonunu ve ekstrasellüler matriks ve bazal membranın degradasyonu yoluyla metastatik yayılımı doğrudan desteklerken, dolaylı olarak anjiyogenezi stimüle ederek, tümörün beslenmesini ve yayılmasını sağlar (95).

MMP-9, anjiyogenezin güçlü bir indükleyicisi olan vasküler VEGF'in biyoyararlanımını kontrol ettiği için meme kanserinin anjiyogenezinde hayati bir rol oynamaktadır (96).

MMP-9 ekstrasellüler matriksin yıkımını artırmak ve tümör hücrelerinin yakınındaki vasküler bazal membranda kollajeni (Tip-IV) yıkarak malign meme hücrelerinin metastazına katkıda bulunur. Ayrıca ER + olan meme kanserlerinde MMP'lerin salınımı ve aktivasyonu hedef gösterilmektedir (97-99).

MMP'ler çeşitli neoplasmların erken tanısında, progresyonunun takibinde ve metastazının saptanmasında değerli bir prognostik belirteç özelliğindedir. Nitekim meme kanserlerinde de MMP-9 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu vurgulanmaktadır (95).

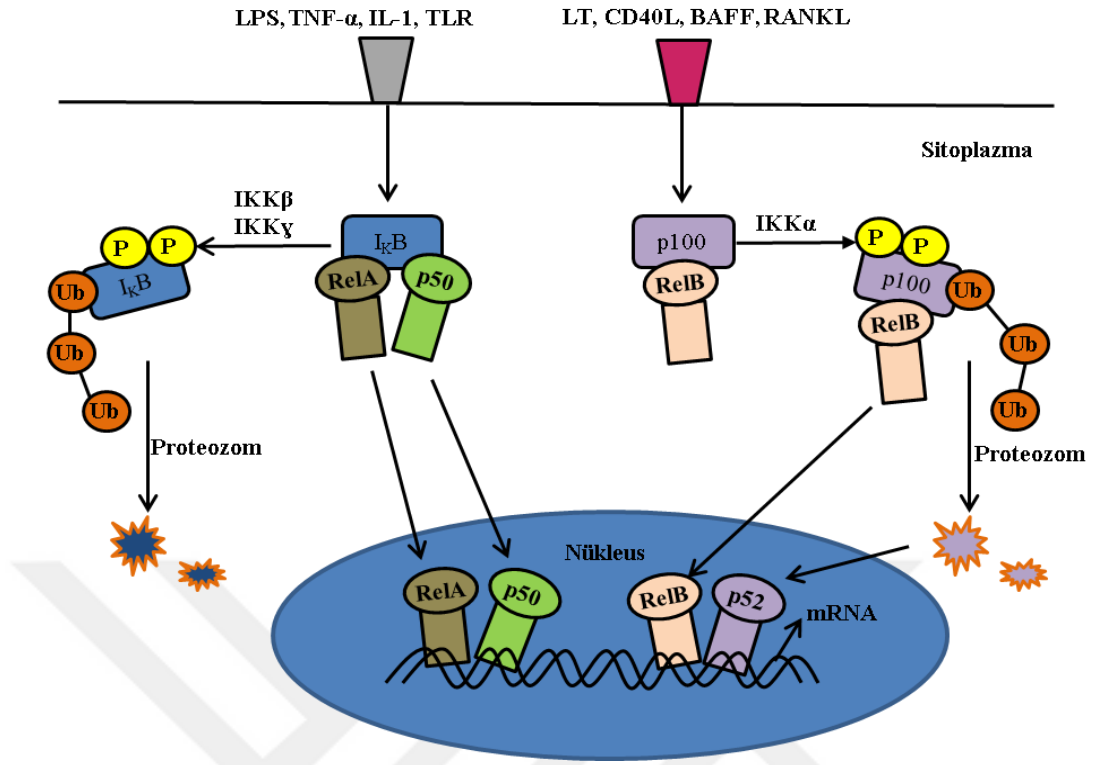
3.3.3.1.3. Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B)

Aktifleştirilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir güçlendiricisi diye adlandırılan NF- κ B ailesi, çeşitli genlerin promoter ve güçlendirici bölgelerinde bulunan ayrı DNA dizilerine bağlanan, Rel-homoloji alanlarını (RHD'ler) içeren transkripsiyon faktörleridir. Memeli hücrelerinde, NF- κ B ailesinin beş üyesi vardır: RelA (p65), RelB, C-Rel, p105 (NF- κ B1; p50 prekürsörü) ve p100 (NF- κ B2; p52 prekürsörü) (100). NF- κ B; Rel ailesi üyelerinin yer aldığı çeşitli hetero ve homodimer kompleksler içermektedir. Günümüzde en iyi karakterize edilmiş NF- κ B protein ailesinin üyeleri; p65 (RelA) /p50, RelB/ p100-52 heterodimerleri ve p50 / p50 homodimer kompleksleridir (101).

İstirahat halinde NF- κ B, inhibitör kappa-B (I κ B) proteinleri olarak bilinen bir inhibitör protein ailesi ile etkileşime girerek, sitoplazmada inaktif bir formda tutulmaktadır. I κ B ailesi ankirin tekrarları içerir ve yedi üyesi vardır: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, I κ B ζ ve I κ BNS (102). Bu ilk 4 üye NF- κ B'nin nükleer

translokasyonunu önlemek için, doğrudan etkileşimler yoluyla sitoplazmada NF- κ B'nin nükleer lokalizasyon sinyalini inhibe eder. Bununla birlikte, son 3 üye ise çekirdekte bulunur ve transkripsiyonu düzenlemek için NF- κ B ile etkileşime girer. NF- κ B aktivasyonu; fosforilasyon, ubiquitinasyon ve I κ B'nin proteozomal degradasyonu yolu ile sağlanmaktadır (102, 103).

Son yıllarda, NF- κ B aktivasyonu için iki ayrı yolağın tanımı netleşmiştir. 'Kanonik ya da klasik' yolak; genellikle p65 (RelA) /p50 heterodimer içeren komplekslerin aktivasyonuna yol açan mikrobik ürünlerle (LPS) ve TNF- α , IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerle ve Toll benzeri reseptör (TLR) sinyaller ile tetiklenmektedir (104). 'Non kanonik ya da alternatif ' NF- κ B yolağı ise; genellikle RelB/ p100-52 heterodimer kompleks aktivasyonu içerir. Bu yolağı CD40 ligandı (CD40L), TNF ailesi sitokinleri - lenfotoksin β (TNFSF3), B hücre aktivasyon faktörü (BAFF) ve NF- κ B ligandının reseptör aktivatörü (RANKL) gibi mediyatörler uyarmaktadır. NF- κ B'nin aktivasyonundaki en önemli basamaklardan biri de I κ B'ların, çoklu inhibitör kappa-B kinaz (I κ K) kompleksi ile fosforillenmesi sonucu I κ B'lerin proteolitik yolla yıkılmasıdır. I κ K kompleksi iki kinaz alt birimi; I κ K1 (I κ K α), I κ K2 (I κ K β) ve bir düzenleyici alt birim; NEMO'dan (I κ K γ) oluşmaktadır. I κ K β klasik yolağın aktivasyonundan sorumlu iken; I κ B'leri fosforile ederek düzenler ve I κ K γ alt birimini de gerektirirken alternatif yolağın aktivasyonundan ise sadece I κ K α sorumludur (104, 105) (Şekil 8).



Şekil 8. Kanonik ve Alternatif NF-κB Yolaklarının Kareografisi (105)

Özetle; sitoplazmada istirahat halinde IκB ile bağlı halde bulunan NF-κB inaktif halde iken; pro/inflamatuar sitokinler, radyasyon ve bazı kemoterapötik ajanlar, serbest radikaller, mitojenler, büyüme faktörleri, bakteriyel ya da viral genler gibi birbirinden farklı geniş yelpazeli indüktörlerin reseptörleri ile etkileşimleri sonucu, IκK'lar tarafından IκB'lerin spesifik fosforilasyonları gerçekleştirilmekte ve IκB'ler ubikitinasyonla degrade olmaktadır (103, 106). Bu işlem, NF-κB'nin sitoplazmada serbest kalmasına ya da başka bir deyişle NF-κB aktifleşmesi anlamına gelmektedir. Aktifleşen NF-κB çekirdeğe transloke olur ve RHD'leri sayesinde, nükleusta transaktiviteden sorumlu spesifik genlerin başlatıcı (promoter) veya artırıcı (enhancer) dizilerine bağlanmak koşulu ile homo ya da hetero-dimerler oluşturarak, spesifik bir dizi genin ekspresyonunu başlatmaktadır (IL-6 ve IL-12 gibi çeşitli sitokinlerin, ICAM-1, VCAM-1, E-selektin gibi

adhezyon ajanlarının, VEGF, MMPLar gibi anjiyogenez parametrelerinin, COX-2 ve iNOS gibi enflamatuar ajanların gen ekspresyonunun başlaması ve artması gibi) (105, 107).

NF- κ B proteinleri başta inflamasyon olmak üzere, bağışıklık ve kanser progresyonu ile ilişkili genlerin ekspresyonlarını bu iyi koreografik yolların iştirak ettiği kompleks sinyal iletim mekanizmaları ile düzenlemektedir. Bu yollardaki meydana gelen çeşitli aksamalar kanser de dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkilendirilmektedir (100).

Son zamanlarda kanserin başlatılmasında, gelişmesinde ve metastazında NF- κ B'nin rolü özellikle dikkat çekmiştir. İnflamasyonda aktivitesi artmış NF- κ B ekspresyonlarının tümör oluşumunda ve progresyonunda rol oynadığı bildirilirken, bağışıklık sisteminin tümör hücrelerine saldırmaktan korur ve onkojenik mutasyonlara yol açan hücre proliferasyonunu ve genetik instabiliteyi indükler. Bununla birlikte NF- κ B aktivasyonunun, kanser tedavisinin başarısına gölge düşüren direnç oluşumuna da katkı sağladığı bildirilmektedir (104, 108, 109).

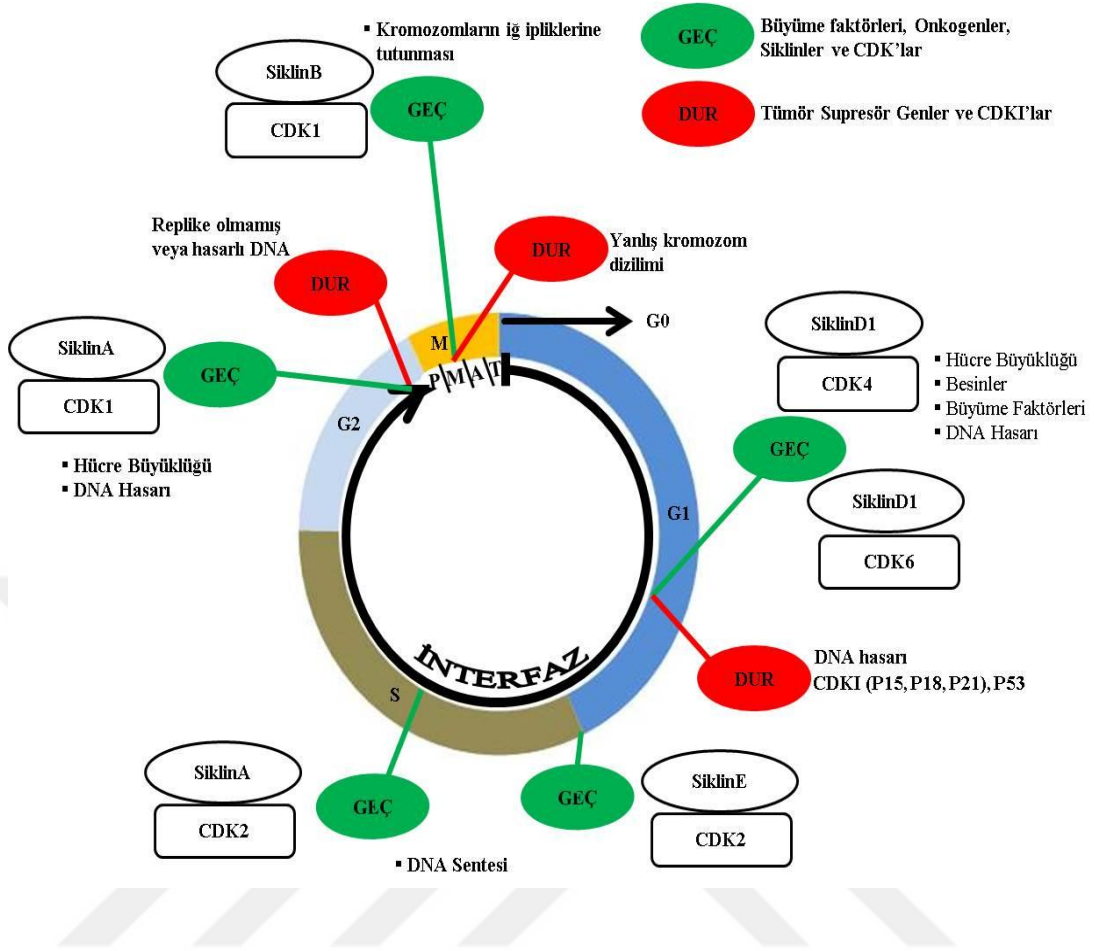
Ayrıca meme kanserleri gibi birçok neoplastik durumda; tümörün enflamatuar mikroçevresine ve çeşitli onkojenik mutasyonlarına bağlı olarak gelişen yapısal NF- κ B aktivitesi gösterilmiştir. NF- κ B aktivitesi sadece tümör hücrelerinin proliferasyonunu artırmaz, apoptozu bastırır ve anjiyogenezin stimülasyonuna neden olur, aynı zamanda epitelyal mezenkimal geçişi de tetikler bu da hücrelerin malign dönüşümleri ile yakından alakalı olan hücre invazyonu ve metastazından sorumlu birçok genin ekspresyonunun NF- κ B tarafından kontrol edildiğini ortaya koymaktadır (109, 110).

3.3.4.Hücre Siklusu ve Proliferasyonunu Etkileyen Faktörler

Vücudumuz, yaklaşık yüz trilyon canlı hücre barındırmaktadır. Vücudumuzu oluşturan bu hücreler insanlar gibi doğar, büyür, çoğalır ve ölmektedirler. Yetişkinliğe kadar hücrelerin bölünmesi hızlıken, yetişkinlik sonrasında hücrelerin bölünebilme hızları minimal düzeylere inmektedir. Yaşlanmış organizmada ise, çoğu hücreler artık yalnızca hayati fonksiyonlarını sürdürülebilmek, hasara uğramış dokuyu tamir etmek ya da ölen hücrelerin yerine yenilerini getirebilmek için çoğalma işlevini gerçekleştirmektedir.

Her ne sebeple olursa olsun ökaryotik canlı organizmanın herhangi bir vücut hücresine, çoğalması için bir komut (sinyal) ulaşmışsa, o hücre de artık bir seri biyokimyasal olayların tetiği çekilerek, kromozomal ve morfolojik açıdan kendisi ile aynı olan 2 yeni (yavru) hücrenin oluşması kaçınılmaz hale gelmektedir. İşte bu olay hücre bölünmesi olarak adlandırılırken, tüm bu süreçlerin yönetilmesinden ise hücre siklusu sorumludur (111). Ökaryotlarda hücrelerin ikiye bölünmesi mitoz ya da mayoz bölünme ile gerçekleşirken mayoz bölünme eşey hücrelerinde görülür, vücut hücrelerinde görülen ve temel hücre bölünmesi diye adlandırılan bölünme şekli ise mitoz ile ifade edilirken ayrıca hücre siklusunda da önemli görevler üstlenmektedir. Hücre döngüsü interfaz ve mitoz diye 2 ana faza ayrılmış gibi görünsede içinde birbirini sıkıca takip eden dört farklı faz barındırmaktadır. Bu farklılık iki mitoz arasındaki döneme karşılık gelen interfazın 3 tane alt faza ayrılmasından (G1-S-G2) meydana gelmektedir (35, 112). İnterfazın hazırlık evresi diye adlandırılan G1 evresinde (predublikasyon evresi, ara faz, gap-1 evresi), hücrede hem metabolik olaylar çok aktiftir hemde sürekli büyüme sinyallerine maruz kalan tek alt faz özelliğindedir. Tüm bunların

sonucunda spesifik hücre fonksiyonlarının oluşumunda gerekli bir dizi gen, proteinler ve enzimler eksprese olurken ve RNA sentezi de bu fazda görülebilir, bu fazda amaç DNA sentezine hazır olmaktır. Döngünün S fazında (sentez evresi) ise DNA sentezlenip miktar olarak iki katına çıkarken (DNA replikasyonu), bir yandan da RNA sentezi devam etmektedir ve bu fazda mitoz için gerekli protein ekspresyonları da pik seviyeye ulaşmıştır. Ayrıca her bir kromozom duplikasyona uğramaktadır. Siklusun G2 (gap-2) evresinde ise DNA iplikçiklerinin boyları kısaltmakta, kromozomlar boyanabilir özellik kazanmakta ve DNA sentezi tamamlanmaktadır. Ayrıca hücre yine büyümeye ve iki yavru hücreye yetecek kadar proteinler üretmeye devam etmektedir. Siklusun son fazı olan M fazında ise (mitoz fazı), protein ve RNA ekspresyonları ani olarak bazal seviyelere düşmekte esas hücreden diploid sayıda kromozom içeriğine sahip iki yeni kardeş hücreler oluşmaktadır. Bu fazdan sonra hücrenin akıbeti 2 yola ayrılmaktadır, ya yeniden bölünme siklusuna iştirak etmek üzere G1 fazına veyahut dinlenme fazı olan G0 fazına (istirahat fazı) kayacaktır. G0 fazındaki hücreler, canlılıklarını sürdürebilmekte ve genel olarak özelleşmiş bir fonksiyonda görev almaktadırlar (35, 111, 112). Normal hücrelerde siklusu oluşturan bu fazlar arasında da (geç G1, G2-M ve M) kontrol noktaları vardır (Şekil 9). Bu kontrol noktaları aracılığı ile, doğru DNA'nın eldesi (DNA'nın hasarsız olması), uygun hücre büyümesi, DNA'nın replikasyonunun tamamen doğru bir şekilde gerçekleşmiş olması ya da başka bir deyişle mitoz için gerekli tüm şartların eksiksizce yerine getirilmesinin sağlanması ve kromozomların doğru dizilimlere sahip olması gibi bölünme ile ilgili bir seri olaylar denetlenirken, bunun dışında farklılaşma ve apoptoz gibi hücrelerin kaderini değiştirecek fonksiyonlarda da hücre siklusu görev almaktadır.



Şekil 9. Hücre Siklus Fazları ve Kontrol Noktaları (116)

Hücrelerde bu olağanüstü döngünün kontrolü, bu kontrol noktaları üzerinde; bazı onkogenlerin, tümör süpresör genlerin ve hücre siklusuna özgü proteinlerin eş zamanlı olarak yürüttükleri kompleks ve karmaşık biyokimyasal mekanizmalar ile sağlanmaktadır (Şekil 9) (113). Bu kontrol noktalarına etki eden büyüme sinyalleri (EGRF vb.) ve onkogenler (c-erbB-2/Her-2 neu, Wnt, β -kateninler vb.), Siklinler (Siklin A,B,C,D,E vb.) ve Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK) proliferasyonu stimule ederken, tümör süpresör genler (p53, Rb vb.), CDK inhibitörleri (CDKI) ise döngüyü inhibe ederler. Hücre siklusu kontrol noktalarını düzenleyen gen ve proteinlerde meydana gelen mutasyonlar ya da engellenemeyen DNA hasarları

sonucu bu kontrol mekanizmalarının bozulması, kontrolsüz hücre büyümesine yol açmaktadır. Bu olumsuz durumlar sonucu kanserin oluşumuna davetiye çıkarılmaktadır (114, 115).

3.3.4.1. Hücre Siklusu ve Proliferasyonu ile İlgili Parametreler

3.3.4.1.1. Hücre Replikasyonunda Siklin D1 (cyc/cln, CCND1)

Hücre siklusu, bir takım genlerle koordine Siklin (cyc/cln, CCND), CDK ve CDKI'ler tarafından düzenlenebilmektedir. Bu proteinlerin konsantrasyonları, hücre döngüsünün farklı fazlarında değişiklik göstermektedir. CDK ve CDKI'lerinin tüm hücre siklusu boyunca sentezleri devam etmektedir ve serbest formda inaktif halde bulunurlar. Siklinlerde ise, bu durum biraz değişiklik göstermektedir; hücre siklusunun sadece spesifik fazlarında sentez edilip işlevleri sona erince ubiquitinasyonla parçalanırlar. Siklinler, bir ya da daha fazla CDK'a bağlanarak, onların aktive edilmesi ve aktif Siklin-CDK komplekslerinin oluşmasında spesifik substrat özelliği gösterirken, oluşan bu kompleksler ile çeşitli tümör süpresör genleri fosforillemek suretiyle bölünmeyi baskılayıcı etkileri ortadan kaldırarak tümör oluşumuna katkıda bulunurlar (117). Memelilerde hücre siklusunun düzenlenmesinde görevli, bilinen en az 15 çeşit CDK (1-11 gibi) ve Siklin (Siklin D-E-A-B gibi) bulunmaktadır (118).

Hücre döngüsü ile ilgili proteinlerin, kanser sürecine katılmalarını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Muhtemelen hücre siklus fazları arasında G1 fazı, hücrede bölünmek differansiye ya da ölmek gibi çeşitli hayati kararların verildiği bir dönüm noktası olması ve siklusta düzeyi ilk artan proteinin Siklin D

(başlangıç siklinleri) olması sebebiyle siklin D1 kanser çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadır (119).

Siklin D; D1, D2 ve D3 olmak üzere 3 alt tipe ayrılmaktadır. Siklin D1 (CCND1), 11q13. kromozomda lokalizedir (120). Siklin D1, D2 ve D3 ile beraber CDK-4 ve CDK-6'nın regülasyonunda görev alır ve erken G1 evresinde siklusun ilerlemesinden sorumlu tutulmaktadır. İstirahat fazındaki ('quiescence') bir hücre eğer, erken G1'de bölünme sinyali alırsa; Siklin D, CDK4 ve CDK6'nın aktivasyonunu uyararak 'Siklin D-CDK-4' ve 'Siklin D-CDK-6' aktif komplekslerini oluşturur. Bu kompleks; normalde G1/S kontrol noktasında hipofosforile ve transkripsiyon uzama faktörü-2 E2F ile bağlı bulunan hücre bölünmesini durdurucu (negatif) etki gösterebilen bir tümör süpresör genin ürünü olan retinoblastoma proteininin (pRb) fosforile olmasına ve onun inaktivesine neden olmaktadır. Rb proteini artık inaktifleşince kendisine bağlı halde bulunan E2F'yi serbest bırakmak zorunda kalır. Serbestleşen E2F, siklusta S evresine geçiş için, gerekli olan hedef genlerin transkriptini uyararak hücre siklus bilokajını ortadan kaldırır (118, 121). Ayrıca CDK'lar tarafından fosforillenmiş substratlar (Rb vb.) tekrar hipofosforile hallerine, fosfatazlar enzimleri aracılığıyla dönerken, CDK'ların aktivetelerinin sonlandırılmasında ise CDKI'leri rol almaktadır (122).

Meme başta olmak üzere birçok kanserde, hücre döngüsünde G1 ve G1-S fazlarında Siklin D1'in yüksek düzeylerine dikkat çekilirken, meme karsinomlarının gelişiminde %50 daha fazla ekspresyonun olduğu bildirilmektedir (123). Ayrıca Siklin D1'in, büyüme faktörü ya da E2 ile stimule olan meme epitelyal hücre proliferasyonunda hız sınırlayıcı faktörlerden biri olduğu

düşünülmektedir ve bu nedenle, meme kanserogenezi sürecinde G1'deki proliferatif sinyalleri engellemek için kilit bir hedef niteliğindedir (124).

3.3.4.1.2. Hücre Proliferasyonunda Spesifik Sinyal Yolağı Wnt/ β -katenin

Wnt gen ailesinin, ilk keşfedilen (1982) üyesi Wnt-1 (Int-1)'dir. Bu gen farelerde oluşturulan meme tümörünün aktivasyonuna katıldığı için bir proto-onkogen olarak nitelendirilmiştir (125). Daha sonra kanser üzerine potansiyel etkileri, çalışmalara konu olmuş ve yapılan moleküler çalışmalarla Drosophilada bulunan Wingless geni (wg) bulunmuştur. Bu genin, insanda ki int-1 geni ile aynı dizilere ve işlevsel benzerliklere sahip olduğu yani homoloğu olduğu saptanmış olup, otoriteler bu iki genin ismini birleştirilerek bugün ki 'Wnt' isminin son halini literatüre kazandırmışlardır (126). Geline nokta Wnt geninin, memeli dokularına katılan 19'dan fazla çeşidinin olduğu tanımlanmıştır (127).

Fertilizasyonu gerçekleşmiş olan bir yumurtadan, kompleks organizmaya varana kadar geçen süreçte hücreler, karmaşık ve gelişmiş çeşitli sinyal iletim yolları tarafından sıkıca kontrol edilmektedir. Hücrelerden sekrete edilen Wnt proteinleri de, hücre yüzeyindeki spesifik almaçlarına bağlanarak birçok basamakla, hücre akıbetini ve çeşitli farklılaşma parametrelerini kontrol altına alır. Yüksek derecede korunmuş olan Wnt sinyal yolağının hücre adezyonu başta olmak üzere, hücre polaritesi ve hareketi, hücre proliferasyonu ve ölümü, hücre yenilenmesi ve farklılaşması gibi pek çok hücresel süreçte hayati değer taşıyan mekanizmaların düzenlenmesinde aktif rol aldığı bildirilmektedir (128, 129).

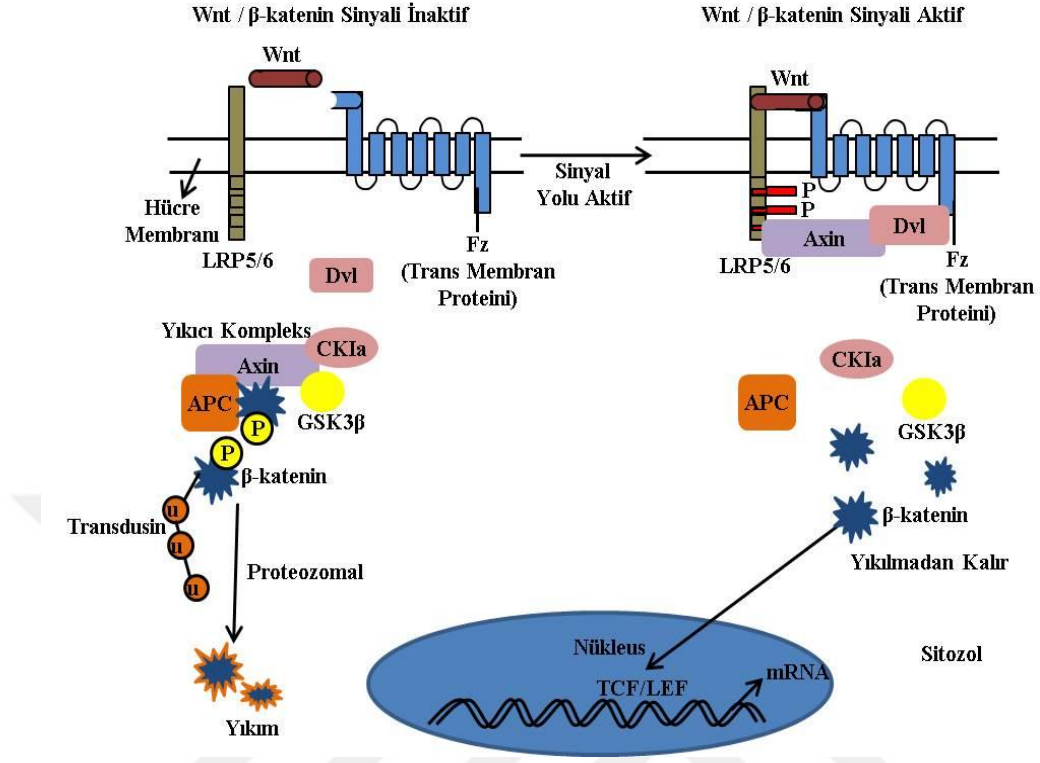
Hücrede Wnt sinyalleri etkilerini 3 farklı yolla göstermektedir. Bu etkilerin ilk ikisini; alternatif yol anlamına gelen, kanonik olmayan Wnt/Ca⁺² ve Düzlemsel Hücre Polaritesi Wnt/Planar (PCP) yolları oluşturur. Bu yollar üzerinde, β -kateninin herhangi bir rolü bulunmazken, β -katenin ile ilişkili esas yolak ise klasik yolak diye adlandırılan kanonik Wnt/ β -katenin üzerinden yürütülmektedir (130).

β -katenin proteini, ilk kez 1989'da tanımlanmıştır, CTNNB1 geni tarafından sentezlenmekte olup ve yapısında çeşitli sayılarda korunmuş 'Arm' bölgeleri barındırır. Toplamda 782 amino asit ihtiva eden β -kateninin molekül ağırlığı 92 kDa'dur. β -katenin; hücre membranında bulunan E-kaderin'leri, hücre iskeletindeki α -aktin flamanlarına bağlayarak hücre adezyonunda önemli bir rol üstlenir (131). β -katenin, proteininin yapısındaki çeşitli bağlanma bölgeleri sayesinde birçok molekülle etkileşim halindedir. Zamanla yapılan çalışmalar, β -katenin üzerindeki bölgelere; Adenomatöz poliposis koli (APC), Axin ve T-hücre faktör/ lenfoid artırıcı faktör (TCF/LEF) gibi bir takım moleküllerin bağlanması ile β -kateninin sadece hücre adezyonunda değil, Wnt/ β -katenin sinyal yolağında da önemli görevler üstlendiğini göstermektedir (132, 133). Wnt/ β -katenin sinyal yolağının en önemli hedef moleküllerinden biri olması sebebiyle, bu sinyal yolağı ile ilişkili bir takım hastalıkların oluşum mekanizmasının aydınlatılmasında β -katenin molekülünden yararlanılmaktadır.

Wnt sinyalinin yokluğunda; sitozolde bulunan 'APC-Axin-GSK-3 β -CK-1' biyomoleküllerinden oluşan ' β -katenini yıkımlayıcı multiprotein kompleksi', fosforile halde ve aktif durumdadır yani bir başka ifade ile pozitif yüke sahip β -kateninle bu yıkımlayıcı kompleks birlikte bulunmaktadır. Bu komplekste bulunan başta kazein kinaz-1 (CK-1) olmak üzere glikojen sentaz kinaz-3 beta

(GSK-3 β) komponentleri sayesinde, β -katenini fosfatlayarak (β -kateninin N-ucundaki serin ve treonin rezidülerini) yıkmak için transdusin tarafından tanınır hale gelmesini neden olurlar. Sonuç olarak bir kere fosfatlanmış olan β -katenin transdusin aracılığıyla ubiquitinasyona sonrasında ise proteozomal yıkıma uğramaktadır (134, 135).

Wnt sinyalinin varlığında ise; Wnt ligandının hücre zarındaki spesifik Frizzled (Fz) almaçlarına ya da ko-reseptörüne (düşük-yoğunluklu-lipoprotein-reseptör-proteini olan LRP5/6 proteinine, hücre içine bakan kısımda) bağlanması sonucu hücre içi sinyalizasyon uyarılır. Böylelikle Wnt sinyallerinin startı için gerekli olan üçlü kompleks 'Fz-Wnt-LRP5/6', membranın sitozole bakan kısmında birbirleri ile bağlanır (135, 136) (Şekil 10). Bu bağlanmanın gerçekleşmesi sonucu, sitozolde serbest halde bulunan DVL (dishevelled) membranın iç yüzüne doğru hareket eder ve yukarıdaki membranda şekillenen üçlü kompleksle uyarılmaktadır (fosforillenmektedir). DVL'nin fosforillenmesi, sitoplazmada β -katenin ile bağlı bulunan yıkımlayıcı kompleksin bertaraf edilmesine (bilinmeyen sebeple, DVL'nin yıkımlayıcı kompleksteki aktini kompleksten ayırıp hücre membranına kaydırması ile ilişkilidir) ve β -katenin stabilizasyonuna (sitozolde birikmesine) neden olur. Artık yıkım kompleksinden ayrılmış, serbest halde ve aktif (defosforile) olan β -katenin nükleusa doğru translokasyon yapabilecektir. Çekirdeğe girmiş β -katenin ise, TCF/LEF üyelerini içeren transkripsiyon faktörlerine bağlanarak, çeşitli koaktivatörlerin yardımıyla birlikte hücrenin proliferasyonunda görevli çok sayıda Wnt hedef geninin ekspresyonunu başlatır (136).



Şekil 10. Wnt/β-katenin Sinyal Mekanizması (135)

Tüm bu ortaya konulan mekanizmalarla birlikte, β-katenin başta olmak üzere, bu yolağı oluşturan diğer pro-onkogen ya da tümör süpresör elemanlarda meydana gelen mutasyonlar ve fonksiyonel bozulmalar ya da sürekli olarak uygunsuz aktivasyonlar, Wnt/β-katenin yolağının kontrolünün bozulmasına ve kanser gibi bir takım hastalıkların (Tip II diyabet, Parkinson, Alzeheimer, meme kanseri, hepatokarsinom, kolon kanseri, lösemi gibi) gün yüzüne çıkmasına sebep olmaktadır (127).

Örneğin sporadik gelişen kolorektal kanserlerin (KRK) yaklaşık %80-90'ında APC mutasyonu ile birlikte Wnt/β-katenin yolağının uygunsuz aktivasyonu görülmektedir (135, 137).

Ayrıca sitoplazmada biriken β -katenin'in çekirdeğe doğru yer değiştirmesi meme kanserinden sorumlu tutulan çeşitli hedef genlerin (Siklin D1, çeşitli anjiyogenez ve metastazda rol oynayan genler gibi) transkripsiyonuna yol açtığı bildirilerek özellikle nükleus ve sitoplazmadaki β -katenin'in aşırı ekspresyonun, insan meme karsinomlarında, kötü prognoz ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır (138).

3.3.5. Apoptozis ve Etkileyen Faktörler

Apoptozis, yunanca da 'dökülen yaprak' anlamına gelen bir terimdir, programlı hücre ölümü, fizyolojik ölüm ya da hücre intiharı gibi birçok farklı şekilde de ifade edilmektedir. Araştırmalarımıza göre literatüre apoptoz terimi ilk olarak 1972 yılında girmiştir. İskoçyalı Kerr ve arkadaşları (139), hayvan hücreleri üzerinde, fizyolojik ya da patolojik şartlarda oluşabilen, mitozla zıt fakat tamamlayıcı bir rol oynadığı anlaşılan ve nekrozdan farklı olarak spesifik bir hücre ölüm tipinin varlığını ortaya koymuşlardır.

Apoptozis sürecinde hücrelerde bir seri morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler gözlenmekte olup bir diğer hücre ölümü olan nekrozisten farklılık göstermektedir. Nekrozis, akut hasarla seyirli, patolojik durumda görülmektedir. Nekrotik hücrelerin karakteristik özellikleri arasında; hücrelerde şişme, sitoplazma organellerinin dilatasyonu ve disintegrasyonu, plazma membranının bütünlüğünün kaybı ve hücre içine sıvı alarak patlaması ya da hücre içeriğinin dışarıya akışı sayılabilir. Nekrozis bu nedenlerden ötürü dokuda inflamasyon oluşumuna neden olmaktadır (139, 140). Apoptoziste ise, hücre membran bütünlüğü korunmuştur, hücre ve organellerinin küçülmesi (büzüşmesi),

sitoplazmik ve membranda bleb oluşumu (tomurcuklanma), kromatin iplikçilerin parçalara ayrılması ve yoğunlaşması (kondensasyon) gibi birçok karakteristik özellikleri ile diğer bir hücre ölümü nekrozdan ayrılmaktadır (121).

Apopitozide gözlenen biyokimyasal değişimler arasında, ATP bağımlı olması, intrinsik (mitokondriyel) ve ekstrinsik (hücre ölüm reseptörleri) olarak uyarılabilmesi, mitokondrilerinden sitokrom c salınımı ve akabinde kaspazların ('cystein aspartat spesifik protease') aktivasyonu ile hücrede spesifik proteinlerin hidrolizi ve plazma membranının dışında beliren fosfatidil-serin ve trombospondin bağlarının oluşumu gibi mekanizmalar sıralansa da apopitozisin en önemli bulgusu erken evresinde bile görülebilen, agaroz-jel elektroforezinde ki DNA'nın kırınımı temsil eden tipik merdiven görünümüdür 'ladder pattern'. Bu görünümün sebebi Ca-Mg bağımlı endonükleazların, DNA'yı internükleozomal kısımlarından, 180-200 bp ya da katları mono ve oligonükleozomlar şeklinde fragmentlere ayrılması ile açıklanmaktadır (122).

Apopitozis doku ve hücrelerde fizyolojik şartlarda gelişebilir; timusdaki yanlış olgunlaşmış ya da etkisiz olan T-lenfositlerin ölümü, insan embriyonik gelişim sürecinde parmakların şekillenmesi, derinin en iç tabakasında bulunan keratinosit hücrelerinin epidermise doğru göçü ve stratum korneum'u yeniden oluşturması, incebarsak kriptlerindeki epitel hücrelerin yenilenmesi, menstrüasyon sırasında endometriyumda gerçekleşen epitel doku rejenerasyonu ya da doğumdan sonra uterus ve laktasyondan sonra meme de görülen hormon bağımlı involusyonlar, kastrasyon sonrası prostat atrofileri gibi olaylara katılabilir (122, 141).

Vücudumuzda, her geçen saniyede milyonlarca hücre apoptozis programlı bir şekilde ölmektedir. Hücrelerin canlılığını koruyabilmesi, hassas bir teraziye oluşturan 2 kefedeki ağırlıklar misali, yapım (mitozis) ve programlanmış ölüm (apoptozis) arasında ki ince bir dengeye bağlıdır. Bu kefedelerin birinin apoptoz ya da diğer tarafa kayması sonucu dengenin bozulması halinde, organizmada bir takım patolojik durumun ortaya çıkmasına katkı sağlamaktadır. Örneğin, çeşitli viral enfeksiyonlar (Epstein-Barr, insan papillom virüsü), nörodejeneratif bozukluklar (Alzheimer hastalığı) ya da oto immün hastalıklar (AIDS), apoptotik yolları uyarmakta ve buna endeksle artmış hücre kayıpları ile seyretmektedir. Kanseri başta olmak üzere çeşitli oto-immün rahatsızlıklar da ise apoptozis yoluyla baskılanmaktadır (122, 142).

Neoplasmlar, apoptozun regülasyonunda görevli genlerle yakından ilişkilidir. Böyle kanserle ilişkili apoptoz uyarımı (tümör süpresör) ve baskılanmasına (onkogen) katılan genlere sırasıyla pro-apoptotik ve anti-apoptotik genler adı verilmektedir. Malign transformasyonların ortaya çıkmasında apoptoz regülasyonunun da görevli bu genlerdeki çeşitli mutasyonlar rol almaktadır (143).

3.3.5.1. Apoptozis ile İlgili Parametreler

3.3.5.1.1. Apoptozis Regülasyonunda p53 (TP53, tümör proteini 53)

Genomun gardiyanı olarak ta bilinen TP53 geni, insanda 17. kromozomun kısa kolu üzerinde (17p13.1) yerleşmiş halde bulunmaktadır. Kanseri kemirgen ve insan hücrelerinde, 53 kDa ağırlığında ki p53 proteinini kodlayan TP53, başlangıçta onkogen olarak adlandırılrsa da daha sonrasında yapılan çeşitli yaban

tip TP53'e sahip rodent fibroblast hücrelerinde neoplasmayı baskılayıcı özellikler sergilediği ortaya konulmuştur (144).

Ayrıca meme kanseri ile birlikte kanser çeşitlerinin % 50'sinde, TP53'ün 20.000'in üzerindeki mutasyonları sorumlu tutulmaktadır (145, 146). Kalıtsal olarak TP53'ün allellerinden birisi eksik ya da inaktif olarak dünyaya gelen bireylerde daha erken yaşlarda kansere yakalanma riskide artmaktadır (Çift vuruş hipotezi) (147). Ayrıca kök hücresinde mutant p53+ olan kişilerin prognozunun negatif olanlara göre daha kötü olduğu bildirilmektedir (148).

Memelilerde hücre siklusunun G-1 kontrol noktasının bir diğer düzenleyicisi ise tümör süpresör p53 gen ailesidir. Genotoksik etmenlere maruziyet (radyasyon, toksinler ya da kimyasal karsinogen ajanlar) sonucu hasarlı DNA'ya bir yanıt olarak p53 hücre döngüsünü durdurarak hücreye DNA onarımı için zaman kazandırır. Bunu da bir CDKI olan p21 proteini üzerinden (p21'in aktivitesi artar), pRb leri defosforile ederek (aktifleştirir), dur sinyallerini, G1-S fazları arasında devreye sokarak siklusu blokaj altına almaktadır. Ayrıca DNA hasarı eğer tamir edilemeyecek kadar fazlaysa, bu durumda p53, hücreyi apoptozis yolağına yönlendirerek hücrede ki Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gibi apoptoz regülasyonunda görevli proteinlerin oranlarını düzenleyerek ve de çeşitli kaspazları (3-7-8 ve 9) aktive etmek koşulu ile hücre ölümünü sağlamaktadır. p53 mutasyonu ya da kaybı olan hücrelerde bu mekanizmalar devre dışı kalarak dur sinyalleri yerini sürekli proliferasyona bırakarak hasarlı DNA'ların birikimi ile malignite oluşumu gözlenecektir (149-151).

3.3.5.1.2. Apoptozis Regülasyonunda Bcl-2 ve Bax

Apoptozun gerçekleşmesi için, birçok mediatörün etkisinin kesiştiği temel nokta mitokondriyumlardır. Bu nedenle mitokondrinin aktivasyonu apoptotik süreçte, artık geri dönüşümü olmayan (irreversible) bir yolu işaret ettiği için önemlidir. Bununla birlikte B-cell lymphoma gene-2 (Bcl-2) protein ailesi mitokondrideki aktivasyonunun gerçekleşmesine neden olan en önemli faktör olduğundan, bu gen ailesini apoptozisin regülasyonunda mihenk taşı yapmaktadır (152).

Bu gen ailesinde apoptozisi hem baskılayıcı hemde uyarıcı 2 zıt etkiye sahip üyeler vardır. Literatürde Bcl-2 ailesine her geçen gün yeni bir üye eklenebileceğini akılda tutmak şartı ile halen tanımlanmış 20 üyesi bulunmaktadır. Bu üyelerden olan Bcl-2 başta olmak üzere Bcl-XL, Mcl-1 ve A1/Bfl-1 gibi genler apoptozisi baskılayan yani anti-apoptotik özellikler sergilerken; Bax başta olmak üzere Bak, Bok/Mtd, Bad, Bik, Bid, Bim/Bod ve Hrk gibi genlerin ise apoptozisi indükledikleri ve pro-apoptotik özellikte oldukları bildirilmektedir (153-155).

Bcl-2 proteininin de içinde bulunduğu apoptozisi baskılayan onkogenler, anti-apoptotik etkilerini, mitokondri iç membranında bulunan sitokrom C'nin mitokondriden sitozole salınmasını engellemek sureti ile apoptozu baskılamaktadır. Ayrıca hücre içindeki Bcl-2/Bax oranı da; bir hücrenin apoptoza yönlendirilmesindeki en büyük faktörlerden biri olarak görülmektedir. Hücrede bu oranın artışı apoptotik yolağın inhibisyonu ile sonuçlanırken, bu oranın düşük olması o hücrenin artık apoptotik yolağa gideceği anlamı taşımaktadır (156).

Birçok neoplazm durumlarında da Bcl-2 genlerinin bozulmuş fonksiyonlarına atfedilmektedir (153, 154). Premalign ve malign durumları içeren meme karsinomlarında apoptozisin derecesi, Bcl-2 salınımı ile negatif ilişkili olarak seyretmektedir (156). Ayrıca literatürde, tümörlü meme dokularında Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Hatta yapılan çalışmalar yüksek Bcl-2 düzeylerinin; meme kanserlerinde düşük tümör derecesi, düşük proliferatif indeks, daha iyi prognoz ve ER/PR+ adjuvan tedaviye daha iyi yanıt ile ilişkili olduğunu desteklemektedir (157, 158). Fakat şuan için Bcl-2 ekspresyonunun meme kanseri üzerine bağımsız bir prognostik ya da prediktif bir faktör olduğu noktasında tam olarak net bir bilgi yoktur (159).

Bcl-2 ilişkili x protein diye adlandırılan Bax proteini Bcl-2 ailesine mensup, pro-apoptotik özellikler sergilemektedir. Yapısı Bcl-2 ile %43 oranında benzerdir ve bu özelliklerinden dolayı Bcl-2 ile homodimer ve heterodimerler oluşturabilir. Yukarıdaki paragrafta da anlatıldığı üzere hücre içinde Bax'ın Bcl-2'ye karşı predominant konsantrasyonlarda olması apoptozisi artırmaktadır. Hücreye ölüm sinyallerinin ulaştığı durumlarda (örneğin DNA hasarının tamir edilemez boyutlara ulaşması, p53'ün apoptozu uyarması gibi), Bax geninin ekspresyonunun artması ile hücre içinde sitozolden mitokondri membranına transloke olmasına neden olmaktadır (141). Mitokondri membranına yerleşen Bax, anti-apoptotik etkili Bcl-2'yi nötralize ederek, çeşitli pro-apoptotik adaptör proteinlerinin yardımı ile bozulmuş mitokondri transmembran por yapısı sayesinde iyon kanallarının açılmasına ve de sitokrom-c'nin sitozole salınmasına sebep olur. Sitozolda serbestleşen sitokrom-c'nin prokaspaz-9'un (intrinsik yolağın aktivasyonu), apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (apaf-1, prokaspaz

9'un aktifleşmesini sağlar) ve ATP ile kompleks yaparak apopitozomun (apopitotik cisimcik) oluşmasına neden olur. Aktifleşen kaspaz da diğer kaspazların (kaspaz 3-6-7) aktivitesine yol açarak hücredeki çeşitli hayati proteinler ve DNA'nın parçalanması ile karakterize apopitozis süreci şekillenmiş olur (160).

Tüm bu mekanizmalarla birlikte bazı lösemi, kolon ve meme kanser çeşitlerinin gelişiminde, Bax'ın fonksiyon kaybının rol oynadığı gösterilmiştir (161). Birçok meme kanseri çalışmalarında da Bax proteininin down regülasyonu suçlanmaktadır (154, 162).

3.4. Meme Kanseri

3.4.1. Meme Kanseri ve Tarihçesi

Memeyi oluşturan süt salgı bezleri (lobül) ve kanallarını (duktus) döşeyen hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve vücudun çeşitli yerlerine göç edip çoğalmaya devam etmelerini meme kanseri olarak tanımlayabiliriz (163). Meme kanseri hakkındaki bu tanımlamalar, yazarlarca değişse de insanlık tarihinin bilinen en eski habis tümörü olduğu iddiası ise şüana kadar değişmeyen tek gerçek olarak karşımıza çıkmaktadır.

M.Ö 3000-2500'li yıllarda Mısır'da yazılmış olan kansere ait ilk yazılı kanıt olarak gösterilen Edwin Smith Papirüsü'nde meme kanseri ameliyatlarına dair özgün bilgiler gün ışığına çıkmıştır. 'Meme dokunulamayacak durumda, şiş ve kanser memenin her yanına yayılmış olduğunda' hastalığın 'tedavisi yok' diye nitelendirilmiş olması, günümüze kadar gelen yaklaşık 5000 yıl öncesinde bile meme kanserinin varlığını ve önemini gözler önüne sermiştir. Mısır dönemine

(M.Ö. 1600) ait parşömenlerde koterizasyon (yakma) ile tedavi edilmiş 8 meme kanseri vakası tanımlanmaktadır.

Daha sonraları ‘Tıbbın ve sağlığın Tanrısı’ diye adlandırılan Yunanlı hekim Hippokrates (M.Ö. 460-370) tarafından iyi huylu ve habis hastalıkların ayrımı ilk kez yapılmış, ‘carcinos’ ve ‘carcinoma’ ifadeleri ile tanımlanmıştır. Hastalığın başladığı bölgeden diğer organlara yayılmasını gözlemleyerek kanser için, muhtemelen şeklinden dolayı ‘crab’ kelimesini kullanmış olup daha sonra Romalı hekim Celcus tarafından da Latince ‘yengeç’ anlamına gelen aynı sözcük ile dillendirilmiştir ve günümüzde de habis tümörleri tanımlamak için ‘cancer’ kelimesinin temelleri atılmıştır. Ayrıca o dönemde meme kanserini ifade ederken yayılan ve hatta ölüme neden olan bir hastalık olarak tanımlamışlardır.

M.S.1. yüzyılda ise İskenderiyeli Dr. Leonidas, meme tümörlerinin cerrahi müdahale ile çıkarılması ve koter (yakma) yaklaşımlarını ayrıntılı bir şekilde yazılarında işleyerek, bedende geniş bir kesi ile belli bir boyuttaki tümörlerin çıkarılabileceğinden bahisle, günümüzün cerrahi uygulamalarındaki onkolojik prensiplerin temelleri bu dönemde atılmıştır. M.S. 200’de başka bir Yunanlı hekim Galen ise meme tümörlerini, kanda siyah safra birikiminin sonucu olarak, şekillenen sistemik bir hastalık olarak ifade ederken, tümörleri ise ‘oncos’ kelimesi ile kaleme almıştır. Günümüzdeki ‘onkolog’ kelimesinin temellerini bu zamanlara dayandırmamıza sebep olmuştur (3).

Belçika’da 16. yüzyılda Andreas Vesalius tarafından insan vücudunun anatomik keşfi ile cerrahi uygulamalar ilkel yaklaşımlardan uzaklaşmış, yeni becerilerin gelişmesine yol açmıştır. Fransa ve İngiltere’de 18. yüzyılda, memede çeşitli ligament ve lenf damar ağlarının olduğu ortaya koyulmuş aynı dönemde

John Hunter (İskoç'lu hekim) meme kanserinin nedeni olarak 'siyah safra' olarak bilinen lenf sıvısını nihayet ilk olarak nitelendirmiştir. Bu dönemde, memede basit ve radikal cerrahi uygulamaları tıbbi kayıtlarda yer bulmuştur.

Mikroskobun 19. yüzyılda bulunmasıyla, Almanya'da Rudolf Virchow ilk kez normal hücreler ile kanserli hücreleri mikroskop altında tanımlayarak hücre patolojisinin bilimsel temellerini atmıştır. Yine Alman bilim adamı Müller ise, kanserin yaşayan hücrelerden oluştuğunu savunarak, metastazın ise bu hücrelerin yayılımdan ileri geldiğini öne sürerek, meme kanserinin lenf damarları yoluyla koltuk altı lenf bezlerine yayılım gösterdiğini savunmuş ve kanserin oluşumu ile ilgili olarak hem 'humoral' teorilere artık son vermiş, hem de günümüzde de hala geçerliliğini korumakta olan karsinogenez süreci ile ilgili bilgilerin temelini oluşturmuştur (164).

3.4.2. Meme Karsinomlarının Epidemiyolojisi

Dünya genelinde ve Türkiye'de meme kanserinin görülme sıklığı artış göstermekte ve ölüm riski ülkelere göre değişmektedir. Dünya Sağlık Örgütü Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından 2012 yılında yayımlanan Globocan tahmini verilerine göre; dünya genelinde 2007 ile 2012 yılları arasında yaklaşık 6,3 milyon kadına meme kanseri tanısı konmuştur. Yine kadınlarda 2012 yılında yaklaşık 1,7 milyon yeni vaka ile dünyada en sık görülen kanser olmuştur (Tablo 2). Genel olarak (kadın ve erkeklerde), akciğer kanserinden (1,8 milyon) sonra en sık görülen ikinci kanser olarak anılmaktadır. Bu sayı, tüm yeni kanser olgularının yaklaşık olarak % 12'sini, kadınlarda ise tüm kanserlerin % 25'ini temsil etmektedir. Dünya genelinde hastalık yükü olarak bakıldığında ise, 2012 yılında 2

milyon'a yakın (1.7) kadın meme kanserine yakalanmış ve yaklaşık 522,000 kadın meme kanseri nedeniyle ölmüştür (165, 166).

Tablo 2. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) Tarafından Yayınlanan Globocan 2012 Verilerine Göre Kadınlarda En Sık Görülen İlk Beş Kanserın Dağılımı (166).

TÜRKİYE	DÜNYA	IARC'a üye 24	AB (28 ülke)	ABD
MEME	MEME	MEME	MEME	MEME
TİROİD	KOLOREKTAL	KOLOREKTAL	KOLOREKTAL	AKCİĞER
KOLOREKTAL	UTERUS SERVİKSİ	AKCİĞER	AKCİĞER	KOLOREKTAL
AKCİĞER	AKCİĞER	UTERUS SERVİKSİ	UTERUS KORPUSU	TİROİD
UTERUS KORPUSU	UTERUS KORPUSU	UTERUS KORPUSU	UTERUS SERVİKSİ	UTERUS

Amerikan Kanser Topluluğu'nun 2017 yılı verilerine göre Amerika'da yeni kanser tanısı almış kadın sayısının yaklaşık 252,710, olduğu ve bunun yanı sıra 63,410 in-situ meme kanseri tanısı alan yeni olgularında eklenebileceğini vurgulayarak aynı yıl içerisinde yaklaşık olarak 40,610 kadının, meme kanseri nedeniyle hayatını kaybettiği belirtilmektedir (Şekil 11).

Tahmini Yeni Vakalar	Erkek			Kadın		
	Prostat	161,360	19%	Meme	252,710	30%
	Akciğer ve bronş	116,990	14%	Akciğer ve bronş	105,510	12%
	Kolon ve rektum	71,420	9%	Kolon ve rektum	64,010	8%
	İdrar torbası	60,490	7%	Uterus korpusu	61,380	7%
	Cildin Melanomu	52,170	6%	Tiroid	42,470	5%
	Böbrek ve renal pelvis	40,610	5%	Cildin Melanomu	34,940	4%
	Non-Hodgkin lenfoma	40,080	5%	Non-Hodgkin lenfoma	32,160	4%
	Lösemi	36,290	4%	Lösemi	25,840	3%
	Oral kavite ve farinks	35,720	4%	Pankreas	25,700	3%
Tahmini Ölümler	Karaciğer ve intrahepatik safra kanalı	29,200	3%	Böbrek ve renal pelvis	23,380	3%
	Toplam	836,150	100%	Toplam	852,630	100%
	Erkek			Kadın		
	Akciğer ve bronş	84,590	27%	Akciğer ve bronş	71,280	25%
	Kolon ve rektum	27,150	9%	Meme	40,610	14%
	Prostat	26,730	8%	Kolon ve rektum	23,110	8%
	Pankreas	22,300	7%	Pankreas	20,790	7%
	Karaciğer ve intrahepatik safra kanalı	19,610	6%	Yumurtalık	14,080	5%
	Lösemi	14,300	4%	Uterus korpusu	10,920	4%
	Yemek borusu	12,720	4%	Lösemi	10,200	4%
	İdrar torbası	12,240	4%	Karaciğer ve intrahepatik safra kanalı	9,310	3%
	Non-Hodgkin lenfoma	11,450	4%	Non-Hodgkin lenfoma	8,690	3%
	Beyin ve diğer sinir sistemi	9,620	3%	Beyin ve diğer sinir sistemi	7,080	3%
	Toplam	318,420	100%	Toplam	282,500	100%

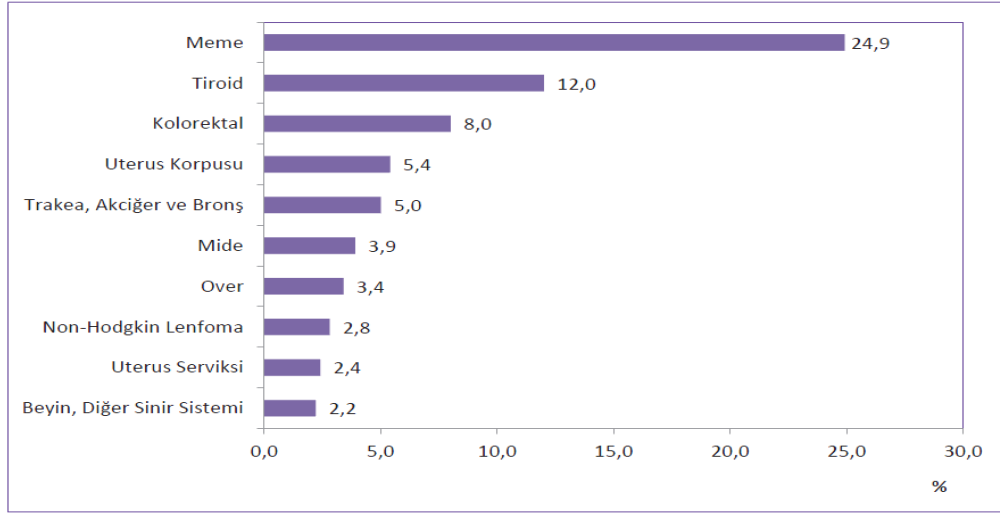
Şekil 11. Amerika’da 2017 Yılına Ait Tahmini Yeni Kansere Tanı Alan ve Kanserden Ölen Kişilerin Sayısı ve Oranları. (167)

Türkiye’de ise kadınlarda görülen meme kanserinin yaşa standardize insidans hızları ile birlikte ölüm oranları da artarak devam etmekte olup, meme kanseri kadınlarda kansere bağlı ölümlerin başında yer almaktadır (Şekil 12).

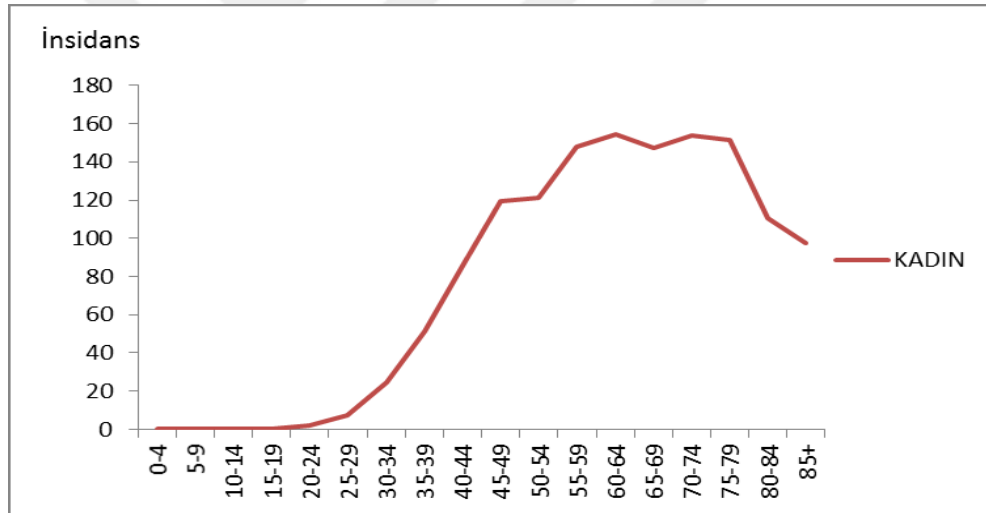
	2002	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Meme	31,9	40,6	38,6	44,2	46,8	45,9	43,0
Tiroid	3,5	18,6	18,1	20,4	20,3	21,3	20,7
Kolorektal	9,3	13,4	13,1	13,3	15,2	15,3	13,8
Uterus Korpusu	4,3	9,3	9,6	10,5	10,1	9,9	9,8
Trakea, Akciğer ve Bronş	5,2	8,1	8,0	7,8	9,3	10,0	8,7
Mide	6,0	8,1	7,2	7,9	7,8	7,1	6,5
Over	5,9	6,9	6,6	7,3	7,3	7,0	6,1
Non-Hodgkin Lenfoma	1,2	5,3	5,3	5,0	5,2	5,3	5,0
Beyin, Diğer Sinir Sistemi	3,8	5,0	4,4	4,5	4,7	4,7	4,1
Uterus Serviksi	3,9	4,5	4,0	4,5	4,5	4,6	4,0

Şekil 12. Kadınlarda Görülen Meme Kanserinin Yaşa Standardize İnsidans Hızlarının 2002,2009-2014 Yılları Arasındaki Dağılımı (Dünya Standart Nüfusu,100.000 Kişide), Türkiye (166)

Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu’nun 2016 yılında yayımlamış olduğu kanser istatistikleri ana raporuna göre, Türkiye’de 2013 yılında toplam olarak yaklaşık 174 bin kişiye kanser tanısı konulmuş ve bunların 71.233’ünün kadınlarda görüldüğü belirlenmiştir. Kadınlarda görülen en yaygın kanserlerin yaklaşık olarak $\frac{1}{4}$ ‘ünü ise (17.531 olgu, %24,9) yine meme kanserleri oluşturmaktadır (Şekil 13). Ülkemizde meme kanseri tanısı alan kadınların %45’inin 50-69 yaş arasında olduğu, %40’ının ise 25-49 yaş aralığında yer aldığı görülmektedir (Şekil 14). (166).



Şekil 13. Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanser Türünün Toplam Kanser İçindeki (%) Dağılımı, 2014, Türkiye (166)



Şekil 14. Meme Kansерinin Kadınlarda Yaş'a Özel Hızları Türkiye (166)

Özellikle ülkemizde içinde bulunduğu gelişmekte olan ülkelerde meme kanseri insidansının gelişmiş ülkelere kıyasla daha az olması bizler için umut verici bir sonuç gibi gözükse de ancak kansere bağlı mortalite oranlarına bakıldığında gelişmiş ülkelerde bu sayının daha az olduğu karşımıza çıkmaktadır. Ülkeler arasındaki meme kanseri insidansındaki bu farkın sebebi kesin olarak bilinmemekle birlikte gelişmiş ülkelerde yaşlı nüfusun fazla olması, beslenme

alışkanlıklarının farklı olması (obezite), fiziksel aktivite azlığı gibi endüstrileşme sırasında ortaya çıkan sosyo-kültürel değişikliklerden kaynaklandığı ön görülürken, mortalitedeki farklılıkların ise gelişmemiş ülkelerde hastalıkla ilgili tanı, tarama ve tedavi hizmetlerine ulaşımın güç olması, eğitim seviyesindeki yetersizlikler ve konu hakkında farkındalığın az olması gibi nedenlerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Tarama ve tedavi protokollerindeki ilerlemelerden dolayı, son yıllarda meme kanserine bağlı ölümlerde ciddi bir azalma kaydedilmiş olup, geçen 50 yıla kıyasla, 5 yıllık sağ kalım oranlarında %63'den %90'lara kadar bir artışın olduğu bildirilmiştir (166-168).

3.4.3. Meme Karsinomlarının Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Meme kanserinin oluş nedeni tam olarak bilinmemektedir. Ancak epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen veriler sonucu meme kanserine yakalanma ihtimalini artıran bazı risk faktörleri ve risk değerlendirme modelleri kullanılarak farklı şekilde kategorize edilmektedir (169). Genel olarak meme kanseri risk faktörlerini 5 başlık altında sıralayabiliriz;

- **Demografik Özellikler (Coğrafik Özellikler, Cinsiyet, Yaş, Irk/Etnik Özellik)**
- **Endokrin Etkenler (Reproduktif Öykü; menarj/menopoz yaşı, ilk Tam dönem Hamilelik/ilk doğum yaşı ve sayısı, laktasyon, infertilite/abortus, Endojen Hormonlar; östrojenler, androjenler, Ekzojen Hormonlar; oral kontraseptifler [OKS], hormon replasman tedavisi [HRT])**

- **Aile Hikayesi ve Genetik Yatkınlık**
- **Çevresel Etkenler (Vücut Ağırlığı ve Obezite, Alkol Kullanımı, Sigara Kullanımı, Radyasyona Maruziyet, Fiziksel Aktivite, Sosyoekonomik düzey)**
- **Diğer Etkenler (Kişisel Meme Kanseri Öyküsü, Meme Dokusunun Yoğunluğu, Proliferatif Meme Hastalıkları, Beslenme Alışkanlığı, Non-steroid anti-inflamatuvar [NSAID] Kullanımı, Mikrobiota değişimi)**

3.4.3.1. Demografik Özellikler

Coğrafik Özellikler: Dünyanın çeşitli ülkelerinde meme kanserinin insidansı farklılık göstermektedir. Nitekim Japonya ve Tayvan ‘da Amerika Birleşik Devletleri’ne göre beş kat daha azdır. Eskimolarda kanser vakası neredeyse yok denecek kadar azdır (170). Meme kanseri olgularının Avrupa ülkelerinde, Asya ve diğer ülkelere göre yaklaşık 5-6 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (14, 141).

Cinsiyet ve Yaş: Meme kanserleri sadece kadınlarda değil aynı zaman da erkeklerde de görülebilir, fakat erkeklerdeki insidansı kadınlara kıyasla 100 kat daha düşüktür. Kadınlar arasında meme kanserinde en önemli risk faktörlerinin başında yaşın ilerlemesi gelmektedir. Bir kadının hayat boyu meme kanserine yakalanma riski, 25 yaş ve altında çok düşüktür (1/19.608’lerle ifade edilmektedir), 55 yaşnda (1/33), menopoiz sonrasındaki dönemlerde ise yavaş bir yükselme gözlenirken 80 yaşındaki kadınlarda bu oran 1/8’lere kadar çıkabilmektedir (171). Günümüzde ise kadınlarda meme kanseri tanı yaşı ortalınca

değeri yaklaşık Amerika'da 61, Afrika'da 48, Türkiye'de ise 53 olarak bildirilmektedir (172).

İrk ve Etnik Özellikler: Meme kanserinin görülme sıklığı açısından etnik gruplar arasında bazı farklılıklar söz konusu olabilir. Meme kanserinin insidans hızı zenci kadınlara oranla beyaz kadın ırkında %20 oranda daha fazla olduğu bildirilirken, mortalite oranlarında ki ilişki ise tam tersidir. Amerikada yaşayan Japon kadınlarda meme kanseri insidansı kendi yaşamları süresince pek değişmezken, Amerikan kadınlarına göre kıyaslandığında daha azdır (170). Ayrıca yapılan bir çalışmaya göre (173), Aşkenazi Yahudi kadınlarda BRCA-1 ve BRCA-2 gen mutasyonlarının yüksek olduğu gösterilmiş, bunun bir sonucu olarak bu kadınların hayatları boyunca meme kanserine yakalanma risklerinin %85'e kadar çıktığı ifade edilmiştir.

3.4.3.2. Endokrin Etkenler

3.4.3.2.1. Reprodüktif Öykü

Menarj/Menopoz Yaşı: Kadınlarda erken görülen menarj (13 yaşından önce) ve geç girilmiş menopoz (55 yaşından sonra) yaşları meme kanseri riskini artıran faktörlerdendir (171, 174). 13 yaşından önce adet görmeye başlayan bir kadında meme kanseri rölatif riskinin, daha sonraki yaşlarda adet olan kadınlarınkinden iki kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. Herhangi bir preparat kullanmadan 55 yaşından sonra aktif menstrüel siklusu biten kadınlardaki riskin ise, 45 yaşından daha önce adetten kesilenlere göre iki kat daha yüksek olduğu vurgulanmıştır (175, 176).

İlk Term Dönem Hamilelik/İlk Canlı Doğum Yaşı ve Sayısı: İlk term dönem hamileliğin ve ilk gebe kalma yaşının meme kanseri riski ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Term dönemi gebelik geçiren kadınların meme epitelindeki terminal differansiyasyonların dahi meme kanserine karşı koruyucu olduğu dolayısıyla ilk canlı doğumun daha ileri bir yaşta gerçekleşmesi (30 yaşından sonra) ya da nulliparite sonucu meme kanserinin gelişim riskinin yaklaşık 2 kat fazla olduğu ifade edilmektedir (177). İlk çocuğunu 30 yaşından sonra dünyaya getiren kadınlarda, meme kanseri görülme oranı 18 yaşından önce doğuranlara göre yaklaşık 2 ile 5 kat arasında artış göstermekte olup hatta ikinci çocuğu da erken yaşta doğurmanın meme kanseri riskini azalttığı belirtilmiş olsa da hala multiparitenin meme kanserinden koruyucu etkisi tartışmalıdır (171, 176- 178). Tüm bunların yanında gebeliğin ilk trimesterinin sonlarına doğru östradiol ve progesteron düzeylerinde görülen artışlar (ilk gebelikte diğerlerine nazaran daha yüksek düzeylerde seyreder), kadınlarda meme kanseri gelişimi yönünden getireceği olumsuz etkilere rağmen, erken yaştaki hamileliğin hangi mekanizmalar ile meme kanseri riskini azalttığı henüz netlik kazanmamıştır. Erken yaştaki hamileliğin meme epiteli maturasyonunu indükleyerek, kişiyi karsinogenlere karşı daha dirençli hale getirebileceği düşünülebilir (178).

Laktasyon/Emzirme: Menapoz öncesi dönemdeki meme kanseri riski bakımından, emziren bayanların, emzirmeyenlere göre iki kat daha az risk taşıdığı gözlenirken menopoz sonrasında ise emzirmiş olanlarda meme kanseri gelişimi riski yaklaşık 5,5 kat azaldığı bildirilmiştir (179). Hamilelik sonrasında meme dokusunda çeşitli radikal değişiklikler izlenmektedir. Bunların başında henüz fonksiyonel olmayan bezlerin, süt üreten bir yapıya bürünmesi gelmektedir.

Emzirme ile birlikte değişmiş olan hormonlar ve histolojik yapılar sayesinde meme kanseri gelişimi riskinin azaldığı bildirilmiştir (180). Yapılan araştırmalar sonucunda, görülen histolojik değişikliklerle erken yaştaki hamileliğin meme epitelinin kansere karşı daha dirençli hale getirdiğı, artmış prolaktin düzeyleri sayesinde menstrüasyonun baskılanması ve östrojen hakimiyetinin azalması sonucu ovulasyon sayısının düşürülmesi ve yaşam boyu görülecek olan siklus sayısının azalması sayesinde emzirmenin meme kanseri riskini azalttığı öngörülmektedir (2, 180).

İnfertilite/Abortus: İnfertilite ve infertilite tedavisinin meme kanseri riskini azalttığı ve artırdığı yöndeki veriler çelişkili olup, tıbbi ya da spontan olarak gerçekleşen abortun da artmış meme kanseri ile bir ilişkisi henüz gösterilememiştir (181, 182).

3.4.3.2.2. Endojen Hormonlar

Östrojenler: Kadınlarda endojen östrojen hormonunun %75'i, ovaryumlarda bulunan graaf foliküllerinin granuloza hücrelerinden sentezlenirken geri kalan kısmı ise plesanta, korpus luteum, periferik yağ dokusunda sentezlenmektedir. Erkeklerde ise endojen östrojen hormonun esas kaynağı testis dokusudur. Östrojen hormonları; embriyonik ve fetal gelişimde, kadınların sekonder seksüel karakterlerinin şekillenmesinde, üreme döngüsü, fertilite ve gebeliğin devamlılığında, endometrial hücre büyümesi ve farklılaşmasında, kemik yoğunluğunun korunmasında ve çeşitli metabolik olaylarda görev alırlar (183). Endojen olarak oluşan östrojenler, kolesterolden türeyen C18 steroid yapısında olup, östron (E1), 17 β -östradiol (E2) ve östriol (E3) olmak üzere üç tiptir.

Kadınlarda bulunan bu hormonlar arasında en baskın olanı östradiol, en zayıf etkili olanı ise östrondur (184). Menarş ile menopoz arası dönemde, ovarial kaynaklı östrojen hormonlarının (özellikle östradiol) düzeyleri, kanda en yoğun konsantrasyonlarda iken gebelikte ve menopozdan sonra ise yerini adrenal bezlerden salgılanan dehidroepiandrosteronun (DHEA) aromatisasyonu almaktadır (özellikle östron düzeyi artmaktadır) (185).

Östrojenler, meme dokusundaki normal ve neoplastik hücrelerin büyümesini uyarırlar. Ayrıca tümör hücrelerinden büyüme faktörlerinin salgılanmasına, mitotik aktivitenin indüklenmesine sebep olarak meme dokusuna genotoksik etki gösterebilirler (186).

Endojen östrojenlere maruz kalınan süredeki artışın meme kanseri görülme riskindeki artışla ilişkili olduğu, bu sürenin azalmasının ise koruyucu olduğu düşünülmektedir. Anovulator dönemleri kısa süren (gerek erken yaşlarda menarş olan, gerekse menstrüel siklusu geç sonlanan) kadınlarda meme kanserinin gelişim riskinin, kısa süre östrojen hormonuna maruz kalan kadınlara göre yüksek olması, memede ki artan duktal doku hücrelerinin proliferasyonu ve artan DNA hasarı (mutasyonu) ile ilişkilendirilmektedir (187).

Androjenler: Başlıca androjenler; dehidroepiandrosteron (DHEA), dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS), androstenediol, androstenedion ve testosterondur. Bu hormonlar da östrojen hormonları gibi steroid yapıda olup kolesterolden sentezlenmektedir. Testis başta olmak üzere (testosteron üretiminin %95'i, leyding hücreleri), vücutta üretilen androjenlerin yarısından fazlası adrenal korteks kaynaklıdır. Erkeklerde seks karakterlerinin gelişimi ve sürdürülmesi, spermatogenezin başlatılması ve devamı gibi üreme fonksiyonlarının yanında

çeşitli metabolik olaylarda görev alırlar (188). Meme, over, testis, plasenta, beyin ve adipoz doku gibi hedef hücrelerde bulunan aromataz enzimleri sayesinde özellikle testosteron ve androstenedion tek basamakta östrodiol ve östron gibi çeşitli östrojen hormonlarına dönüşerek post menopozal kadınlarda en önemli endojen östrojen kaynağını oluşturmaktadır. Bu nedenle androjenler meme kanseri için bir risk faktörü haline gelir. Ayrıca postmenopozal meme kanserli olgularda androjen düzeyinin yüksek olduğu bildirilmiştir (189).

3.4.3.2.3. Ekzojen Hormonlar

Oral Kontraseptif (OKS) Kullanımı: Meme kanseri gelişiminde bir risk faktörü olduğu ifade edilen ekzojen seks steroidlerine maruziyetin OKS'yi kullanan kadınlarda, meme kanseri gelişme riskinin arttığı bildirilmektedir. İlk gebeliğinden 10 yıl önce OKS kullanmış genç kadınlarda bu riskin daha da arttığı ve yaklaşık %30-40 arasında olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca OKS kullanımına bağlı meme kanseri tanısı alan kadınlarda tümörün daha az agresif seyrettiği ve tedavi şansının daha fazla olduğu bildirilmiştir (178, 190). Son zamanlarda içeriğinde yüksek dozda bulunan östrojen ve progesteron gibi çeşitli steroid hormonların dozu azaltılarak, yeni OKS preparatları piyasaya sürülmüştür (191). Asıl amacı ovulasyonu baskılayarak istenmeyen gebeliğin önlenmesi olan OKS kullanımının meme hücrelerinde stimulan etki göstererek meme kanseri gelişim riskini artırdıkları görüşü hala netlik kazanmamıştır (192).

Hormon Replasman Tedavisi (HRT): HRT genellikle kadınların yaşamlarının peri/postmenopozal dönemlerinde vuku bulan klimakterik bulguların düzenlenmesi ve bu süreçte daha konforlu bir yaşam idame etmeleri için tek

östrojen ya da östrojen-progesteron kombinasyonlarından oluşan çeşitli tip formülasyonlar halinde uygulanırlar (193).

Tek başına östrojen hormonu ile yapılan replasman tedavisinin uzun süre kullanımına (10' yıldan fazla) bağlı olarak meme kanseri gelişme riskinin çok düşük olduğu, replasman tedavisinin bitiminden 5 yıl sonra ise var olan bu düşük riskinde ortadan kalktığı rapor edilmiştir (194). Son yapılan bir araştırmaya göre östrojen-progesteron kombinasyonu hormon replasman tedavisinin sadece östrojen replasman tedavisine göre meme kanseri gelişimi riskinin yaklaşık olarak 2 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir (195).

3.4.3.3. Aile Hikayesi ve Genetik Yatkınlık

Meme kanserinde en iyi bilinen risk faktörlerinden olan aile hikayesi, tüm kadınlarda meydana gelen meme kanserlerinin yaklaşık %1'inden sorumlu tutulmaktadır (196). Artmış ailesel meme kanseri riski, ailede meme kanserine yakalanan başka birey ya da bireylerin olup olmamasına, meme kanserine yakalanan kişi ya da kişilerle olan yakınlık derecesine ve bu aile bireylerinde meme kanserinin görüldüğü yaşa bağlı olarak değişmektedir. Birinci derece akrabalarından (anne, kız, kız kardeş) sadece bir tanesi meme kanseri tanısı almış bir kadında, risk yaklaşık 2 kat artmaktayken, yine birinci dereceden akrabalarından iki ya da daha fazla kişide meme kanserinin olması, riski yaklaşık 4-6 kat daha artırmaktadır. Ayrıca akrabalarından biri 50 yaşından küçük ve bilateral meme kanserine sahipse bu kişi için yaşamı boyunca meme kanseri görülme riski çok daha (%50) artmaktadır (197).

Artmış ailesel meme kanserinin aksine genetik yatkınlık sonucu meme kanserine yakalanma riskinin çok daha yüksek olduğu ve tüm meme kanserinin yaklaşık %5-10'unun herediter kaynaklı olduğu öngörülmüştür (198). Herediter meme kanseri yatkınlığına sebep olan gen mutasyonlarına en iyi örnek ise 1990'lı yıllarda 'meme kanseri yatkınlık genleri' diye ilk kez tanımlanmış olan BRCA-1 ve BRCA-2 (Breast cancer susceptibility genes) tümör supressör genlerinde görülen mutasyonlar verilebilir. BRCA-1 geni 17. kromozomun uzun kolunda lokalizedir (17q21). Bu gen bölgesinde bilinen 1500'ün üzerinde mutasyon tanımlanmıştır. BRCA-1 genindeki mutasyonlar, ailesel meme kanserinin yanı sıra ovaryum kanserlerinin gelişiminde de önemli bir risk faktörü olarak suçlanmaktadır. BRCA-2 geni ise 13. kromozomun uzun kolunda bulunmaktadır (13q12). Bu gen bölgesi üzerinde ise bugüne kadar 1800'ü aşkın mutasyonun olduğu bildirilmiştir. BRCA-2 mutasyonlarının ise özellikle erkeklerde gelişen meme kanseri riski ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (167, 199, 200). BRCA-1 gen defekti bulunan kişilerde yaşam boyu meme kanseri gelişme riski %40–80, over kanseri gelişme riski %40 iken, BRCA-2 gen mutasyonu olan kişilerde hayatları boyunca meme kanseri gelişme riski %40–70, over kanseri gelişme riski ise %20 olarak ifade edilmektedir. Ayrıca meme kanserinin gelişimine p53, Li-Fraumeni Sendromu (CHECK-2), Boder-Sedgwick Sendromu veya Louis-Bar Sendromu (ATM), Cowden Sendromu (PTEN), Muir-Torre/Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanseri (MSH-1/2), Peutz-Jeghers Sendromu (STK-11/LKB-1) gibi gen mutasyonları ve herediter sendromlarında iştirak ettiği bildirilmektedir (197, 201).

3.4.3.4. Çevresel Etkenler

Vücut Ağırlığı ve Obezite: Vücut ağırlığı ile meme kanseri gelişimi arasındaki ilişki farklılık arz etmektedir. Örneğin aşırı kilolu ya da obez olarak dünyaya gelmiş bayanlarda meme kanseri gelişim riski stabilken, adolesan dönemden sonra aşırı kilo almış ya da obez olanlarda ise bu riskin arttığı görülmektedir. Obezite daha çok postmenapozal dönemlerde meme kanseri gelişiminde artmış bir risk faktörü (zayıflara göre %30-50 daha fazla) olarak karşımıza çıkarken, premenapozal kadınlarda ise artmış vücut ağırlığı ile meme kanseri gelişme riski arasında ters bir ilişki olduğu vurgulanmaktadır (202-204). Post menapozal dönemde aşırı kiloya sahip (BMI >30 kg/m²) kadınlarda, adipoz dokunun fazla olmasından ileri gelen bu olumsuz durum, menapozla birlikte kadınlarda ovarian aktivitede gözlenen düşüş sonucu, östrojenin ana kaynağının yağ dokuya geçmesi (adrenal bezlerden salgılanan androjenlerden aromatizan enzimler aracılığıyla östrojen sentezinin artması) ile sinerjistik bir etki göstermektedir. Bu etki artan yağlı dokuya bağlı olarak aromataz enzim miktarlarının artması ve yağlı dokudaki artışın, kandaki androjenleri ve östrojenleri bağlayan Seks Hormon Bağlı Globulin (SHBG) miktarının düşmesi ile açıklanmaktadır. Tüm bunların bir sonucu olarak kanda serbest androjen ve östrojen düzeylerindeki artışlar, hedef doku olan meme dokusunun sürekli proliferasyon ile karşı karşıya kalmasına ve böylece meme kanseri gelişimine neden olmaktadır. Ayrıca yağ dokusu çeşitli yağda çözünen ksenobiyotikleri ve toksinleri depo edip, karsinojen ajanlara sürekli kaynak sağlayabilir ve bu haliyle de kanserin gelişmesine predispozisyon oluşturabileceği unutulmamalıdır (167, 205, 206). Obez premenapozal kadınlardaki azalmış risk, uzamış anovulatuvar

menstrüel aktiviteye olan eğilimin artması sonucu total östrojen düzeylerindeki düşüşe bağlı olarak meme dokusunun östrojen etkisinden kurtulması ile açıklanabilir (203, 204, 207).

Alkol Kullanımı: Epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen verilere göre; alkolün tüketilen miktarı ve alım süresi ile ilişkili olarak kadınlarda meme kanseri gelişme riskinin arttığı belirlenmiştir (207). Hiç alkol tüketmeyen kadınlarda meme kanserinin gelişme riskinin, haftada 3-6 kadeh alkol (günlük 5-9 gr'a denk gelecek şekilde) kullanan kadınlardan, daha fazla olduğu bildirilmektedir (208). Alkol alımı ile çeşitli vitaminlerin (Folat, C ve A vitamini gibi) metabolizmalarında da bozukluklar ortaya çıkmaktadır. Alkolün kendisinin başlı başına metabolizma için toksik bir ajan olması ve herşeyin ötesinde premenopozal kadınlarda alkol alımının östradiol düzeylerini ve biyoyararlanımını artırması, alkolü meme kanseri gelişimi için potansiyel bir risk faktörü yapmaktadır. Ayrıca östrojen reseptör (+) meme kanseri gelişiminde de bir risk faktörü olarak suçlanmaktadır (209, 210).

Sigara Kullanımı: Sigara kullanımının, meme kanseri için bir risk faktörü diye nitelendirilebilmesi ile ilgili görüşler net değildir. Meme kanseri gelişiminde ancak başka risk faktörleri ile birlikte değerlendirildiği zaman sigara kullanımının riski artırdığı yönünde görüşler ileri sürülmektedir (211).

Radyasyona Maruziyet: Radyasyona maruziyetin tüm kanserler gibi meme kanseri görülme riskini de artırdığı II. Dünya savaşından beri bilinmektedir. Ergenlik dönemleri başta olmak üzere (memenin geliştiği aktif dönem olması nedeni ile), yaşamın 3.dekatına kadar ki yaşlarda iyonize radyasyona maruz kalmak meme kanseri gelişimi riskini artırmaktadır. Kırkbeş yaşın üstündeki

kadınlarda tanı ya da tedavi için radyasyona maruz kalma; yapılan işlemin faydasının daha ağır basması sonucu meme kanserinin gelişimini çok fazla etkilemediği raporlanmış ve genetik yatkınlığı olmayan bayanlar için dikkate değer bir risk teşkil etmiyeceği görüşü hakim olmuştur (197, 212).

Fiziksel Aktivite: Meme kanseri gelişmesinde, tek başına fiziksel aktivitenin rolünü ortaya koyan çalışmalara sık rastlanılmamaktadır. Fakat yapılan çeşitli meta-analiz ve kohort çalışmaları sonucunda fiziksel aktivite yapan özellikle premenapozdaki kadınların meme kanserine yakalanma risklerinin % 19-60 daha az olduğuna dair bulgular rapor edilmiştir (213, 214). Ayrıca ağır egzersizlerin adölesan çağındaki bayanlarda hormonal dengede akut değişikliklere sebep olarak sekonder amenorelerin görülmesine neden olabileceği bildirilmiştir. Ancak meme kanseri gelişme riskini azaltmak için ise özellikle yetişkin bireylerin orta tempoda en az 1.5 saat ya da hızlı tempoda 1saat civarında, haftalık düzenli egzersiz yapmaları gerektiği öngörülmektedir (196, 215).

Sosyoekonomik Düzey: Sosyoekonomik düzey ile meme kanseri gelişimi arasında pozitif bir korelasyon olduğu ve de sosyoekonomik düzeyin artması ile meme kanseri riskinin de 2 kat arttığı bildirilmesine rağmen bu etken tek başına bir risk faktörü olarak düşünülmemektedir. Özellikle reproduktif alışkanlıklarla ilişkili olduğu bildirilmektedir (167).

3.4.3.5. Diğer Etkenler

Kişisel Meme Kanseri Öyküsü: Hayatının önceki dönemlerinde meme kanseri tanısı alan bayanlarda, hayatının sonraki zamanlarında meme kanserinin tekrar görülme riski yüksektir. Kırk yaşın altında meme kanseri tanısı almış

bayanlarda yeni meme kanseri gelişimi için ifade edilen riskin yaklaşık 4-5 kat daha fazla olduğu bildirilmektedir (2).

Proliferatif Meme Hastalıkları: Benign meme hastalıkları geniş bir patolojiye sahip olmakla birlikte bazı tiplerinin meme kanseri gelişimi ile ilişkilendirildiği anlaşılmaktadır. Non proliferatif ve proliferatif olmak üzere 2 ana gruba ayrılır. Tek non-proliferatif lezyonların (fibrokistik değişiklikler, hafif derecedeki hiperplaziler vb.) meme kanseri riski için çok anlamlı bir artış oluşturmadıkları, fakat bu lezyonların sayısındaki artışın ise riski az da olsa artırabileceği raporlanmıştır. Proliferatif meme lezyonları ise özellikle sitolojik alt özelliğine göre non invaziv ve invaziv meme kanserleri ile ilişkilendirilmektedir. Atipisiz proliferatif lezyonların (kompleks fibroadenom, florid hiperplazi, intraduktal papillom vb.) meme kanseri gelişiminde yaklaşık iki kat risk artışına sebep olduğu bildirilirken, atipili proliferatif lezyonların ise (atipik duktal/lobular hiperplazi vb.) yaklaşık beş kat risk artışına sebep olduğu hatta atipinin multifokal özellikte olması riski de on kata kadar arttığı bildirilmektedir (216, 217).

Meme Dokusunun Yoğunluğu: Mamografik tanı yöntemi ile belirlenen meme dokusunda ki artmış yoğunluk, bir yandan memenin fibröz ve glanduler yapılardan zenginliğini ortaya koyarken diğer yandan bağımsız olarak artmış meme kanseri gelişim riski ile ilişkilendirilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalara göre; yoğunluğu artmış meme yapısına sahip olan kadınlarda, normal meme yapısına (yoğun olmayan, yağ dokusu yüksek) sahip olan kadınlara göre meme kanseri görülme riskinin yaklaşık 4,5 kat arttığı ortaya konulmuştur (218).

Beslenme Alışkanlığı: Bazı araştırmacılar meyve, sebze ve lif yönünden zengin, yağ yönünden fakir dietlerle beslenmenin meme kanseri gelişim açısından

daha düşük risk oluşturduğunu saptamışlardır (10). Meme kanserinin ülkelere göre farklı insidans göstermesi, ülkelerin beslenme alışkanlıklarında ki diyetel farklılıkları ön plana çıkarmaktadır. Nitekim deney hayvanları üzerinde yürütülmüş bir çalışmanın sonucuna göre; yağ içeriği yüksek olan diyetle (Amerikan diyeti ile benzer) beslenmenin, yağ miktarı daha düşük olan diyetle (Japon diyeti ile benzer) beslenmeye göre meme kanserinin gelişimi açısından daha kolaylaştırıcı olduğu ve özellikle doymamış yağ tüketiminin doymuş yağ tüketimine göre tümör insidansını ve tümör gelişim hızını artırdığı gösterilmiştir (219, 220). Ayrıca insanlarda zeytinyağı gibi tekli doymamış yağların kanser gelişim riskini düşürdüğü bildirilmiş olup, dietlerinde zeytin yağı içeriği fazla olan Akdeniz kadınlarının, Amerikan kadınlarına göre daha az meme kanserine yakalanma risklerinin olduğu ortaya konulmuştur (221). Birçok flavonoid içeren meyve ve sebzelerin içerisindeki fitoöstrojenler vücuttaki konsantrasyonlarına bağlı olarak zayıf östrojen etkili ya da östrojen antagonisti etki oluşturmaktadır. Özellikle premenapozal dönemde bulunan kadınlarda yüksek fitoöstrojen alımı ile hedef doku olan meme dokusundaki endojen östrojen maruziyeti azalarak meme kanseri gelişim riski azalmaktadır. Postmenapozal dönemdeki kadınlarda ise fitoöstrojenler endojen östrojen düzeyini yükselttiği bildirilmektedir (222). Ayrıca araştırmacılar (209). A, C, E ve B-9 gibi vitaminleri ve selenyum gibi mineralleri içeren meyve, sebze ve gıdaların tüketiminin tüm kanserlerde olduğu gibi meme kanseri riskini de azalttığını ileri sürmektedir.

Non-steroid anti-inflamatuvar ilaçların (NSAID) Kullanımı:

NSAID'lerin kullanımları birçok kanser çeşidinde risk azaltıcı faktör olarak gösterilirken, meme kanserinde NSAID'lerin kullanımına bağlı olarak yapılan

Çalışmalarda, meme kanseri açısından gelişim riskini azalttıkları yönündeki kayıtlar farklılık arz etmekte olup, sadece bir randomize çalışmada Aspirinin meme kanserine yakalanma açısından koruyuculuğu gösterilmiştir (223, 224).

Mikrobiatanın Değişimi: Son zamanlarda yapılan yeni çalışmalarda (225, 226), mikrobiyotik değişiklerin multifaktöriyel-karsinogenez sürecinde aktif olarak rol aldığına işaret edilmekte olup, özellikle antibiyotik kullanımına bağlı değişen mikrobiyotanın östrojen metabolizmasında değişimlere sebep olduğu ve böylece meme kanseri gelişiminde bir risk faktörü olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir.

3.4.4. Meme Kanserin Sınıflandırılması

3.4.4.1. Meme Kanserlerinde Histopatolojik Sınıflandırma

Histolojik karakterizasyonuna göre meme malignetelerinin çoğu (>%95) epitel doku kaynaklıyken bir kısmının ise glandüler doku (salęı bezleri), yağ, kas ve bağ dokudan orjin aldığı bildirilmektedir. Epitel hücrelerden köken alan tümörler karsinom, glandüler hücrelerden köken alan tümörler adenokarsinom, yağ, kas ve bağ dokudan köken alanlar ise sarkom diye adlandırılırlar (227).

Meme karsinomlarının histopatogenez karakterizasyonuna bakılacak olursa, %10'u süt salgılayan bezleri (lobüler dokuları) tutarken, % 80-90'ı salgılanan sütü meme ucuna getiren kanallarda (duktal dokularda) şekillenmektedir. Çok oranda ise asinüsler gibi farklı histojik alt-tiplere sahip dokularda görülebilir (15). Dünya Sağlık Örgütü tarafından öngörülen sınıflandırmaya göre (Tablo 3) genel olarak meme karsinomları histopatolojik olarak non-invaziv ve invaziv olmak üzere 2

temel grupta incelenmesine rağmen bu sınıflamanın dışında kalan meme de nadir rastlanan maliniteye sahip hastalıklar da mevcuttur (10, 15, 228-239)

Tablo 3. Meme Karsinomlarının Histopatolojik Sınıflandırılması (228)

Non-İnvaziv Karsinom	İnvaziv Karsinom
	<i>İnvaziv duktal karsinoma</i>
	<i>İnvaziv lobüler karsinoma</i>
	<i>Tübüler karsinoma</i>
<i>Duktal karsinoma İn-situ</i>	<i>İnvaziv kribriform karsinoma</i>
<i>Lobüler karsinom İn-situ</i>	<i>Kolloid(müsinöz) karsinoma</i>
	<i>Medüller karsinoma</i>
	<i>İnvaziv papiller karsinoma</i>
	<i>İnvaziv mikropapiller karsinoma</i>
	<i>Sekretuar (juvenil) karsinoma</i>
	<i>Apokrin karsinoma</i>
	<i>Metaplastik karsinoma</i>
	<i>Nöroendokrin karsinoma</i>
	<i>İnflamatuvar karsinoma</i>

1- Non-İnvaziv (in-situ) Karsinomlar: Meme duktusu, lobülleri ya da asinüslerinde meydana gelen tümör hücreleri, bazal membran içinde sınırlıdır ve stroma tabakasına infiltre olmadan çoğalmaktadır.

2- İnvaziv (İnfiltratif) Karsinomlar: Memenin epitelyal dokusunda oluşan tümör hücresi bazal membranı geçip çevresindeki stroma tabakasına infiltre olarak, lenf ve kan damarları ile çeşitli lenf düğümlerine ve hatta oradan da uzak doku metastazı yapabilme kabiliyetine sahiptir (10, 15). Ayrıca tüm meme

neoplazmalarının %90'ı invaziv duktal ya da invaziv lobuler karsinomdan kaynaklandığından invaziv karsinomlar meme kanserleri içerisinde çok büyük yer ve önem teşkil etmektedir (229).

3.4.4.2. Meme Kanserinin Moleküler ve İmmunohistokimyasal Sınıflandırılması

Günümüzde meme kanserleri moleküler olarak, 5 farklı tip içermektedir;

- Luminal A (hormon reseptör ekspresyonu + ve HER2 onkogen ekspresyonu -, Ki 67 düşük ekspresyon),
- Luminal B (hormon reseptör ekspresyonu + ve HER2 onkogen ekspresyonu -/+, Ki 67 yüksek ekspresyon),
- HER2 onkogen ekspresyonu +,
- Basal-like/bazal/bazaloid (hormon reseptör ekspresyonu - ve HER2 onkogen ekspresyonu -, Bazal sitokeratin CK5/6, EGFR1 gen ekspresyonları +)
- Null tip veya sınıflandırılmayanlar (Normal Meme Benzeri).

Yapılan çalışmalarda bu grupların insidanslarının ve prognozlarının farklı olduğu ortaya konulmuştur. Hormon reseptörleri (-) ve HER2 (-) olan ya da başka ifade ile 'triple (-)' olan bazal benzeri tümörler, hem en sık karşılaşılan (>%50), hem de en kötü prognoza sahip tümörler grubuna girerken, luminal özellik taşıyan özellikle hormon reseptörü (+) ve HER2 (+) olan meme tümörlerinin ise daha iyi prognoza sahip olduğu vurgulanmaktadır (240).

Farklı moleküler alt grupların kemoterapiye duyarlılığının da farklı olduğu bildirilmiştir. Örneğin; luminal hücre benzeri kanserlerin daha uzun sağ kalım

oranları bildirilmiştir. Bazal hücre benzeri ve HER2 (+) tümörlerin ise birden fazla ajanla yapılan neoadjuvan tedaviye daha yüksek oranda yanıt verdikleri ifade edilmektedir (241).

3.4.5. Meme Kanserlerinin Evrelenmesi

Tümör evreleme sistemleri, kanserin yayılımı ve tedaviye yön verilmesi açısından bilgi edinmede kolaylık sağlayan ortak bir dil olarak kullanılmaktadır. Günümüzde artık moleküler sınıflamalara yönelim giderek artsa da, hemen her yerde ‘American Joint Committee on Cancer’ (AJCC)’in şekillendirdiği TNM sistemi geçerliliğini korumaktadır. TNM Evreleme Sistemi’nde tümörleri sınıflamak için kullanılan unsurlar; tümör boyutu (T), aksiller lenf nodlarına yayılım (N) ve uzak bölgelere yayılım (M) şeklindedir. Daha önceden ortaya konulmuş kurallara göre, tüm bu unsurların birarada değerlendirilmesi sonucu, tümörlerin özellikleri belirlenerek, son bir TNM Evresi hesaplanmaktadır. AJCC’ye göre gözden geçirilmiş TNM sınıflaması Tablo 4’de gösterilmektedir (242).

Tablo 4. AJCC'ye Meme kanserinde gözden geçirilmiş TNM Sınıflaması

Primer Tümör: T

Tx : Primer tümör varlığı değerlendirilememektedir

T0 : Primer tümör bulunmamaktadır

Tis : İn-situ karsinom varlığı

Tis (DCIS) : Duktal karsinoma in-situ

Tis (LCIS) : Lobüler karsinoma in-situ

Tis (Paget) : Meme başı Paget hastalığı var, primer tümör yok ise (eğer primer tümör var ise tümör boyutuna göre değerlendirme yapılmaktadır)

T1 : En büyük tümör çapı ≤ 2 cm

T1mic : En büyük mikroinvaziv tümör çapı ≤ 0.1 cm

T1a : $0.1 \text{ cm} < \text{En büyük tümör çapı} \leq 0.5 \text{ cm}$

T1b : $0.5 \text{ cm} < \text{En büyük tümör çapı} \leq 1 \text{ cm}$

T1c : $1 \text{ cm} < \text{En büyük tümör çapı} \leq 2 \text{ cm}$

T2 : $2 \text{ cm} < \text{En büyük tümör çapı} \leq 5 \text{ cm}$

T3 : En büyük tümör çapı $> 5 \text{ cm}$

T4 : Tümörün boyutları farketmeksizin, göğüs duvarına ya da cilde yayılım

T4a : Pektoralis major kasına ulaşım yok, göğüs duvarına yayılım

T4b : Meme derisine yayılım, ödem, cilt ülserasyonu ve portakal kabuğu görünümü

T4c : Hem göğüs hemde meme cildinde yayılım birlikte

T4d : İnflamatuvar (iltihabi) karsinom

Bölgesel lenf nodları: N

Nx : Nodal tutulum varlığı değerlendirilememektedir

N0 : Bölgesel lenf nodu metastazı bulunmamaktadır

N1 : Sabit olmayan aynı tarafa ait bölgesel lenf nodu metastazı

N2 : Komşu dokulara yapışık ipsilateral aksiller lenf nod(lar)ı metastazlarının olmadığı ve klinik olarak saptanabilen ipsilateral internal mammarial nodal metastazın olduğu durumlar

N2a : Komşu dokulara ya da birbirlerine yapışık ipsilateral aksiller lenf nodu metastazı

N2b : Aksiller metastazın olmadığı, sadece klinik olarak saptanabilen ipsilateral internal mammarial nodal metastaz

N3 : Aksiller lenf nodlarına tutulumdan bağımsız olarak ipsilateral infraklaviküler lenf nod(lar)ı metastazı ya da klinik olarak saptanabilen ipsilateral internal mammarial lenf nodu metastazı ve aksiller lenf nodu metastazı ya da supraklaviküler lenf nodu metastazı

N3a : İpsilateral infraklaviküler lenf nod(lar)ında metastaz ve aksiller lenf nodlarında metastaz

N3b : Klinik olarak saptanabilen ipsilateral internal mammarial lenf nod(lar)ı metastazı ve aksiller lenf nodu metastazı

N3c : Supraklaviküler lenf nodu metastaz

Uzak metastaz: M

Mx : Uzak metastazın varlığı değerlendirilememektedir

M0 : Uzak metastaz bulunmamaktadır

M1 : Uzak metastaz varlığı

Yapılan evrelemeler sonucundaki TNM sınıflaması aşağıda belirtilmiştir;

Evre 0 : Tis, N0, M0

Evre I : 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 - Herhangi T, N3, M0

Evre IV : T ve N'den bağımsız M1 içeren tüm hastalar

3.4.6. Meme Kanserinde Prognostik, Prediktif Faktörler ve Tümör Belirleyicileri

Meme kanserine yakalanan kişilerde hastalık, doğal olarak farklı seyretmektedir. Nitekim aynı tümör çapına sahip olan ve uzun süre takip edilen hastaların bazılarında tümör nüksü çok kısa sürede kendini gösterirken, bazılarında ise tüm yaşamı boyunca herhangi bir nüks gelişimi söz konusu olmayabilir. Hastalar arasında meydana gelen bu tür farklılıklardan doğan risklerin değerlendirilmesi, tedavi seçimi ve takibinin daha sağlıklı yapılabilmesi adına prognostik ve prediktif faktörler öneme haizdir. Meme kanserinde etkili olan prognostik ve prediktif faktörler aşağıdaki gibi sıralanmıştır:

3.4.6.1. Aksiller Lenf Nodu Tutulumu

Günümüzde meme kanserinde kabul görmüş en değerli ve en önemli prognostik faktör'ün, aksiller lenf nodlarındaki metastazın varlığı ya da yokluğu olarak gösterilmektedir. Aksiller lenflere metastazın olmaması iyi prognazla ilişkilendirilirken, aksiller tutulumun pozitif olduğu olgularda ise metastatik lenf bezlerinin sayısı ve lokalizasyonuna bağlı olarak kötü prognozla ilişkilendirilmektedir. Aksiller lenf bezi tutulumunun değerlendirilmesi cerrahi diseksiyon ve histopatolojik incelemeler sonucunda ortaya konulmaktadır (243).

Aksilla metastazı olmayanlarda 10 yıllık hastalıksız sağkalım oranı %70-80'lerle ifade edilirken, bu oranın aksillası pozitif olan hastalarda %30'lara kadar düştüğü hatta aksilladaki gözlenen metastaz sayısının fazla olması durumunda bu oranın daha da düşük rakamlarda olduğu ifade edilmektedir (10).

3.4.6.2. Tümör Çapı

Özellikle aksiller lenf nodlarına metastazın olmadığı durumlarda, tümör boyutu meme kanseri nüksünü tahmin etmek için en güçlü prognostik faktör olarak bildirilmektedir. Primer tümörün çapı büyüdükçe, prognoz da o kadar kötü seyirli olmaktadır. Çap büyüdükçe aksiller tutulum ile birlikte metastatik nod sayısında da artışlar izlenmektedir.

3.4.6.3. Tümörün Histolojik Karakteri

Meme kanseri patolojisinin en sık rastlanan histolojik türünü infiltratif duktal karsinomlar oluşturmaktadır ve en kötü prognoza sahiptir. Ayrıca kolloid, tübüler ve papiller karsinomlar da metastazlara çok rastlanmaz bu nedenle prognozları en iyi olanlar arasında atfedilirler.

3.4.6.4. Tümörün Differansiyasyon Derecesi

Nükleer grade (derece), tümörün çekirdek özelliklerini ve atipi derecesini ortaya koyarken, histolojik differansiyasyonda ise hücresel ve dokuyla ilişkili morfolojik unsurlar ön plana çıkmaktadır. Grad-I; iyi differansiye, grad-II; orta differansiye, grad-III; kötü derecede differansiye, grad-IV; anaplazi olmuş tümörleri adlandırmak için kullanılmaktadır (15).

3.4.6.5. Proto-Onkogen Aktivasyonu

Meme kanseri prognozunda etkili olan c-erbB2 (HER-2 veya neu onkogeni), c-myc, ras, β -katenin, Wnt gibi pek çok onkogen bildirilmiş olup, bu genlerin amplifikasyonları ya da ekspresyonlarının kötü prognozla ilişki olduğu

birçok çalışma ile ortaya konulmuştur. Moleküler prognostik ve prediktif faktörler içerisinde en fazla suçlanan c-erbB2 genidir. Bu onkogen, epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) benzerlik gösteren protein ürünü, tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve bunun bir sonucu olarak hücre proliferasyon ve farklılaşmasında da önemli bir mediyatör olarak görev almaktadır (10, 243, 244). Memedeki neoplastik olguların yaklaşık %30'unda c-erbB2 amplifikasyonu görülmekte olup, c-erbB-2 pozitifliği rekürrens riskinde artışlara neden olduğu bildirilmektedir. Ayrıca meme kanserinin başlangıç ve metastaz evrelerinde olan hastalarda, son 10 yılda sağkalım oranlarında anti-HER-2 tedavisi ile faydalı sonuçların alınmasına rağmen histolojik HER-2 alt tipi hala kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (234, 246).

3.4.6.6. Hücre Proliferasyon Belirteçleri

Diğer kanserlerde olduğu gibi tümör hücrelerinin sahip olduğu artmış proliferasyon yeteneği meme kanserlerinde de kötü prognozla ilişkilendirilmektedir. Hücre proliferasyonunu ortaya koymak için çeşitli parametreler ve indekslemeler immuno histokimyasal ve flow stometri tekniklerinden faydalanılarak ortaya konulmaktadır. Bunların başlıcaları arasında Ki-67, p53, CerbB-2, EGFR, PCNA, katepsin D, Bcl-2 gibi proteinler yer alırken mitotik indeks, timidin işaretleme indeksi ve Ki-67 indeksleri de yapılan indekslemelere örnek olarak verilebilir (15, 228).

3.4.6.6.1. Proliferasyon Belirteci Ki-67 İndeksleme (Tutulumu, Histoskoru)

Ki-67 antijeni; 10. Kromozom üzerinde kodlanan, ‘non histon’ karakterde bir proteindir. Moleküler ağırlığı 345-395 kDa olan bu protein ilk kez 1983 yılında Gerdes ve ark. (247), tarafından proliferasyonla ilgili bir çekirdek antikoru olarak ifade edilmiştir. Günümüzde ise hücre proliferasyonlarını ortaya koymak için kullanılan belirteçler arasında, Ki-67’nin histoskorlanması en kapsamlı ve en sık kullanılan bir belirteç haline gelmiştir. Hücre döngüsünde özellikle proliferatif evredeki hücrelerde nükleer antijeni ifade eden monoklonal bir antikor olması sebebi ile hücre döngüsünün dinlenme fazı olan G0 evresi hariç, geri kalan tüm fazlarında (G1, S, G2, M) aşırı eksprese olduğu bildirilmektedir. Ayrıca proteinin bu ekspresyonu, mitoz fazında en yüksek konsantrasyonlarına ulaşana kadar, hücre döngüsü ilerledikçe artmaya devam etmektedir. Mitozdan hemen sonra konsantrasyonu en düşük düzeylerde seyretmektedir (248). Bir proliferasyon göstergesi olan Ki-67 çekirdek proteinin ortaya konulmasında, karşılaşılan en dezavantajlı durum ise içerisinde tekrarlanan ‘P-E-S-T dizisi’ barındırıyor olmasıdır (249). Bir proteinin içerisinde tekrarlı prolin-glutamik asit-serin ve treonin amino asit rezidülerinin bulunması, bu proteinin yarı ömrünün 2 saatten az olacağına işaret etmekte ve daha çabuk bir şekilde yıkılacağına da sinyalini vermektedir. Dolayısı ile bu durum, gerek istirahat hainde olmayan normal hücreler için gerekse tümörlü hücre proliferasyonun belirlenmesinde iyi bir gösterge olan Ki-67’nin, immunohistokimyasal çekirdek boyanma özelliğini perdeleyerek, yanlış negatif sonuçların oluşmasını doğurabilir.

3.4.6.7. Hormon Reseptörleri

Son evrede olan meme kanserli olgularda, steroid hormon reseptörlerinin durumu hem prognostik hem de prediktif faktörler arasında varlığını sürdürmektedir. Hastalıksız sağkalım oranlarını ele alan çeşitli çalışma verileri, östrojen reseptörü ekspresyonu olan (ER +) hastaların, östrojen reseptörü ekspresyonu olmayan (ER -) hastalara göre daha uzun yaşam süresine sahip olduklarını ortaya koyarken, hastalıksız sağkalım süresinde 5 yılda toplam %10 artış olduğunu göstermiştir (250). Gradı düşük meme kanserlerinde, ER ekspresyonun yokluğu, erken nüks ve azalmış yaşam süresi ile ilişkili en önemli prediktif faktör olarak görülmektedir. Ayrıca ER (+) hastalarda tedaviye yanıt oranı %70'lerle ifade edilirken, ER (-) hastalarda bu oranın %5'lere kadar düştüğü rapor edilmektedir. Hormon reseptörlerinin varlığı prognozun yanısıra neoplazmin moleküler alt tipin belirlenmesi, kemoterapi tedavisinin seçimi ve en önemlisi de hormonal tedavinin başarısını simgeleyen en önemli prognostik ve prediktif unsur olarak karşımıza çıkmaktadır (15, 250).

3.4.6.7.1. Östrojen Reseptörleri ve Meme Kanseri ile İlişkileri

Organizmada bir hormonun hedef doku üzerinde fizyolojik fonksiyonlarını oluşturabilmesi için reseptörüne bağlanması gerekmektedir. Östrojen hormonu, steroid yapısı sayesinde sitoplazmik ve nükleer membranlardan hızla diffüze olmakta ve intrasellüler yerleşimli reseptörleri ile bağlanarak etkilerini göstermektedir (251). Hormon reseptör ailesinin yaklaşık yüzelli alt tip içerdiği tahmin edilmekte olup, östrojen reseptörleri ise nükleer reseptör alt bölüm içerisinde yer almaktadır. Şuan için sadece iki tip nükleer östrojen reseptörü

tanımlanmıştır; bunlardan ilki östrojen reseptörü alfa (ER- α / NR3A1), diğeri ise östrojen reseptörü beta (ER- β / NR3A2)'dır (252). Bu reseptörler bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapmakta ve her iki reseptörün östrojenle bağlanması sonucu hedef dokudaki östrojen yanıt elemanları (ERE) üzerinden gen transkripsiyonunu başlatmaktadır (253). İki protein, farklı gen bölgeleri üzerinden kodlanmakta olup dokulardaki dağılımları ve fonksiyonları farklılık arz etmektedir.

Dokulara spesifik ekspresyon dağılımlarını inceleyecek olursak, ER- β 'nın; prostat epitelisi esas olmak üzere, mesane, kemik ve ovaryumun granuloza hücrelerinden akciğer, merkezi ve periferik sinir sisteminlerine kadar vücudun farklı organlarında eksprese olduğu bildirilirken, ER- α ise meme epitelisi (özellikle duktal epitel) başta olmak üzere ovaryum ve uterus dokusunda eksprese olduğu gözlenmektedir (254).

ER- β aktivasyonun, özellikle erken evre prostat kanserlerinde anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkiyle ilişkili olduğu kaydedilmiştir. Meme dokusunda ER- β varlığının anti-proliferatif etki ile ilişkili olduğu ifade edilmesine rağmen yine de fizyolojik fonksiyonu ve meme kanserlerinde patolojik tanı değeri halen netlik kazanmamıştır (255).

ER- α ekspresyonlarının normal meme epitelyal hücrelerine kıyasla memenin neoplastik hücrelerinde oldukça yüksek olduğu ortaya konulmuştur. Günümüzde artık ER- α meme kanserinin başlaması ve ilerlemesinden sorumlu bir transkripsiyon faktörü olarak görülmekte ve tüm bunların bir sonucu olarak, meme kanserinin önlenmesi ve tedavisi ile ilgili çalışmalarda özellikle kaleme alınmaktadır (256, 257).

3.4.6.7.1.1. ER- α 'nın Domain Yapısı, Sinyal Mekanizması

ER- α proteini, 595 amino asitten meydana gelmiş olup molekül ağırlığı 66-67 kDa'dır. Yapısında, N-terminali ile C-terminali arasında birbirlerinden farklı işlevlere sahip olan altı farklı bölge ve beş domain barındırmaktadır (Şekil 15) (254).



Şekil 15. ER- α 'nın Domain Yapısı (254)

A/B domaini içeren kısım: Bu domain, proteinin N-ucunda bulunan değişken bölgesini oluşturmaktadır ve ligant bağımsız olarak, ER'nin transkripsiyonel aktivitesinden sorumlu tutulan aktivasyon fonksiyon -I (AF-I)'de bu bölgede lokalizedir. Başka bir deyişle bu bölgenin varlığı sayesinde, hormon reseptörüne bağlı olmadığı durumlarda dahi, reseptör merkez transkripsiyon aygıtının bileşenleri ile doğrudan etkileşerek hedef genlerin transkripsiyonunu başlatabilir ya da diğer proteinlerle sinyal iletiminde bulunabilir. AF-I bölgesinin başka bir özelliği ise hücre tipi ve kontrol bölgesine göre özgünlük içermesidir. Ayrıca β reseptörleri bu bölgeyi içermez (258, 259).

C domaini içeren kısım: DNA ile bağlanmadan sorumlu kısımdır (DBD). Özellikle östrojenin bu domaine bağlanması ile hedef gendeki ERE'ler konformasyonel değişimlere uğrayarak reseptör dimerizasyonlarına neden olur. Reseptördeki bu domain; içermiş olduğu 2 adet 'çinko parmak' motif şekli ile DNA yapısında doğru yere (özel düzenleyici diziler) yüksek affinite ile

bağlanmasını sağlayarak bir yandan transkripsiyon aktivasyonunun gerçekleşmesinde ve stabilitesini korumasında görev alırken, hormonun hedef hücrelerindeki fonksiyonlarının oluşmasını sağlayan hormon-reseptör özgüllüğünün belirlenmesinde de önemli roller üstlenmektedir (260-262).

D domaini içeren kısım: C ve E bölgesi arasında bir köprü konumundadır. Nükleer lokalizasyon sinyalinin (NLS) oluşmasında ve reseptör proteininin dimerizasyonunda görev aldıkları bildirilmektedir. Ayrıca direk olarak DNA'ya bağlanmadan hedef genin transkripsiyonunu değiştirebilen proteinlerle de (koaktivatör ya da korepressör) etkileşim halindedir (258).

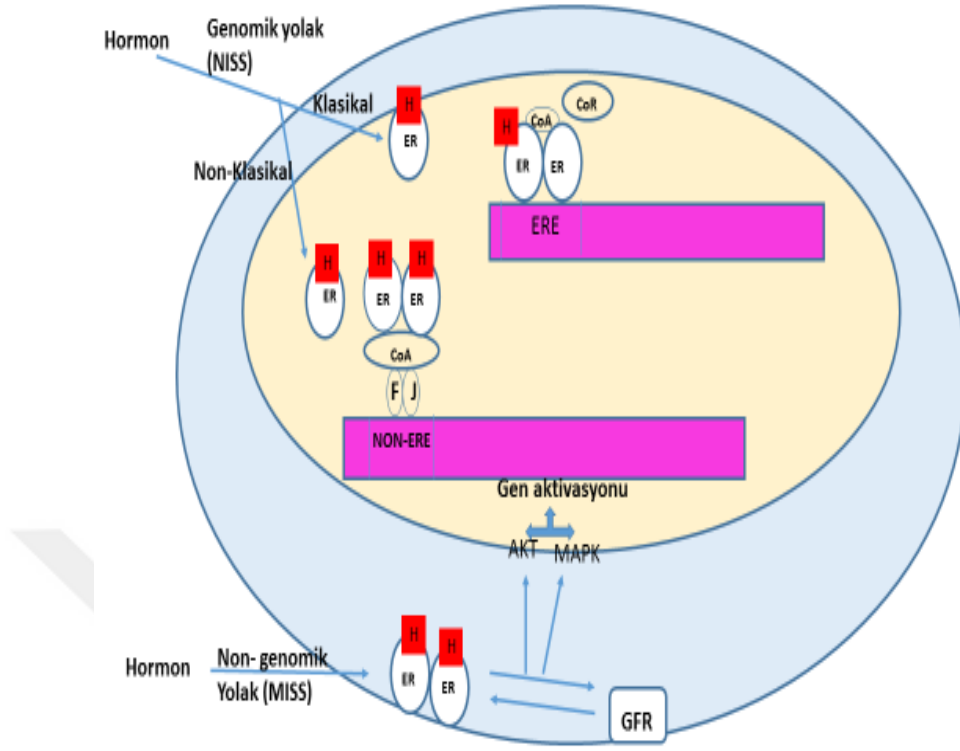
E domani içeren kısım: Bu kısım bünyesinde ligand bağlayıcı kısmı (LBD) ve aktivasyon fonksiyon 2 (AF-II)'yi barındırmaktadır. AF-II, çeşitli koaktivatörlere ve korepressörlere bağlanma bölgesi konumundadır. Kısaca ligant bağımlı aktivasyon burada gerçekleşir (258).

F domaini içeren kısım: Proteinin C-ucunda olup, kompleks bir düzenleyici rolü olduğu sanılmamakta ve sadece gen aktivasyonuna yardımcı olmaktadır (253-254).

Östrojenlerin hedef dokularındaki fizyolojik etkilerinin ortaya çıkmasında şüphesiz ER'ler büyük bir rol üstlenmektedir. ER'lerin kullandığı 2 ana yoldan biri Genomik sinyal yolağı (Nükleer sinyal yolağı, NISS; Nuclear-Initiated Steroid Signaling) diğeri ise Genomik olmayan (Membran yoluyla başlatılan steroid sinyal yolağı (MISS)) sinyal yolağıdır. 1. Yolda; sitoplazmik ya da nükleer yerleşimli ER'ler, bu rollerini bir transkripsiyon faktörü olarak gerçekleştirdikleri ifade edilmektedir. Bunu ya direkt olarak (Klasik yol, ERE bağımlı) ya da indirekt (Klasik olmayan yol, ERE bağımsız, Diğer ERE'ler) yolla,

DNA'ya bağlanmak koşulu ile ilişkili oldukları genlerin ekspresyonlarını modüle ederek gerçekleştirirler. (263). Kısaca bu genomik yollardan bahsedecek olursak, östrojen hormonu yokluğunda; intrasellüler yerleşimli ER'ler ısı şok proteinleri (Heat Shock Protein; HSP)'ne bağlı inaktif durumda iken, östrojen hormonunun sitoplazmaya diffüzyonu sonucu bu reseptörün LBD domainine bağlanması ile ya da başka bir ifade ile ER'ler kendilerine uygun ligandla bağlı olduklarında aktif duruma geçmektedir ki bu da reseptörde bir seri fosforilasyon olaylarının gerçekleşmesi ile karakterize, reseptörün konformasyonel yapısındaki değişiklere neden olarak dimerizasyonuna sebep olmaktadır (264, 265). Östrojen-ER kompleksi oluşuktan sonra DNA'da kendisine spesifik bölgesinde bulunan ERE'ler ile DNA'ya direk olarak bağlanarak bu kompleksin aktivasyonuna neden olur. Böylece nihai hedef olan DNA'da transkripsiyonel faktörlerin aktivasyonu, spesifik gen ve akabinde protein ekspresyonları gerçekleşmiş olmaktadır (266). Klasik olmayan genomik yolda ise ER'lerin gen ekspresyonu başlatabilmelerinde aracılık eden ERE'ler (spesifik transkripsiyon faktörleri) yer almazken, ekspresyon indirekt olarak; Nükleer kappa- β (NF- $\kappa\beta$), Fos/Jun aktive protein kompleksi (AP-1), siklik AMP yanıt elemanları (CREs) ve Sp1 bölgesi gibi diğer transkripsiyon faktörleri ya da östrojenin düzenlediği Siklin D1 ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü (IGFR-1) ile ilişkili başka moleküler sinyal yolları üzerinden sağlanmaktadır. Bu da hem artmış proliferasyon hemde apoptozun baskılanması anlamına gelmektedir (267). Gerek klasik gerekse klasik olmayan genomik yolda östrojenin hedef dokularında biyolojik yanıtını gösterebilmesi dakikalar ya da saatler ile ifade edilirken bir diğer ana yolak olan genomik olmayan yolda ise bu etki sn/dk'ler içinde çok çabuk oluşmaktadır.

Bunun nedeni ise genomik olmayan bu sinyal yolağının hücre zarından köken alması ile açıklanmaktadır. Membran aracılığı ile indüklenen steroid sinyal yolağında (MISS) başka bir ifade ile ER'lerinin ligant bağımsız aktivasyonu ise, hücre zarında bulunan başka sinyal molekülleri (kaveolin-1, G proteinleri, Src, Ras, B-Raf vb.) üzerinden, çok çeşitli sinyal yollarının iştiraki ile gerçekleşmektedir. Örneğin; östrojen yokluğunda farklı ekstra sellüler sinyal moleküllerinin (EGF, TGF ve IGF-1 vb.), hücresel kinaz enzimlerini ve çeşitli molekülleri (PLC, PKA-B-C, ERK, PI3K, MAPK, PTKS, Ca NOS vb.) fosforile edip aktifleştirmeleri sayesinde ER'lerinin ve koregülatörlerinin fosforile hallerine geri dönmesini indükleyerek tekrardan ER'lerin aktivite kazanmaları sağlanmış olur ki bu da artan hücre proliferasyonunu doğurmaktadır (266). Bu olağanüstü mekanizma özellikle büyüme faktörleri, sitokinler ve nörotransmitterler gibi hücre dışı sinyal moleküllerinin lokal düzeylerinin yüksek olduğu durumlarda ve menopoza sonrası kadınlarda görülen serum östrojen düzeylerinin düşük seyrettiği durumlarda devreye girmektedir (267). Sonuç olarak non-genomik ve genomik mekanizmalar arasında güçlü bir sinerjizmin olduğunu ve tüm bu yolların aktivasyonu sonucu meme kanseri hücrelerinde mitotik aktivitenin arttığı gösterilmiştir (268) (Şekil 16).



Şekil 16. ER'nin Sinyal Yolakları (269)

3.4.6.8. Meme Kanseri ile İlişkili Tümör Belirteçleri

Serum tümör belirteçleri, kanser hücreleri tarafından sentezlenip kan dolaşımına salınan veya organizmanın kanserli dokuya cevap olarak ürettiği karbonhidrat, protein, enzim ve hormon yapısında olan moleküllerdir (270). Meme kanseri ile doğrudan ya da dolaylı olarak ilişkili olan; Her-2 (ekstra sellüler domaini ECD), Karsinoembriyonik Antijen (CEA), Doku Polipeptit Antijen (TPA), musin benzeri yüksek molekül ağırlıklı glikoprotein ailesi ya da bu ailenin üyeleri olan karbonhidrat antijenleri ve kan grubu antijenleri (musinoz karsinoma antijeni [MCA], meme kanseri musin antijeni [BCM], CAM26, CAM29, CA 15-3, CA27.29, CA-549, CA-125, CA72.4, memeli serum antijeni [MSA] gibi bir

dizi tümör belirteçleri olmasının yanında, klinikte en yaygın olarak kullanım alanı bulmuş serum meme kanser antijenleri arasında CEA ve CA 15-3 yer almaktadır (271, 272). Bu belirteçler yanlış bilinen bir bilgi olan tümörün tanısından ziyade progresyonunun izlenmesinde, rekürrensin, metastazın ve tedaviye yanıtın belirlenmesinde kullanılmaktadır. İyi bir tümör belirleyicisinin sahip olması gereken özellikler, sadece spesifik organ bazlı tümör hücreleri tarafından sentez edilebilmeli, vücut sıvılarında saptanabilmeli ve habis hastalıkların erken evrelerinde kanda yüksek konsantrasyonlarda bulunmalı buna karşın sağlıklı kişilerin kanındaki düzeyleri ise çok düşük düzeylerde olmalıdır.

3.4.6.8.1. Karsinoembriyjenik Antijen (CEA)

Molekül ağırlığı yaklaşık 150-300 kDa olan, yapısında en az %50 oranında karbonhidrat ihtiva eden bir hücre yüzey glikoproteinidir. Heterojen yapılı bir onkofetal antijen olan CEA'nın, embriyonik dönemde endodermal kaynaklı sağlıklı mukozal hücrelerden eksprese edilerek, hücre adezyonunda görev aldığı bildirilmektedir. (273). Doğumdan sonra kandaki düzeyleri de düşmektedir. Yetişkin serum CEA düzeylerindeki artış kolorektal kanser başta olmak üzere meme, mide akciğer, prostat ve over metastatik karsinomları ile ilişkilendirilmektedir.

Memenin kanserli dokusundan kaynaklanan tümörlerde CEA'nın aşırı ekspresyonu raporlanmış olup, inflamatuvar yanıt ve neoplastik metastatik hastalık sonrasında da tümörlü dokudan kan ve çeşitli vücut sıvılarına salgılandığı ifade edilmektedir (274). Kanser hücresinin çoğalması ve tümör büyümesi için de anjiyogenez stimülatörü olarak görev yaptığı vurgulanarak, CEA'nın, tümör

regresyonu ve metastaz inhibisyonu için de çok yararlı bir prognostik faktör olduğu belirtilmektedir. Ayrıca iyi huylu meme adenomlarında serum CEA düzeylerinde bir artış gözlenmediğinden dolayı, memenin iyi huylu ve invaziv karsinomlarını ayırt etmek için kullanılmaktadır (275).

3.4.6.8.2. Kanser Antijen 15-3 (CA 15-3)

Moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 300-450 kDa olan glikoprotein yapısındaki kanser antijen 15-3 belirteci; karbohidrat antijen 15-3, polimorfik epitelyal musin ve MUC-1 gibi çeşitli isimlerle de anılmaktadır (276-278). CA 15-3 belirteci ya tümör hücre yüzeyindeki antijenlerden ya da tümör hücrelerinden salgılanırlar CA 15-3'ünde orjin aldığı karbohidrat antijeni olarak kısaltılan tüm 'CA' belirteçleri yeni jenerasyon serum tümör belirteçlerini oluşturmaktadır. Tüm bu CA ölçümlerinin altında yatan prensip ise meme epitelinde üretilen ve dolaşıma salınan, heterojen yapılı müsin olarak bilinen episialin antijenine karşı oluşturulmuş antikorlar aracılığı ile episialin molekülünün saptanmasına dayanmaktadır. Molekülün hücre yüzeyindeki farklı epitoplarının bulunması ile bu belirteçler de farklı isim almaktadır Ayrıca bu moleküllerin, enzim ve hormon gibi diğer belirteçlere göre daha spesifik oldukları vurgulanmaktadır (277, 279). Serum CA 15-3 konsantrasyonlarının; dişi genital sistem kanserlerinde, gastro-intestinal sistem kanserlerinde, akciğer adenomlarında, kronik aktif hepatitte, sirozda, hipotroidizmde ve çeşitli anemili benign hastalarda arttığı bildirilse de, özellikle ileri evre meme kanserli olgularda spesifik olarak yükseldiği bildirilmektedir (270, 280, 281). Meme kanseri tanısı almış erken evreli hasta serumlarının sadece %20' sinde anlamlı bir CA 15-3 artışı saptanırken metastatik

olanlarda ise bu oranın %90'a çıkması, hatta kemik ve karaciğer metastazı olan hastalarda daha da yüksek değerlerde görülmesi meme kanseri metastazları için ne kadar spesifik bir belirteç olduğunu göstermektedir (277, 282). En büyük handikapı, erken evreli meme kanserlerinde kanda düşük değerlerinin saptanabilmesidir. Bu ifade tarama ve tanı için ideal bir belirteç olamayacağı anlamına gelse de, CA15-3'ün klinikte geç evreli ya da metastatik meme kanserinin tedavisinin takip süreci, rekürrens ve metastaz değerlendirilmesinde kullanım alanı bulmuş mükemmel (en yaygın) bir belirteç olma özelliğini değiştirmemektedir (283).

Tüm bunların ötesinde tümör belirteçleri prognozun değerlendirilmesinde her ne kadar yaygın kullanım alanlarına sahip olsalar da, tek başlarına bir anlam ifade etmezler. Birden fazla belirteç, birlikte incelendiği takdirde rekürrens veya metastatik hastalıklar için daha duyarlı ve daha faydalı olabilecekleri düşünülmektedir (10).

3.4.7. Meme Kanseri Önlemede Fitoterapinin Yeri ve Polifenol Bileşikler

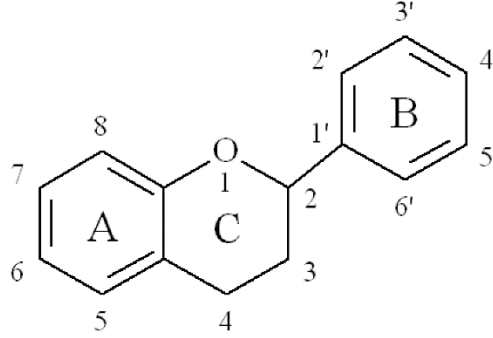
Stephen DeFelice tarafından (284), ilk olarak 1989 yılında 'beslenme' ve 'ilaç' kelimelerinin bir araya gelmesi ile oluşturulan 'nutrasötik' teriminin literatüre kazandırılmasından sonra yapılan çeşitli epidemiyolojik çalışmalarla da, birçok bitkisel ve fonksiyonel gıda olma özelliğine sahip meyve, sebze ve meşrubat tüketiminin meme kanseri gelişme ve tekrarlama riskini azalttığı ve kanserli hastaların sağkalım oranını artırdığı gösterilmiştir (285, 286).

Başlıca fitoterapi ajanı olarak kullanılan nutrasötikler; fitoöstrojenler,

fitosteroller, lignanlar, terpenler, fitateller, sinnamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller, askorbik asit flavonoidler ve polifenolik vb. bileşiklerdir. Tıbbi uygulamaların yanı sıra flavonoid ve taninleri içeren polifenoller hayvan ve insan gıdalarının tamamlayıcı bir parçasını oluşturmaktadır (287). Ayrıca diyetle ve diyetle olmayan bu ajanlarda bulunan çok sayıda biyoaktif fitokimyasal maddenin, proliferasyon, differansiasyon, apoptoz, oksidatif stres, inflamasyon, neovaskülarizasyon ve birkaç önemli özel sinyal yollarının modülasyonu ile meme tümör hücrelerini *in-vitro* olarak yok ettiği ve meme tümörlerinin gelişimini baskıladığı veya mevcut tümörlerin büyümesini *in-vivo* olarak geciktirdiği bulunmuştur. Ayrıca, çeşitli klinik müdahale çalışmalarında da meme kanseri önleme ve tedavisinde çeşitli diyet takviyeleri ve doğal ürünlerin potansiyel etkinliği araştırılmıştır. Tüm bu sağlık üzerindeki etkilerinden dolayı polifenoller başta olmak üzere bitkilerde bulunan diğer gıda fenoller ve flavonoidler son zamanlarda diğer kanserlerde olduğu gibi meme kanserinin önlenmesi ile ilgili araştırmalarda da ilgi odağı olmuştur (288).

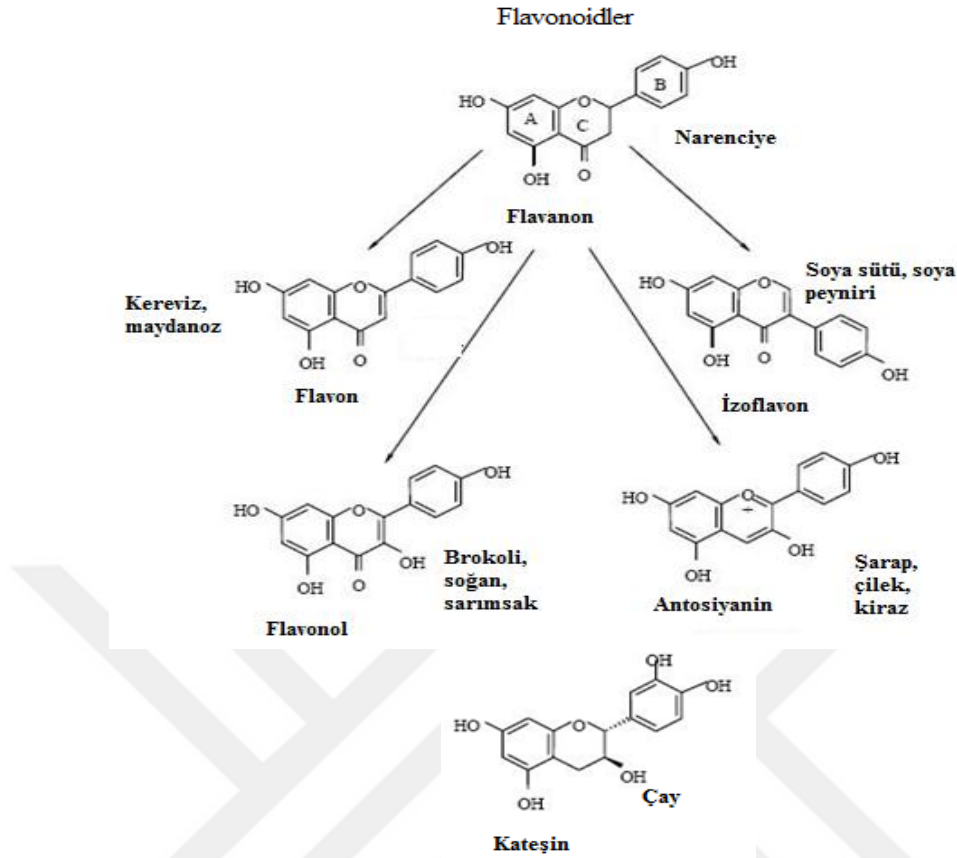
Doğada farklı karakterde bulunan 8000'nin üzerinde fenolik bileşik, 5000'nin üzerinde de flavonoid olduğu bildirilmiştir (289). Polifenoller ya da fenolik bileşikler, bitkilerde fazla miktarlarda bulunan, meyve ve çiçeklere renklerini veren ve kendilerine has kokusu olan, çevresel stres faktörlerine karşı bitkilerde koruma sağlayan, bir benzen halkasına bağlı bir veya birden fazla hidroksil grubu içeren aromatik moleküllerdir (287). Bu polifenol bileşiklerini kimyasal yönden; flavonoid yapısında olanlar ve flavonoid olmayanlar diye 2 ana gruba ayrılmaktadır.

İlk grup olan flavonoidler yapılarında iki fenil halkasını (A,B), bir propan zincir ile birleştiren heterosiklik piren halkasından (C) meydana gelmektedir, C6-C3-C6 (difenilpropan) formülasyonu ile gösterilmektedir (Şekil 17).



Şekil 17. Flavonoidlerin Heterosiklik Yapısı (290)

Heterosiklik C halkasındaki hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonlarının farklı olması ile ya da 3 karbonlu birimin oksidasyon kapasitesindeki farklılıklara göre flavonoidler; antosiyaninler (siyanidin, delfinidin, peonidin gibi) , flavonlar (tangeretin, nobiletin, krisin, diosmin, apigenin ve luteolin gibi), flavanonlar (naringenin, hesperetin gibi), flavonollar (kamferol, kuersetin, mirisetin, izoramnetin gibi), izoflavonlar (daidzein, genistein gibi), flavanollar (kateşinler, epikateşinler gibi) olmak üzere çeşitli alt gruplar içermektedir. Ayrıca benzoik asitlerin esterleşmesi sonucu oluşan hidrolize olabilen tanenler ve proantosiyandinler (kondense tanenler) flavonoid olmayan grupta kategorize edilebilmektedir (291). Ayrıca bu grupların hangi bitkilerde daha yoğun bulunduğu da farklılıklar göstermektedir. Şekil 18’de bazı flavonoidler ve bunları içeren meyve ve sebzelere örnekler verilmiştir.



Şekil 18. Diyetteki Bazı Nutrasötiklerde Bulunan Flavonoid Çeşitleri (292)

Flavonoid olmayan diğer grupta (fenolik asit grupları) ise, sinamik asitler (ferolik, p-kumarik), benzoik asitler (gallik asit, ellajik asit, salisilik asit) ve türevleri fenolik alkollerinde barındırırken, özellikle benzoik asitler nar gibi meyvelerde bol bulunmaktadır.

3.4.7.1. Narın Yapısı ve Koruyucu Etkileri

Eski ve mistik bir meyve özelliğine sahip olan nar (Pomegranate, *Punica granatum L.*) halk arasında ‘Kışın mücevheri, şifalı bitki’olarakta bilinmektedir. Punicaceae familyasının en baskın üyesidir. Nar meyvesinin ana vatanı Kuzey Hindistan'daki Himalayalar olmakla birlikte, Türkiye ve İran başta olmak üzere tüm Akdeniz bölgesi boyunca eski zamanlardan beri yetiştirilmektedir.

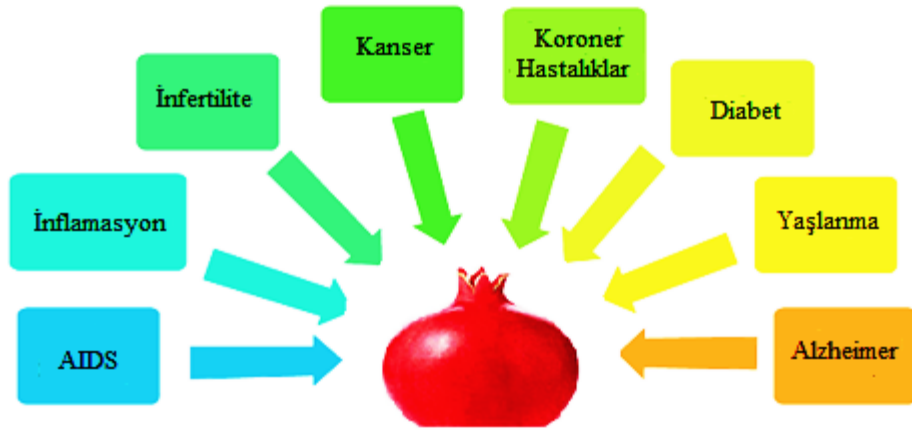
Nar meyvesi ve kabuğu başta olmak üzere (Pomegranate peel); birçok doğal biyoaktif antioksidan ve antikanserojen fitokimyasal ajan içermektedir (9, 293). Bunlar arasında; Luteolin, Kaempferol, Quercetin gibi flavonoidler, Punikalagin, Ellajik asit, Kafeik asit ve Gallik asit gibi hidroliz edilebilir tanenler ve polifenolik (asit) bileşikler, yüksek miktarlarda konjüge linolenik asit olan punisik asit gibi poliansature yağ asiti ve çeşitli sterioller, delfinidin, siyanidin ve pelargonidin gibi antosiyanin bileşiklerinin mono ve di glikozid türevleri sayılabilir (294-296). Ayrıca nar meyvesi; kompleks polisakkarit bileşikler, kalsiyum, potasyum, azot, fosfor, magnezyum ve sodyum gibi mineraller ile A vitamini (β karoten), C vitamini (askorbik asit) ve E vitamini (α tokoferol) gibi flavonoidleri yapısında bulundurur (296). Narın çeşitli kısımları ve içermiş oldukları fitokimyasal komponentleri Tablo 5’te gösterilmektedir.

Tablo 5.Çeşitli Nar Kısımlarının Moleküler İçerikleri (296).

Nar kabuğu	Nar suyu	Nar kök ve kabuk	Nar çiçeği	Nar Yaprakları	Nar çekirdeği
Gallik asit	Basit şekerler	Ellagitannins	Safra asitleri	Karbonhidratlar	3,3'-Di-O-Metilellajik asit
Ellajik asit	Alifatik asitler	Piperidin alkaloidleri	Ursolik asit	Şekeri azaltmak	3,3',4'-Tri-O- Metilellajik asit
Punikagalin	Gallik asit	Pirolidin alkaloid	Triterpenoidler	Steroller	Punisik asit
Punikalagalin	Ellajik asit	Pelletierin alkaloidler	Yağ asitleri	Saponinler	Oleik asit
Kafeik asit	Kuinik asit			Flavonoidler	Palmitik asit
Ellagitanin	Flavonollar			Tanenler	Stearik asit
Pelletiirin a.	A. a.			Piperidin alkaloidleri	Linoleik asit
Luteolin	Mineraller			Flavon	Steroller
Kaempferol	EGCG			Glikozit	Tokoferoller
Kuercetin	Askorbik asit			Ellagitannins	Seks steroidleri

Nar meyvesini oluşturan tohum, kabuk ve meyve suyu kısımları farklı oranda biyoaktif moleküller içermektedir. Ayrıca birçok çalışmada da meyvenin farklı kısımlarından prufiye edilmiş nar suyu, nar ekstresi ve çeşitli derive nar

ürünlerinin içermiş oldukları fenolik asit, flavonoidler ve ellagitannenlerin miktarlarına bağlı olarak, farmakolojik aktivitelerinin de değişebileceği rapor edilmektedir. Nar meyvesinin tüm kısımlarının özlerini içeren ekstrelerin başta kanser olmak üzere, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, infertilite, Alzheimer hastalığı (297) yaşlanma ve AIDS (298). (Şekil 19) gibi birçok farklı hastalığı hedef alan terapötik özelliklere sahiptir. Narın kapsamlı terapötik yararları birtakım mekanizmalara bağlı olsa da, çoğu araştırmacı bu etkilerin altında, anti-oksidan, anti-inflamatuvar ve antikanserojen özelliklerin baskın olduğunu bildirmiştir (296).



Şekil 19. Nar Meyvesinin Terapötik Faydalı Olduğu Hastalıklar (296)

3.4.7.1.1. Nar'ın Kanser Üzerine Koruyucu Etkileri

Bazı çalışmalarda (9, 293), nar meyvesinin, meme, kolon, karaciğer ve deri dahil bazı kanser hücreleri üzerinde anti-kanserojenik aktivite gösterdiği ve kanser riskini azalttığı bildirilmiştir. Nar meyve ekstrelerinin, terapötik olarak

kullanılabilecek değerli fitokimyasallar içerdği *in-vitro* ve *in-vivo* olarak bazı kanser hücrelerinde anti-proliferatif, anti-anjiyogenik, anti-invaziv ve pro-apoptotik etkiler gösterdiği, ayrıca güçlü anti-oksidan ve anti-inflamatuar özelliğe sahip birçok etkileri olduğu bildirilmiştir (299).

Kanser fizyopatolojisi; inisiasyon (başlama), promosyon (gelişme) ve progresyon (ilerleme) dönemi olmak üzere üç basamaklı bir süreç olarak tanımlanır. Bu süreçte ROS'lar sonucu oluşan oksidatif stres, başlangıç hücrelerinin proliferasyonu ve differansiasyonunda artış gibi birçok karsinojenik yolak üzerine etki etmektedir. Bu nedenle yapılarında doğal flavonoid ve polifenol içeren antioksidan bileşiklerle oksidatif stresin baskılanması, bazı kanser çeşitlerinde başlangıç ve ilerleme safhalarının engellemesinde etkili bir yaklaşım olarak kabul görmektedir (300).

Nar meyvesinin kabuk kısmı bol miktarda polifenol ve punikalaginleri barındırmaktadır. Punicalin, ellajik asit ve gallagic asit gibi minör tanenleri içeren bir ellagitannen ailesinin bir parçası olan punikalagin, tek başına nar suyunun antioksidan aktivitesinin % 50'sinden sorumlu olan biyoaktif antioksidan bileşeni temsil etmektedir. (301). Nar ve nardan elde edilmiş yan ürünlerin içerisindeki polifenoller ve punikagalin gibi ellagitannen konsantrasyonlarının narın antioksidan kapasitesi ile sıkı ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Nar'ın antioksidan etkileri arasında; bazı CYP enzim aktivesini düşürerek prokarsinojen üretimini ve DNA hasarını önleme, lipid peroksidasyonunun inhibisyonu, güçlü serbest radikal süpürücü etki, anti-oksidan enzim ve non-enzimatik moleküllerin modülasyonu, fotokarsinogenez inhibisyonu, hücre sinyalizasyonu ve moleküler

transkripsiyona kadar uzanan geniş bir yelpazeye sahip oksidasyon koruma mekanizmaları sayılabilir (302-304).

Enflamasyon kanser hücresi ortamında kalıcı oksidatif strese neden olabilir ve özellikle kronik enflamasyon durumları DNA hasarına neden olarak kanserin başlangıç evresine öncülük edebilir ve ayrıca kanserin diğer evrelerinde de rol alarak kanserli hücelere hayatta kalma avantajı sağlayabilir. Tüm bu varsayımlar enflamatuvar sinyal yollarına karşı nar gibi yüksek anti-inflamatuvar etkili fitoterapi ajanlarını, kanserin önlemesi için bir potansiyel hedef haline getirmektedir. Çeşitli çalışmalar (305, 306) nar ya da farklı fraksiyonlarının COX-2 ifadesini down regüle ettiği ve sonuç olarak eikozanoid biyosentezini inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca araştırmacılar (307, 308). inflamatuvar sitokin ekspresyonunu sinerjistik olarak bastırdığını ve MMP'leri inhibe edebildiğini de bulgularında belirtmişlerdir.

NF- κ B yolağının aktivasyonu, inflamasyonu ve hücre proliferasyonunu işaret eden güçlü bir bulgu olarak bilinmektedir. Sıklıkla farklı kanser hücre dizilerinde tanımlanan NF- κ B 'nin aktivasyonu, kollajenaz geninin, hücre adezyon moleküllerinin ve sitokinlerin (TNF- α , IL-1, 2, 6 ve 8 vb.) genlerinin transkripsiyonunu yukarı yönde düzenledikleri bilinmektedir (309, 310). Sıçanlarda azoksi metan ile oluşturulmuş kolon kanser modelinin sonuçlarına göre; inflamasyonda NF- κ B, Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), protein kinaz B (AKT) yollarında ki aktivasyonlarının COX-2 ekspresyonu ile paralel olarak seyir gösterdiği, nar suyu (6-50 mg/L), toplam nar tanen özü (30-200 mg/L) ve punikalagin (25-200 mg/L) gibi, miktarları belli olan fitokimyasalların uygulamaları sonucunda, COX-2 protein ekspresyonunun anlamlı şekilde azaldığı

gözlenmiştir. Bu gözlem ile tutarlı olarak, meyve suyunun AKT aktivitesini ve NF- κ B aktivasyonunu inhibe ettiği kaydedilmiştir (311). Bu etkilerin hepsi narın anti-enflamatuar aktiviteye ve dolayısıyla antikanser potansiyeline sahip olduğunu işaret etmektedir.

Tüm bunların dışında, NF- κ B 'nin, immün yanıtta rol oynayan genlerde stimulasıya neden olduğu, ayrıca pro-inflamatuar sitokinlere yanıt olarak hücre döngüsü kontrolü ve hücre ölümünü düzenlediği de bilinmektedir. NF- κ B ekspresyonu Bcl-2 ailesi ve apoptoz inhibitörleri gibi hücre sağ kalımında rol oynayan genlerin transkripsiyonu ile ilişkilidir (Şekil 20). Nar meyvesinin özünün antiproliferatif ve pro-apoptotik özellikleri hem *in-vitro* hem de *in-vivo* olarak gösterilmiştir (295, 312).

Hücre büyümesi ve canlılığı üzerindeki bu önleyici etkilerin, p53'ten bağımsız olarak, G1 faz arresti sırasında p21 ve p27 tümör süpressör genlerinin yukarı regülasyonu ile CDKI-Siklin-CDK ağının aracılık ettiği karmaşık bir seri mekanizmalar ile kontrol edildiği gösterilmiştir. Bu etkiler, hücre döngüsünün G1 fazında faal olan Siklin D1, D2 ve E ve CDK-2, 4 ve 6'nın down regülasyonu ile sonuçlanmıştır (Şekil 20) (312). Ayrıca çeşitli kanserlerde de Siklin D' ekspresyonlarının düzenlenmesinin Wnt/ β -katenin yolağı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (313).

Son olarak tümörlere oksijen ve besinler sağlamak için gerekli olan yeni kan damarlarının oluşumunun (anjyogenez) ve gelişiminin engellenmesi, özellikle katı tümörlerin tedavisinde umut verici bir tedavi yaklaşımı sunmaktadır. Nar ekstresinin çeşitli kanserler üzerine anti-anjyogenik, anti-metastatik, anti-invazif etkileri üzerine *in-vitro* ve *in-vivo* kanıtlar bulunmaktadır (295, 314).

3.4.7.1.2. Narın Meme Kanseri ile İlişkisi

Meme kanserinin fitoterapi ajanları ile kemopreventif ve kemoterapötik tedavisi östrojen aktivitesinin inhibisyonunu hedef alan hormona bağlı birleştirilmiş bir stratejiyi temsil etmektedir. Bu strateji, çeşitli fitoöstrojen özelliğe sahip moleküllerin, östrojen reseptörüne karşı olan antagonizmine ve östrojen reseptörü/östrojen sentezinin inhibisyonuna dayandırılmaktadır. Östrojenin biyosentezi, androstenedion ve testosteronu östradiole dönüştüren aromataz (östrojen sentetaz) enziminin aracılık ettiği, meme kanserinin ortaya çıkışı ile doğrudan ilişkili olan bir hormonal biyolojik belirteç görevi görmektedir (295).

Östronun, çok daha güçlü östrojenik etkili 17- β -östradiol'e indirgenmesi de, aromataz ve 17- β -hidroksisteroid dehidrojenaz enzimlerinin aktiviteleri ile ilişkilidir. Nitekim nardaki ellagitanen türevli bileşikler, anti-aromataz aktivitesi ile ilişkilendirilmiş ve *in-vitro* olarak meme kanseri hücrelerinin büyümesini etkilediği bildirilmiştir (315). Ayrıca çeşitli araştırmalarda da fermente nar suyu ve nar kabuğu özütü ile kuvvetli bir şekilde bu enzimlerin aktivitelerinin inhibe edildiği ortaya konulmuştur (312, 316). Kim ve ark.(316), tarafından yapılan araştırma bulgularında narın bu etkilerinden dolayı, özellikle de östrojene bağımlı meme kanserleri üzerine, muhtemel kemopreventif ve adjuvan etkileri olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, bazı nar bileşenlerinin, östrojenik aktiviteye sahip olduğu ve böylece östrojen reseptörlerine karşı rekabetçi bir bağlanma ile 17- β -östradiolün östrojenik etkisini inhibe ettiği tarif edilmiştir. Ayrıca fitoöstrojenik ajanlarla oluşturulan östrojenik agonist etki ise özellikle prostat kanserinde,

androjenik aktiviteyi inhibe etmek için önemli bir tedavi stratejisi olabilir ve meme kanserinde ki fitoöstrojenlerin tedavi amacı ile karıştırılmamalıdır (312).

Çok sayıda *in-vivo* ve *in-vitro* çalışma, birçok nar ürünleri ve narın içindeki fitokoruyucu maddeler, ER + ve - meme karsinom hücrelerine karşı sitotoksik, anti-proliferatif, pro-apoptotik, anti-angiyojenik, anti-invazif ve anti-metastatik etkiler sergilediğini ortaya koymuştur (288).

Nar çekirdeği yağı ve fermente edilmiş meyve suyu konsantresi 7,12-dimetil benz [a] antrasen (DMBA) ile indüklenmiş prekanseröz meme bezi lezyonlarını *ex-vivo* (317), olarak bastırdığını ve nar özü'nün *in-vivo* (318), olarak ksenografli BT-474 tümörlerinin büyümesini inhibe ettiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir

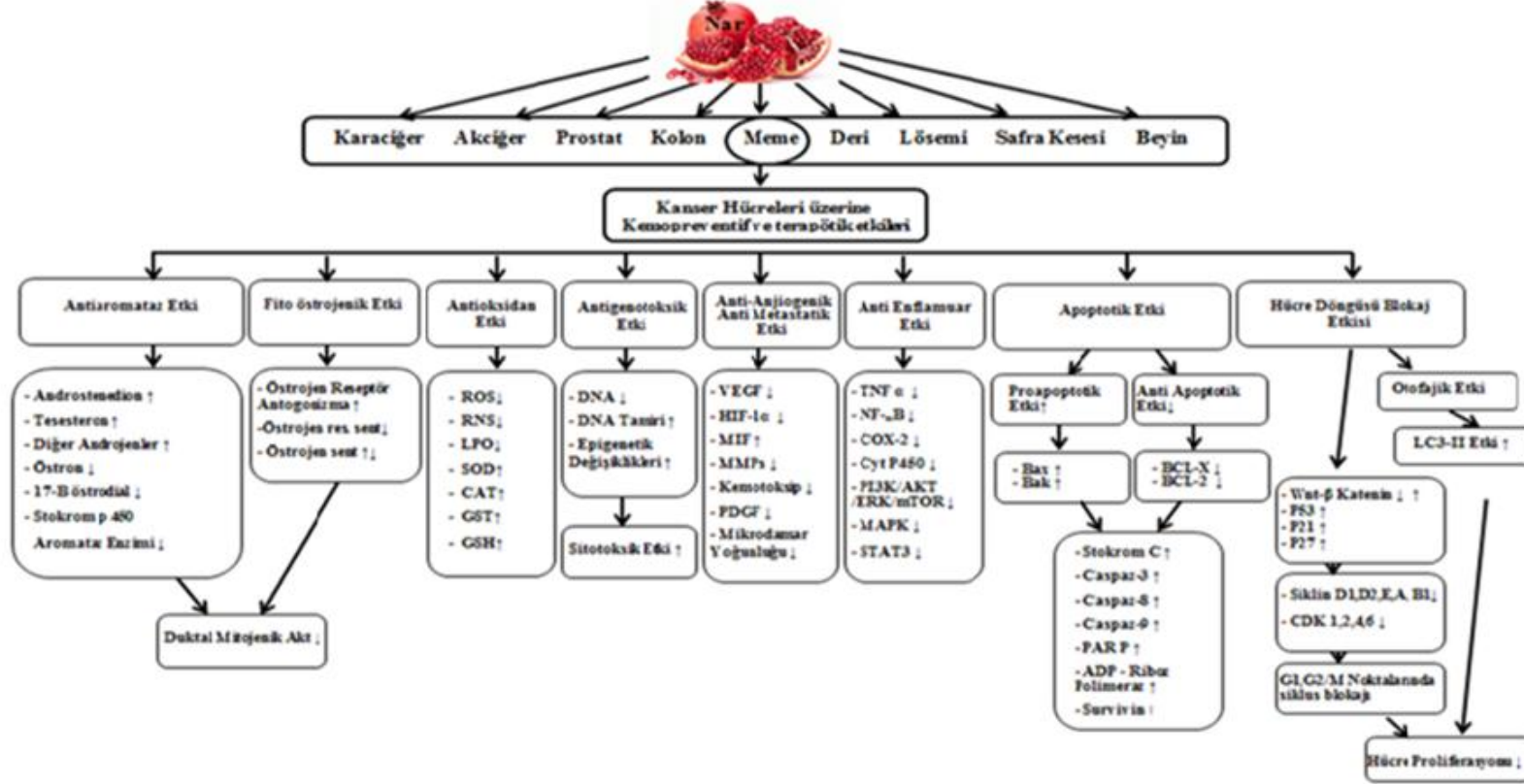
Fitokimyasallar tarafından, ER + olan kanserlerde MMP'lerin salınımı ve aktivasyonu hedef gösterilmektedir (319). Nar bileşenleri; MMP aktivitesini seçili olarak inhibe etmesiyle fokal adezyon kinaz aktivasyonunu ve VEGF ekspresyonunu azaltarak tümör hücre invazyonlarını normal dokuya kadar indirgemekte ve uzak doku metastazlarına engel olmaktadır (306).

Khan ve ark. (320), tarafından gerçekleştirilen çalışma sonuçlarına göre; sulu bir nar meyve özütü, agresif meme kanseri hücre dizilerinde proliferasyon, invazyon ve motilite ile ilişkili olan NF-κB 'ye bağlı olarak gerçekleşen gen ekspresyonunu inhibe ettiği raporlanmıştır. Ayrıca Ludwig ve ark. (321), tarafından yapılan çalışmada ise meme kanserlerinin yaklaşık % 50'sinde Mutant p53 ve p53 ekspresyonlarının olduğu rapor edilerek, saptanabilir p53 proteini varlığı, tümörün yüksek histopatolojik derecesi, artan mitotik aktivitesi ve saldırgan davranışı ile korele önemli bir prognostik belirteç olarak gösterilmiştir. Başka bir çalışmada (322) ise, terapötik amaçla kullanılan standartlaştırılmış nar

özütünün, insan meme kanseri hücreleri üzerine anti-proliferasyon etkisi şaşırtıcı bir şekilde G2 / M fazında hücre döngüsü arrestini uyarak gerçekleştirdiği kaydedilmiş, ayrıca apopitoz indüksiyonu ile hücre büyümesini de inhibe ettiği rapor edilmiştir

Tüm bu yolların dışında sağlıklı meme bezi gelişimine de katkıda bulunan Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ve onun ekspresyon ürünü olan Siklin D1 geni ile ilgili olarak, meme kanseri oluşumunda rol aldıkları görüşü yapılan son çalışmalarla gösterilmiş ve bizler içinde ayrı bir merak ve ilham kaynağı olmuştur. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının; hücrel adhezyonun ve hücredeki spesifik gen ekspresyonlarının düzenlenmesi ile ilgili sinyal iletiminden sorumlu olması nedeni ile meme tümörü oluşumuna katıldığı belirtilmiştir (323). Sonuç olarak, çeşitli uyarılar ile sitoplazma da biriken β -katenin'in çekirdeğe doğru yer değiştirmesi c-myc, Siklin D1, VEGF, MMP'ler gibi meme kanserinden sorumlu tutulan çeşitli hedef genlerin transkripsiyonuna yol açarken, östrojen reseptörleri ile etkileşim halinde oldukları da vurgulanmaktadır (288).

Yukarıda narın kanser üzerine kemopreventif etkileri ile ilişkili olarak izah edilen çoğu mekanizmalar meme kanseri içinde ortaktır, bu bölümde meme kanserine daha spesifik olan yollara değinilmiştir. Ayrıca narın meme kanseri başta olmak üzere tüm bu kanserler üzerine kemopreventif ve terapötik etkileri şekil 20'de özetlenmiştir (312).

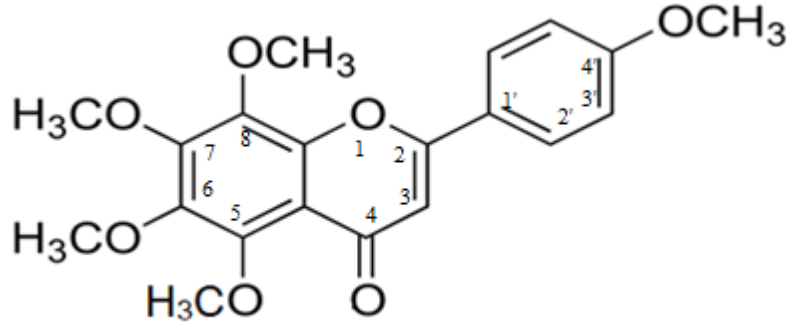


Faria ve Calhau (312), tarafından sunulan nar meyvesi ve çeşitli fraksiyonlarının kanser ve inflamatuvar sinyal yolları üzerine bazı etkileri tarafımızdan modifiye edilerek şematize edilmiştir. Şekilde, nar meyvesi ve nar meyve ekstraktlarının içermiş oldukları fitoaktif moleküller sayesinde anti-oksidan yolları aktive ettiği, anti-aromataz ve fitoöstrojenik etki göstererek memenin duktal mitotik aktivitesini inhibe ettiği, pro-apoptotik protein olan Bax ve Bak'ın indüksiyonuna, anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ve Bcl-x'in inhibisyonuna neden olarak apoptoz oluşumunu teşvik ettiği gösterilmiştir. Ayrıca NF-κB inhibisyonunu sağlayarak; invazyon, anjiyogenez ve metastaz gibi karsinogenez sürecinde etkili olan faktörleri baskıladığı gösterilmiş olup, Wnt β-katenin yolak blokajı, P21 ve p 27 gibi tümör süpresör genlerin aktivasyonlarını sağlayarak hücre çoğalmasında görevli olan siklin ve siklin bağımlı kinazların inhibe edici etkileri ve hücreyi çeşitli fazlarda bloke etmek suretiyle hücre proliferasyonunu engelleyici etkilerini de içeren narın potansiyel bir anti kanser ve anti inflamatuvar etkileri özetlenmiştir.

Şekil 20. Çeşitli Kanserler Üzerine Narın Karıştığı Bazı Moleküler Sinyal Yolları

3.4.7.2. Tangeretin'in Yapısı ve Koruyucu Etkileri

Tangeretin; mandalina, limon, portakal ve greyfrut gibi narenciyelerin (turuçgiller, *Citrus* türü) kabuklarında çok fazla miktarda bulunan 5,6,7,8,4'-pentamethoksi flavon yapısında olan bir polimetoksiflavon (PMF) bileşiğidir (Formül: $C_{20}H_{20}O_7$, Molar kütle: 372,37 g/mol, Şekil 21).



Şekil 21. Tangeretin'in Kimyasal Yapısı

Narenciye kabukları, genellikle ticari ve yan ürünler olarak kabul edilirler. Ancak bunlar mide rahatsızlığı, öksürük, deri iltihabı, kas ağrısı ve saçkıran enfeksiyonlarının giderilmesinde ve ayrıca kan basıncının düzenlenmesinde Çin başta olmak üzere dünyanın bazı bölgelerinde geleneksel Tıpta kullanılırlar (324).

Son yıllarda, PMF'lerin terapötik potansiyelini araştırmak için çok sayıda farmakolojik ve mekanik çalışma yapılmıştır (325, 326). Literatürde bugüne kadar, narenciye PMF'lerinin biyoaktiviteleri arasında; metabolik bozuklukların sağaltımı, anti-aterosklerotik, anti-diyabetik, anti-enflamatuar, nöro-protektif, anti-mikrobiyal ve anti-oksidan düzenlenmeler yer almaktadır. Ayrıca bu biyoaktif PMF'lerin özellikle kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların

tedavisinde kemopreventif ve terapötik amaçlarla kullanımları birçok çalışmaya konu olmuş ve günümüzde de büyük ilgi görmektedir (325-327).

3.4.7.2.1. Tangeretin'in Kanser Üzerine Koruyucu Etkileri

İnsan diyetinin bir parçasını oluşturan meyve ve sebzeler, düşük toksisiteye sahip olan flavonoidleri barındırmaktadır. Yapılan çalışmalarla yüksek oranda flavonoid içeren meyve ve sebze tüketiminin akciğer, kolon, yumurtalık, özofagus, meme, serviks, mesane, pankreas, karaciğer, ağız boşluğu ve midede ortaya çıkan kanser riskine karşı önemli ölçüde koruyucu olduğu gösterilmiştir. (328, 329). Çeşitli *in-vivo*, immün sistemi baskılanmış farelerde ksenogreftler olarak insan tümör hücre dizilerine karşı anti-proliferatif aktiviteleri ile anti-kanserojen ajanlar olarak iyi bir stratejik hedef olarak görülmektedir (330, 331) Tangeretin insan kanser hücresi proliferasyonunun inhibisyonunda en etkili flavonoidler arasındadır (332). Tangeretin, skuamöz hücreli karsinom (333), gliosarkom (334), lösemi (335), melanom (336), kolorektal kanser (337), mide ve akciğer karsinomundan (335), türetilen insan kanser hücre hatlarının çoğalmasını inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, farelerde ve sıçanlarda kimyasal olarak indüklenen meme (324, 338) ve kolon kanseri başta olmak üzere çeşitli tümörlerin insidansını azalttığı bildirilmiştir. Çeşitli flavonoidlerin kemopreventif ve antiproliferatif etki mekanizmaları farklılık gösterse de, *in-vivo* tümör önleyici aktiviteleri ve güvenli farmakolojik kullanım potansiyelleri bakımından benzer özellikler taşırlar (339)

PMF'lerin kanseri önleyici ve / veya antikanser aktiviteleri çeşitli kompleks mekanizmalar içermektedir. Bu mekanizmalar arasında, yapılarından dolayı doğal

antioksidan özelliğe sahip olmaları, ROS moleküllerinin yakalanması ve oluşumunun engellenmesinde çeşitli oksidan ve antioksidan enzimlerle etkileşim, anti-mutajenik ve anti-kanserojenik etki, apoptoz indüksiyonu, hücre sinyalleşmesinin modülasyonu, hücre döngüsünün inhibisyonu ve özellikle çeşitli sitostatik ve sitotoksik mekanizmalar, otofajinin modülasyonu, invazyon ve anjogenez/metastaz inhibisyonu, fitoöstrojenik etkiler sayılabilir. Ayrıca sözü edilen bu biyolojik aktivitelere ek olarak, doğal diyet flavonoidleri ksénobiyotik faz-I metabolize edici enzimlerle, özellikle sitokrom P450 CYP1 enzimleriyle etkileşimlere girerek çeşitli mekanizmalarla da anti-karsinogenik aktivite de bulunurlar (340).

Bitkisel kökenli birçok biyoaktif bileşik, serbest radikallerin oluşumu ile indüklenen biyokimyasal dengesizlikleri azaltma potansiyeline sahiptir. Bu nedenle, flavonoidler gibi doğal olarak oluşan antioksidanlar, kanserin yönetimi için normal hücrelere zarar vermeden ümit verici kemo preventif/terapötik ajanlar olarak görülmüştür (341, 342). Narenciye kabuklarının, fenolik ve flavonoid bileşiklerinden dolayı potansiyel bir doğal antioksidan oldukları bilinmektedir (343, 344). Tumbas ve ark. (345), narenciye kabuklarının oksidan ve antioksidan kapasite üzerine etkilerini göstermek için yaptıkları çalışmada çeşitli narenciye kabuklarındaki fitoaktif moleküllerin, MDA gibi LPO'nun bir göstergesi olan tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin (TBARS) kapasitelerini düşürerek LPO'nu engellediği, özellikle reaktif hidroksil radikalleri üzerinde konsantrasyona bağlı olarak, belirgin serbest radikal süpürücü aktivite gösterdikleri açıklanmıştır.

Polisiklik aromatik hidrokarbon ile *in-vivo* olarak sıçanlarda oluşturulan bir kanser modelinde, tangeretinin renal dokuları oksidatif strese karşı koruduğu kanıtlanmıştır. Dört hafta boyunca tangeretin (50 mg/kg/gün) uygulaması, lipid peroksitlerinin, enflamatuvar sitokinlerin düzeylerini önemli ölçüde azalttığı ve böbrek dokusunda enzimatik ve nonenzimatik antioksidanların düzeylerini yükselttiği bildirilmiştir. Nrf2/Keap1 sinyallerini aktive etmesi sonucu, renal dokuda antioksidan enzimlerin ekspresyonlarını artırarak kanserojen ajanın etkisinden koruduğu ifade edilmektedir (346). Ayrıca hesperidin, nobiletin ve tangeretinin *in-vitro* ortamda çeşitli antioksidan analizlerde antioksidan aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir (347).

Bazı araştırmacılara göre, PMF'lerin antioksidan kapasitelerinin özel kimyasal yapılarından kaynaklandığı öne sürülmektedir. Tangeretin gibi flavonların potansiyel antioksidan etkileri; molekülün B halkasında bulunan 2 ve 3. karbonlar arasındaki çift bağın 4-okso fonksiyonu ile konjugasyon içinde olması sonucu elektron dislokasyon özelliği taşıdığı raporlanmıştır (325).

Flavonoidler, antioksidan özellikleri ile birlikte UV ışığını absorbe etme yeteneklerinden dolayı, kemoprotektif olarak kanserojen sürecin: DNA hasarı (veya başlangıç aşamasında) , tümör büyümesi (veya promosyon aşamasında) ve istila (veya progresyon aşamasında) gibi her adımında rol oynayabilirler. Ultraviyole ışığın emiliminden dolayı flavonoidler DNA'yı hasara karşı koruyabilir. Bu etki, bitki flavonoidlere atfedilen fizyolojik fonksiyonlardan birisidir (348). Ancak hayvan hücreleri, özellikle de memeliler için bu özellik genelleştirilebilir. UV-B ışığı ile ışınlanan şablon plazmid DNA'sındaki son deneyler, UV-kaynaklı DNA hasarına karşı naringenin ve rutin koruyucu

etkisini göstermiştir (349). Bu çalışmaya paralel olarak, flavonoidler, DNA mutasyonlarını teşvik edebilen serbest radikalleri elimine edebilirler. Flavonoidlerin direkt veya endojen enzim aracılı bir şekilde bu radikal süpürme kabiliyeti sayesinde, tüm vücutları x-ışınına maruz bırakılmış farelerde koruyucu etki sağlamıştır (350, 351).

Çoğu kanser türünün, en azından kısmen sigara veya benzeri kirleticiler gibi çevresel kimyasallara maruz kalmasından kaynaklandığı iyi bilinmektedir. PMF'ler DNA'yı ultraviyole ışığı absorbe etme yetenekleri ile koruyabilmenin yanı sıra, benzo [a] piren (BaP) ile poliaromatik hidrokarbonlar gibi çevresel kimyasalların biyoaktivasyonunu da baskılayabilir (352, 353).

DNA onarımı veya hücre döngüsü kontrol noktasında bulunan genlerdeki mutasyonlar, genomik instabilite ile sonuçlanır ve sırayla tümör oluşumuna yol açabilmektedir. Yapılan bir çalışma, tangeretinin, DNA çift iplikli kırılma onarımı yeteneğine sahip olmayan kanser hücreleri üzerindeki baskıyı ortadan kaldırdığını göstermiştir. Tangeretinin bir DNA tamir geni olan SGS1 geni eksik olan maya hücrelerinde DNA hasarını artırdığı ve bunun sonucu olarak hücre ölümünü indükleyerek mutasyonların neden olduğu kanseri önlediği gösterilmiştir (325, 351).

Karsinogenez, kısaca kanserin başlatılması ve teşvik edilmesi sürecidir. İlgili süreçler; genetik faktörler, çevresel maruziyet, yaş ve diğerlerinden etkilenen kompleks bir seri nedenlerle ilişkilendirilmektedir. Kanser hücrelerinin başlaması ve gelişmesi için, kendi büyümelerini teşvik edebilmeleri, yeterli faktörleri toplayabilmeleri ve eliminasyon mekanizmalarından kaçınabilmeleri gerekmektedir. Kemopreventif ajanlar, karsinogenez önleyebilen, yavaşlatabilen

veya durdurabilen bileşikler olarak tanımlanmaktadır (354). *In-vivo* gerçekleştirilmiş bir çalışmada, turunçgil ailesinin kabuklarından elde edilen etanolik ekstraktın c-myc onkogeninin ekspresyonunu baskıladığı ve ekstrenin 500 mg/kg vücut ağırlığı dozunun, DMBA ile indüklenmiş sıçanlarda hepatik karsinogenez süresince N-Ras onkogenini eksprese eden hücre sayısını azaltabileceği ifade edilmiştir (355). Ayrıca Murakami ve ark. (356), tarafından yapılan başka bir çalışmada da, bu fito ajanların içermiş olduğu flavonoidlerin bu antikanser etkileri DMBA ile oluşturulmuş cilt kanseri üzerinde de ortaya konularak flavonoidlerin kanserde bazı onkogen ekspresyonlarını inhibe etmek koşulu ile karsinogenez sürecini suprese ettiklerine dair bulgular kayıtlara geçmiştir.

Daha sonra yapılan *in-silico* çalışmalarda ise, turunçgil kabuklarında bulunan iki flavonoid olan nobiletin ve tangeretin biyoaktivite ve anti-kanserojen özelliklerine yer verildiği gözlenmiştir (357). Nitekim bu çalışmalarda bu iki turunçgil flavonoidlerinin ATP ve imatinib'e göre c-Src onkogenine daha yüksek bağlanma özellikleri ortaya konulmuş olup bu sayede anti-kanser aktivitelerini gösterdikleri düşünülmektedir (355).

Ayrıca yapılan bazı araştırmalarda ise bu flavonoidlerin Faz-I CYP1A2 enzimi üzerinde moleküler kenetlenme etkisi göstererek, prokarsinojenik maddelerin aktivitesinde görevli olan sitokrom P-450 izoenziminin inhibisyonuna ve kanserin başlangıç evresinde supresyonuna neden oldukları bildirilmektedir (358).

Çeşitli sitokinler tarafından düzenlenen ve aracılık edilen kronik enflamatuvar yolların sürekli aktif olmasının, dokularda kanserin başlamasının

ve gelişiminin habercisi olduğuna dair kanıtlar vardır. Bu inflamatuvar yollardaki proteinlerin üretim düzeylerindeki herhangi bir dengesizlikte, tümör invazyonu ve metastazına neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, kanser kemoflaksisinde bu yolların bastırılması önemli hedeflerden biridir (359). Flavonoidlerin inflamasyon-kanser gelişimi yollarında hangi parametrelerle nasıl etki gösterdiklerini, literatürde de sıklıkla konu bulmuş kolitis ile kolon kanseri örneklerinden daha iyi anlaşılabilir.

Azoksimetan/Dekstran Sülfat Sodyum ile muamele edilmiş bir *in-vivo* çalışmada (325), farelerde kolitis ile ilişkili kolon karsinogenez modeli oluşturulmuş, çeşitli PMF'lerin diyetle uygulanması sonucu, inflamatuvar faktörler, Siklin D1 ve VEGF düzeylerini azalttığı bildirilmiştir.

Ayrıca çeşitli flavonoidlerle yapılan başka çalışmalarda, diyetle bulunan flavonoidlere yanıt olarak iNOS ve COX-2' düzeylerindeki düşme, flavonoidlerin kolon kanserli hücrelerde düşük proliferasyon ve daha yüksek apoptoz düzeylerine neden olduğu bildirilirken bunların sonucunda yüksek çokluklu anormal kript odaklarını baskıladığını ortaya koymuştur (360, 361). Tüm bu örnekler, narenciye flavonoidlerinin kolon karsinogenezinin başlangıç ve büyüme aşamasında kemo-önleyici maddeler olarak hareket edebileceği hipotezini güçlendirmektedir.

Lakshmi ve ark. (346), sıçanlar üzerinde DMBA ile oluşturdukları meme kanser modelinde, tangeretinin proinflamasyon ve inflamatuvar yanıt elemanları üzerinden böbrek dokusunda koruyucu etkiler oluşturduğu rapor edilmiştir. Bu etkileri de böbrek hasarı sonrası inflamasyonda kilit düzenleyicilerinden biri olan NF- κ B 'nin aktivitesini inhibe ederek, NF- κ B aracılı TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi

proinflatuar sitokinlerin ve iNOS, COX-2 gibi inflamatuvar mediatörlerin genlerini düzenlenmesini down regüle etmek koşulu ile meme kanserogenez sürecinde böbrek hasarının gelişimi ve ilerlemesini engellediği bildirilmiştir.

Tüm bu mekanizmaların dışında kanserogenezin promosyon evresinde, diyet flavonoidlerinin koruyucu etkilerinin gözlenilmesinin merkezinde, hücre proliferasyonunu inhibe etme kabiliyetleri yatmaktadır. Turunçgil PMF'lerinin, anormal çoğalan hücreler üzerine, apoptozu aktive etmek için çok sayıda sinyal iletim yolunu etkileyerek veya anahtar sinyal proteinlerini modüle ederek proliferatif etkiyi inhibe edebildiği, hatta tersine çevirebileceği keşfedilmiştir. Tangeretinin, meme kanseri, kolorektal karsinomu, akciğer karsinomu, mide kanseri, insan glioblastoma hücreleri ve aynı zamanda insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücre hattında geniş antiproliferasyon aktiviteler gösterdiği bulunmuştur (325).

Karsinogenez sürecinde hücre döngüsü arresti, antiproliferasyonun birincil mekanizması olarak görülürken bunun yanında apoptotik, sitotoksik ve sitostatik etkiler ile sıkı bir ilişki içerisinde. Yapılan çalışmalarla hem tangeretinin hem de nobiletinin, mitoz interfazında hücre döngüsü ilerlemesini bloke etme eğiliminde oldukları vurgulanmış, ancak farklı hücre hatları ve farklı kanser tiplerinde, bu naturel bileşiklere karşı farklı tepki gösterdikleri de raporlanmıştır (362-366).

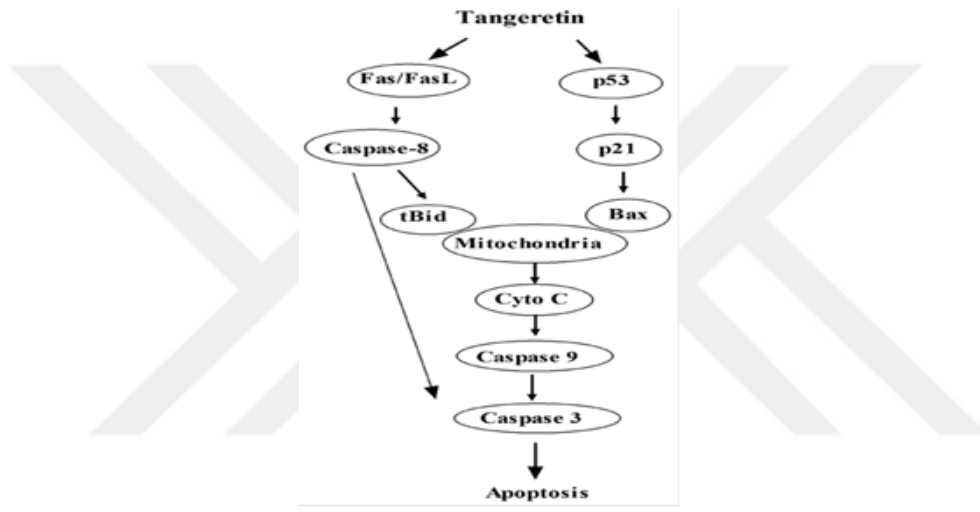
PMF'larla ilişkili başka bir anti-kanser yaklaşım, hücrelerin apoptozisinin teşvik edilmesidir. Çeşitli *in-vitro* ve *in-vivo* kanser çalışmaları tangeretin gibi PMF'ların kanser üzerine olan anti-proliferatif etkilerini, onların doğal bir apoptotik ajan olmalarına dayandırmaktadır. Ancak bazı araştırmacılar (325)

tangeretinin kanserli hücreleri apopitozise yönlendirmesini farklı etki mekanizmaları ile açıklamaktadır. Yapılan bir çalışmada tangeretin Siklin D1 ve cdk genlerini modüle ederek G2 / M fazında hücre arrestine neden olduğu ve fosfataz ve tensin homolog (PTEN) proteinini modüle ederek glioma hücrelerinde apopitozisi indüklediği, buna mukabil insan meningiom hücrelerinde ise bu bileşiğin GSK3- β fosforilasyonu sonucu Wnt/ β -katenin yolağının inhibisyonunu düzenleyerek, apopitozise neden olduğu ifade edilmektedir (367-369). Ayrıca tangeretin HL-60 insan promyelositik lösemi hücreleri üzerinde apopitozisi indüklemiştir (370).

Bir başka *in-vitro* çalışmada (371) içlerinde tangeretininde olduğu PMF'lerin çeşitli kloroformlu fraksiyon ekstraktları, HeLa hücre hattındaki hücrelerinin hayatta kalma oranını güçlü bir şekilde azalttığı gözlenmiştir ve IC50 (Tam İnhibisyon için Gerekli Konsantrasyonun Yarıısı) değeri olarak 56.54 $\mu\text{g} / \text{mL}$ bildirilmektedir. Kloroform fraksiyon ekstraktındaki PMF'ler, anti-apopitotik Bcl-2 protein ekspresyonunun aşağı regülasyonunu indükleyerek, kaspazların proteolitik aktivasyonuna ve polimeraz proteininin bozunmasına yol açtığı izlenmektedir.

Tangeretinin apopitotik etkilerini ortaya koyan bir çalışmanın bulguları, p53-bağımlı mitokondriyal disfonksiyonu yukarı regüle ederek ve tangeretinin etkisiyle intrensek apopitotik yolak göstergeleri olan p53, Bax ve kaspaz-9 proteini dahil olmak üzere pro-apopitotik proteinlerin ekspresyonlarında artış olduğu ayrıca ölüm reseptörleri (Fas/FasL), kaspaz-8, Bid ve tBid proteinlerinin ekspresyonlarında da artış sonucu ektrinsek apopitotik yolağı da indükleyebildiği, tümör hücre proliferasyonunu ciddi olarak suprese ettiği Şekil

22’de açıklanmıştır. Ayrıca çalışmada bir p53 inhibitörünün (PFT- α), tangeretin ile muamele edilmiş AGS hücrelerinde apopitoz oranı üzerindeki etkisi gözlemlenmiştir. Sonuçlar PFT- α ’nın tangeretin ile tedavi edilen AGS hücrelerindeki artmış apopitotik protein ekspresyonlarını azalttığını ve böylece tangeretin ile uyarılan apopitozun p53’e bağımlı olduğunu ortaya koymuştur (372).



Şekil 22. Tangeretin’in İnsan Gastrik Kanseri Hücre Hattı Üzerine Apoptoz Yolağı (372)

İn-vitro gözlemlenen tüm bu biyolojik aktiviteler daha sonra *in-vivo* çalışmalarla takip edilmiş ve narenciye meyvelerinin etanollü ekstresi, sıçanların meme ve karaciğer kanserogenez modelinde doza bağımlı bir şekilde antiproliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir (373, 374).

Kanser hücreleri anjiyogenezi uyarabilir. Anjiyogenez, hücrelerin besin ve oksijen ihtiyacını karşılamak için kanser dokusu etrafındaki yeni kan damarlarının büyümesidir. Kanser hücreleri büyümek için gereksinimlerini sağlıklı hücrelerden

karşılayabilirlerse, kolayca diğer dokuları istila edebilir. Ayrıca kanser hücrelerinin istila edip diğer dokulara yayılma kabiliyeti kan damarları aracılığıyla gerçekleşirken, lenf damarları da metastaz aşamasına müdahil olmaktadır (375). Dolayısıyla kanserde anjiyogenezin ve metastazın inhibisyonu gerek rekürrenslerin önlenmesinde gerekse farklı dokulara olan invazyonların engellenmesinde iyi bir straji olarak görülmektedir (373). Literatürde narenciye flavonoidlerinin kanserde anjiyogenezi inhibe ettiklerine dair bulgular ve mekanizmaların kısıtlı olduğu görülmektedir.

İn-vitro olarak 2008 yılında yapılmış bir çalışmada, narenciye ekstresinin WiDr kolorektal kanser hücrelerinde VEGF ekspresyonunu artırarak anjiyogenik aktiviteye sahip olduğu iddia edilmiştir (376). Başka çalışmalar ise, narenciye ekstraktının bFGF'nin neden olduğu tavuk CAM embriyonunun, hem kan hem de makroskobik olarak yeni kan damarları oluşumunu inhibe ettiği ve anti-anjiyogenik etkisinin olduğunu vurgulamaktadır (377).

Son zamanlarda yapılan *in-vitro* çalışmalarla (373, 378, 362), nobiletinin, anjiyogenez araçları, Akt, HIF-1 α , NF- κ B ve VEGF inhibisyonu yolu ile tümör büyümesini ve ovarian kanserlerin anjiyogenezini inhibe ettiği bildirilmiştir. Yine yakın zamanda Lien ve ark. (362) tarafından yapılan çalışmada ise; nobiletinin U87 glioma hücrelerinde p38, MAPK ve JNK fosforilasyonunu inhibe ederek anti-anjiyogenik aktivite gösterdiği ifade edilmiştir.

MMP'ların aşırı ekspresyonunun, kanser hücresi invazyonu ve metastaz ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır. Özellikle insan mide adenokarsinom AGS hücreleri, insan nazofaringeal karsinoma hücreleri ve kolorektal kanser hücre

hatlarında *in-vitro* olarak MMP-1, MMP-9 ve MMP-7 ekspresyonlarını azalttığı ve MMP'lerin doku inhibitörlerinin düzeylerini artırdığı bildirilirken, PMF'lerin bu etkilerini özellikle fokal adezyon kinaz ve fosfotidilinozitol-3-kinaz/Akt yollarını inhibite ederek gerçekleştiği bildirilmektedir (379, 380). Ayrıca PMF'lerin doza bağımlı olarak (300 mg/kg, ip) uygulanması, ksenograft farelerde tümör oluşumunu ve tümör metastazını etkin bir şekilde baskıladığı ve izole tümörlerdeki NF-κB düzeylerini düşürdüğü bildirilerek PMF'lerin kanser hücreleri üzerine olan anti-invazyon ve anti migrasyon etkileri desteklenmiştir.

Tüm bunların dışında hem nobiletin hem de tangeretin, insan meme ve kolon kanseri hücrelerinde sitotoksiteye neden olmadan proliferasyonun önüne geçebildiklerini ifade eden yeni çalışmalar da bulunmaktadır (325).

3.3.7.2.2. Tangeretin'in Meme Kanseri ile İlişki

Östrojenler, meme kanseri etiolojisinde rol oynamaktadır ve bilinen insan karsinogenleri listesine eklenmiştir. Östrojenlerin, hücre büyümesini ve reseptör aracılı süreçler ve genotoksik metabolitleri yoluyla proliferasyonu uyarak meme kanserine neden olduğu öne sürülmüştür. Bazı sentetik kimyasal bileşikler ve nükleer reseptör ligandlarının, tümöre özgü ER'lerinin ve aromataz promotörlerinin aktivitesini inhibe ettiği bilinmesine rağmen, yan etkileri olmayan daha spesifik ve etkili fitoterapi ajanlarının daha fazla araştırılması ve geliştirilmesi gerektiği kanaatini hala geçerli kılmaktadır. Bu nedenle fitoöstrojenlerle östrojen üretiminin/etkisinin önlenmesi günümüzde meme kanseri tedavisi için yaygın bir uygulama haline gelmiştir. Flavonoidlerin ya da izoflavonoidlerin östrojen etkisini inhibe etmeye yönelik etki mekanizmaları

arasında; ER spesifik ligandına bağlamayı yarışmalı olarak bloke etmek, zayıf östrojenik etki göstermek ve aromataz gen ekspresyonunu veya enzim aktivitelerini değiştirerek östrojen üretimini bozmak sayılabilir (381, 382). Totta ve ark. tarafından yapılan çalışmada (383); üç farklı ER + kanser hatları üzerinde, Naringenin ER α + hücrelerine karşı antiöstrojenik aktivite gösterdiğini ve bunun sonucunda hücre proliferasyonunda suprese edildiğini bildirirken, MDA-MB-435 hücrelerinde de bu etkilerin olduğu farklı araştırmacılar tarafından kaydedilmiştir (325). Ancak literatürde meme kansinomlarının önlenmesi noktasında, tangeretin ile ER'lerinin ilişkisini gösteren yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu yönü ile bizim çalışmamızda ER'ni incelememiz içinde ayrı bir sebep teşkil etmiştir.

Tangeretin gibi bitki kökenli birçok biyoaktif bileşenin, meme kanserinden korunmada güçlü antioksidan ve antikanserojen özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir. Son zamanlarda yapılan *in-vivo* meme kanser çalışmaları, tangeretinin ve çeşitli flavonoidlerin meme kanseri üzerine kemopreventif etkilerini onların antioksidan özelliklerine dayandırmaktadır. Nitekim DMBA ile indüklenmiş meme karsinogenezinde, peroksidasyon sonucu, sıçanların plazma ve tümörlü meme dokularında meydana gelen artmış dien konjugat düzeyleri ve artmış TBARS düzeylerine karşılık, biyokanin A uygulanmasının anti-lipoperoksidatif özelliğinin bir göstergesi olarak lipid peroksidasyon durumunu önemli ölçüde azaltarak oluşan meme kanserini suprese ettiği bildirilmiştir (384).

Yine sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen başka bir meme kanseri modelinde, tangeretin ile tedavi edilmiş sıçanlarda, tümör kaynaklı serum ve meme dokusunda oluşan ROS'ların düzeylerinin azaldığı, SOD, CAT, GPx gibi

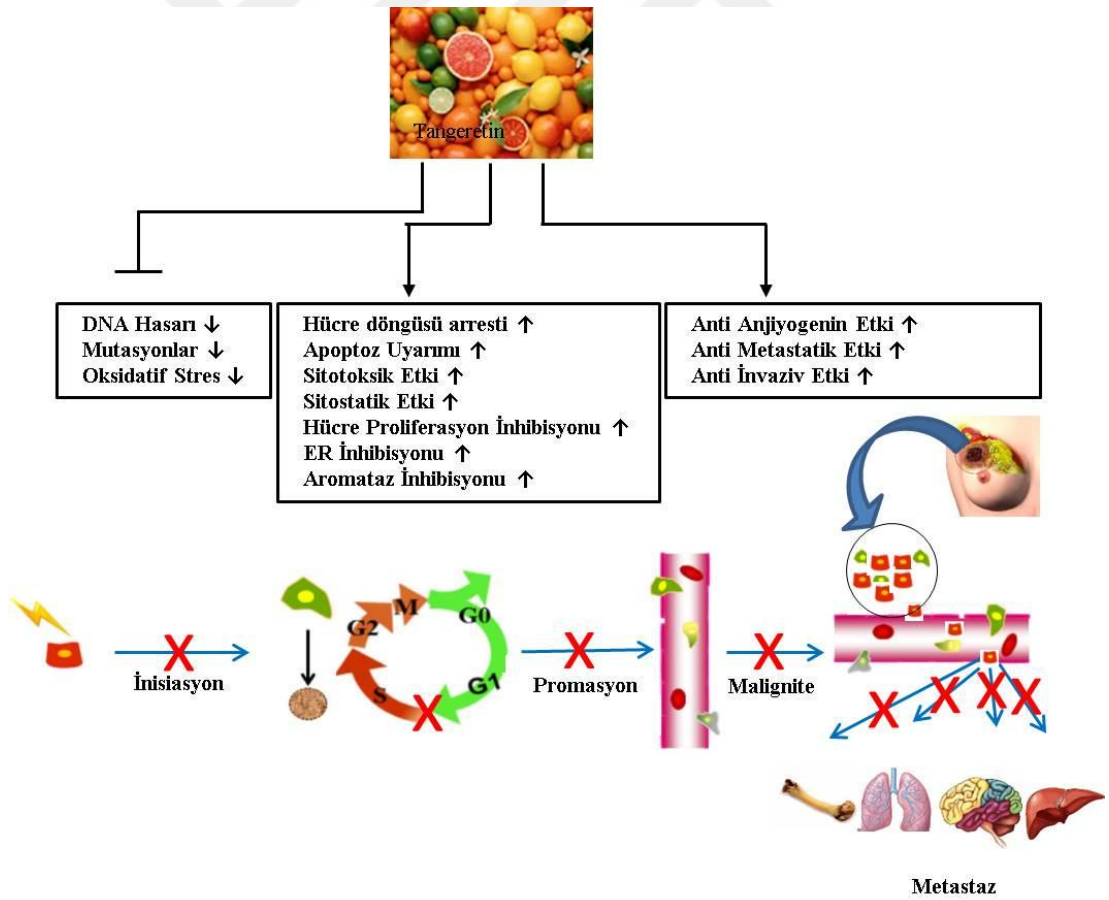
antioksidan enzimlerin aktivitesinin arttığı aynı zamanda C ve E vitamin düzeyleri ile birlikte GSH gibi non enzimatik antioksidanların da düzeylerinde önemli artışlar izlendiği bildirilmiştir. Tangeretinin bu antioksidan özellikleri sayesinde memedeki neoplastik oluşumların başlaması ve ilerlemesini önleyebileceği vurgulanmıştır (338).

Meme kanseri, regüle edilmemiş hücre büyümesi ve metastaz ile karakterize bir süreci içermektedir. Bu sürecin yönetiminde çeşitli flavonoidlerin (naringin, hesperidin, naringenin, hesperitin, rutin, nobiletin, tangeretin) anti-kanser özelliklerinden faydalandığı çalışmalarla ortaya konulmuştur. Örneğin dışı *Sprague Dawley* ırkı sıçanlar üzerinde DMBA ile indüklenen meme kanser modelinde, bu flavonoidlerin apoptozu indüklemek ve hücre proliferasyonunu inhibe etmek sureti ile meme kanserini süprese ettikleri gösterilmiştir (373). Yapılan *in-vivo* başka çalışmalarda da; Tangeretin'in MMP-2, MMP-9 ve VEGF ekspresyonlarını downregüle ederek, p53/p21 ekspresyonlarını da upregüle etmek koşulu ile metastaz inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonunda rol oynadığı, ayrıca PCNA, COX-2 ve Ki-67 gibi tümör hücresi proliferasyon belirteçlerini etkili bir şekilde azaltarak sıçanlarda DMBA ile indüklenen meme karsinogenezi oluşumunu ve proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (338, 364).

MCF-7 hücreleri ile yapılan bir *in-vitro* meme kanseri çalışmasında (385), hesperetinin CDK2, CDK4 ve Cyclin D'nin ekspresyonunu inhibe ederek G1 fazında hücre arresti yoluyla MCF-7 hücreleri üzerine anti-kanser aktivitesi gösterdiği ve proliferasyonun bastırılması tümör süpresörlerinin ekspresyonlarındaki artışıyla (özellikle p21 artışı) ilişkilendirildiği bildirilmektedir.

Morley ve ark. (339), tarafından, meme kanseri hücre hattında gerçekleştirdikleri çalışmada, bu bulgulara ek ve farklı olarak MCF-7 hücreleri üzerine, 4 günlük tangeretin tedavisi ardından kanserli hücrelerde G1 faz arresti gözlemleyerek bu hücrelerde proliferasyonu yüksek oranda suprese ettiği, fakat bu hücreleri ölüme teşvik etmediği yani apoptoza yönlendirmediği açıklanmıştır.

Tangeretin'in kanser üzerine kemopreventif etkileri ile ilişkili olarak izah edilen çoğu mekanizmalar meme kanseri içinde ortaktır, ayrıca narın meme kanseri başta olmak üzere tüm bu kanserler üzerine kemopreventif ve terapötik etkileri Şekil 23'de özetlenmiştir.



Şekil 23. Tangeretin'in Anti-Kanser Mekanizmaları (325)

3.4.8. Kimyasal Karsinojenler ve Deneysel Kanser Modeli

3.4.8.1. Deneysel Meme Kanseri Modeli

Deneysel kanser oluşturma modeli ile ilgili araştırmalar 300 yıl öncesine dayanır. Bu süreç içinde özellikle kimyasal karsinojenler aracılığı ile spontan veya transplante edilebilen tümörlerin kullanılması daha ön plana çıkmaktadır (386).

Deneysel olarak bir kanser modeli oluşturmada, tümörün biyolojik özelliklerini ve uygulanacak ilaçların sitotoksisitelerini bilmek ne kadar önemliyse, oluşturulacak tümöre uygun deney hayvanı seçiminin bilinmesi de o kadar değerli ve önemlidir. Ayrıca arzu edilen tümör oluşumunu yakamak için kullanılacak olan karsinojenin; dozu, uygulama şekli (zamanı ve sıklığı) kullanılacak olan hayvanın; türü, cinsi, soyu, yaşı, ağırlığı ve cinsiyeti gibi genetik ve fenotipik özelliklerinin deneysel kanser protokolüne başlamadan belirlenmesi esastır (93).

Deneysel hayvan model çalışmaları, araştırmacılara kanserin başlaması, ilerlemesi ve diğer çok adımlı ve karmaşık karsinogenez süreçleri hakkında birçok faydalı bilgi sunmaya hizmet etmektedir. Sıçanlarda meme kanser modeli, bazı türlerde çeşitli karsinojenlerle spontan meme neoplazilerinin oluştuğunun farkına varılması ile ortaya çıkmıştır (387). Sıçanlarda meme tümörleri virüs enfeksiyonları, radyasyon ve genotoksik karsinojenlerle deneysel olarak indüklenebilmektedir (388).

Literatürde, deneysel olarak oluşturulan sıçan meme kanser modellerinde; 7,12-dimetilbenz [a] antrasen (DMBA) başta olmak üzere 1,2,5,6-dibenzantrasen (DBA), 3,4-benzopren, 3-metilkolantren (MCA), 2-asetilaminofluoren,

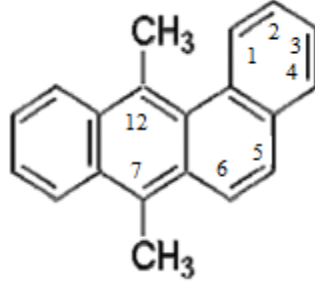
etilnitrosoüre, butilnitrosoüre ve N-methyl-N-nitrosoürea (MNU) gibi karsinojen ajanlar yaygın olarak kullanılmış olup, bunların içinden DMBA ve MNU meme karsinojen modeli oluşturmak için kullanılan en sık iki ajan olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca sıçanlarda DMBA ve MNU tarafından indüklenen meme karsinomlarının çoğu, hormon bağımlı olduğu bildirilmektedir. Bu ajanlar özellikle sağlam bir endokrin sisteme sahip olan genç bakire dişi sıçanlara uygulandığında, maksimum tümör insidansı gözlemlendiği raporlanmıştır (387). Çeşitli araştırmacılar sıçanlarda, agresif tümörlerin oluşumu için DMBA gibi polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH)'ların kullanımını işaret etmektedir. Ayrıca, bu ajanlarla farklı dozlarda ve uygulama şekli ile deri ve akciğer gibi çeşitli tümörleri oluşmakta mümkündür (389, 390).

3.4.8.2. DMBA ve Etki Mekanizması

PAH'lar potent karsinojen ve mutajen ajanlar olarak bilinmektedir, karbon içeren bileşiklerin eksik yanması sırasında üretilen ve ağırlıklı olarak tütün dumanı, motorlu taşıt egzoz emisyonları, yağ fırınları ve tam yanmamış kömür dumanında bulunan DMBA bir PAH türevidir ve sentetik yollarla da oluşturulabilir (391). DMBA yapısında, 7. ve 12. karbonda metilen grupları taşıyan 4 benzen halkasından oluşur (Şekil 24). Ayrıca oda sıcaklığında katı olmakla birlikte, suda ki çözünürlüğü düşüktür (392). Kimyasal ajanlar organizma üzerine karsinojenik ve mutajenik etkilerini 2 farklı mekanizma ile yürütürler.

Kimyasal ajan organizmada herhangi bir aktivasyona uğramadan direkt DNA ile reaksiyona girebilir (MNU gibi) ya da DMBA gibi organizmada önce enzimatik yolla aktif ara bileşiklerine dönmek koşulu ile, meydana gelen bu aktif

ara metabolitlerinin çeşitli makromoleküllerle reaksiyona girmesi sonucu karsinojenik ve mutajenik etkilerini indirekt olarak yürütebilirler (394).



Molekül Formülü : C₂₀H₁₆

Molar kütlesi : 256.34

Erime Sıcaklığı : 122-123 °C

Şekil 24. DMBA'nın Moleküler Yapısı (393)

Bir PAH olan DMBA organizmadaki karsinojen etkilerini 2 şekilde göstermektedir. İlk olarak DMBA'nın organizmaya alınması sonucu, sitokrom P450 enzim sistemindeki (mikrozomal enzimler, CYP) monooksijenazlar ve epoksit hidrolazlar (faz-I enzimleri) tarafından hepatik ve ekstrahepatik dokularda yüksek oranda reaktif PAH özellikle olan diol-epoksitlere metabolize olur ve ardından CYP izoformları CYP1A1 ve CYP1B1 enzimleri (faz-I enzimleri) ile daha fazla epoksidasyon gerçekleştirir. Nihai en elektrofilik ve karsinojenik ajan olan metaboliti DMBA-3,4-dihidro-diol-1,2-epoksiti 'i oluşturur. Bu metabolitler, DMBA ile indüklenen memedeki karsinogenez ve mutageniz süreçleri ile sonuçlanan PAH-DNA eklentilerini oluşturmak için DNA'daki adenin kalıntılarını hedef alarak kovalent olarak bağlanır (395-397).

Ayrıca çeşitli çalışmalar, DMBA'nın mikrozomal enzimler tarafından okside edilmesi sırasında, çeşitli reaktif metabolik ara ürünlerin (peroksitler ve

süperoksit anyonları) açığa çıkması sonucu, bir yandan da oksidatif stres üzerinden, tek ve çift iplikli DNA kopmalarını indükler ve karsinogenez oluşumuna katıldığını da göstermiştir (346, 398)

DMBA'nın, tümör oluşumu için metabolik aktivasyona gereksinim duyması anti-karsinojenik ajanların etkilerini değerlendirmede, tümörün başlangıç ve ilerleme dönemlerindeki metabolizma ve aktivasyonunu gözlemede kullanışlı bir modeldir. Ayrıca DMBA ile oluşturulan meme kanser modellerinin çoğunu adenokarsinomlar oluşturmaktadır (386, 387).

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Gereç

4.1.1. Hayvan Materyali ve Deney Grupları

Çalışma sırasında, hayvan materyalinin seçiminden, deneysel aşamanın sonlandırılmasına kadar gerçekleştirilen tüm uygulamalar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM)'nde standart deneysel uygulamalar etik kurallarına uygun olarak ve Fırat Üniversitesi Hayvan deneyleri yerel etik kurulu onayı (Toplantı Tarihi: 06.04.2016, Toplantı Sayısı: 2016/07, Karar No: 73, Protokol No: 2016/48) alınarak, yapıldı.

Araştırma süresince hayvanların beslenmesi, standart 8mm'lik pellet yem (Korkutelim Yem Gıda San. Tic. A.Ş., Antalya, Türkiye) ve çeşme suyu ile add-libitum olarak sağlandı (Tablo 6).

Tablo 6. Hayvanlara Verilen Pellet Yemin İçeriği

Yemde Bulunan Temel Besin Maddeleri	Yüzde Oranları
Ham protein	% 24,00
Ham yağ	% 3,29
Ham selüloz (en çok)	% 6,09
Ham kül (en çok)	% 6,48
Methiyonin	% 6,09
Lizin	% 1,32
Na	% 0,05
Ca	% 0,87
P	% 0,98

Hayvanların günlük olarak altları temizlenerek bakımları yapıldı. Deney öncesi ve deney sırasında tüm hayvanlar 12 saat ışık, 12 saat karanlık fotoperiyodunda ve 22±2°C sabit ısıda otomatik olarak klimatize edilen odalarda hayvanlar için hazırlanmış özel kafeslerde 5'erli ve 3'erli gruplar halinde barındırıldı.

Çalışmada; 8-10 haftalık, 205-220 g ağırlığında, *Sprague Dawley* cinsi, dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar homojen olarak, rastgele 8 gruba ayrıldı. DMBA içeren 4 grupta; ölümlerin meydana gelebileceğini tahmin ederek çalışmanın yarıda kalmaması adına her bir grup için 10'ar, diğer 4 grubun her birinde ise; 7'şer adet olmak üzere toplam 68 adet sıçan kullanılarak çalışmaya başlanılmış sonrasında ise gavaja ve de DMBA uygulamalarına bağlı olarak bazı hayvanlar ölmüş ve çalışmaya toplam 56 hayvan üzerinden devam edilmiştir.

Çalışmada oluşturulan deney grupları aşağıda ki gibi detaylandırılmıştır;

Kontrol grubu (K, Grup 1), (n= 7): Çalışma başlangıcının 15. gününde, 1 mL zeytinyağı, gavaj yoluyla, sadece bir kez uygulandı (Çalışma sırasında bu gruptaki hayvanlardan herhangi bir kayıp yaşanmamıştır).

Pomegranat grubu (P, Grup 2), (n=7): Çalışmanın başlangıcından itibaren 30. güne kadar, Pomegranat (5 g/kg dozda, 1 mL DMSO [Dimetil sülfoksit] içinde, gavaj yoluyla, günde bir kez) ve 15.günde bir kez (1mL zeytinyağı, gavaj yoluyla) uygulandı (288).

Tangeretin grubu (T, Grup 3), (n=7): Çalışmanın başlangıcından itibaren 30. güne kadar, Tangeretin (50 mg/kg dozda, 1mL DMSO içinde, gavaj

yoluyla, günde bir kez) ve 15.günde bir kez (1 mL zeytinyağı, gavaj yoluyla) uygulandı (338).

Pomegranat+Tangeretin grubu (P+T, Grup 4), (n=6): Çalışmanın başlangıcından itibaren 30.güne kadar, Pomegranat (5 g/kg) ve Tangeretin (50 mg/kg) dozda birlikte 1 mL DMSO içinde, gavaj yoluyla, günde bir kez) ve 15.günde bir kez (1 mL zeytinyağı, gavaj yoluyla) uygulandı. (Çalışmanın ilk haftasında bu grupta 1 hayvan asfeksiden ölmüştür ve çalışmaya 6 adet hayvanla devam etmek zorunda kalınmıştır).

DMBA grubu/Kanser grubu (D, Grup 5), (n=7): Çalışma başlangıcının 15. gününde, DMBA (1 mL zeytinyağı içinde 60 mg/kg dozda, gavaj yoluyla, tek doz) uygulandı (288, 324). (DMBA uygulamasına bağlı olarak, bu grupta 3 hayvan ölmüştür ve çalışmaya 7 adet hayvanla devam etmek zorunda kalınmıştır).

DMBA+Pomegranat grubu (D+P, Grup 6), (n=8): Çalışmanın başlangıcından itibaren 30. güne kadar, Pomegranat (5 g/kg dozda, 1 mL DMSO içinde gavaj yoluyla, günde bir kez) uygulandı ve çalışma başlangıcının 15. gününde DMBA (1 mL zeytinyağı içinde 60 mg/kg dozda gavaj yoluyla, tek doz) uygulandı (288). (DMBA uygulamasına bağlı olarak, bu grupta 2 hayvan ölmüştür ve çalışmaya 8 adet hayvanla devam etmek zorunda kalınmıştır).

DMBA+Tangeretin grubu (D+T, Grup 7), (n=7): Çalışmanın başlangıcından itibaren 30. güne kadar, Tangeretin (50 mg/kg dozda, 1mL DMSO içinde, gavaj yoluyla) uygulandı ve çalışma başlangıcının 15.gününde DMBA (1 mL zeytinyağı içinde 60 mg/kg dozda gavaj yoluyla, tek doz) uygulandı (324).

(DMBA uygulamasına bağılı olarak, bu grupta 3 hayvan ölmüştür ve çalışmaya 7 adet hayvanla devam etmek zorunda kalınmıştır).

DMBA+Pomegranat+Tangeretin grubu (D+P+T, Grup 8), (n=7):

Çalışmanın başlangıcından itibaren 30.güne kadar, Pomegranat (5 g/kg) ve Tangeretin (50 mg/kg) dozda birlikte, 1mL DMSO içinde, gavaj yoluyla, günde bir kez) uygulandı ve çalışma başlangıcının 15.gününde DMBA (1 mL zeytinyağı içinde 60 mg/kg dozda gavaj yoluyla, tek doz) uygulandı. (DMBA uygulamasına bağılı olarak, bu grupta 3 hayvan ölmüştür ve çalışmaya 7 adet hayvanla devam etmek zorunda kalınmıştır)

Deneye başlanmadan önce, deney süresince haftada bir kez ve deney bitiminde hayvanlar kesilmeden önce olmak üzere gruplardaki hayvanların vücut ağırlıkları ölçüldü ve gruplar arası günlük büyüme oranları Güngör ve ark. (399), tarafından belirtilen hesaplama ile ortaya konuldu. Hayvanlar günlük olarak inspeksiyonla takip edilerek genel durumları kontrol edildi.

4.1.2. DMBA İle İndüklenmiş Meme Kanseri Protokolünün Oluşturulması

DMBA kullanılarak, özellikle *Sprague-Dawley* türü sıçanlarda tek doz uygulama ile meme bezine spesifik tümörler oluşturulmaktadır. Literatürde, hayvan başına 12-80 mg arasında DMBA'nın, susam yağı ya da zeytin yağı içinde çözülerek; oral, gavaj, intraperitoneal (ip) ya da meme içi olarak uygulanması ile 8-10 haftalık dişi sıçanlarda 3-4 aylık zaman zarfından itibaren meme tümörü geliştiği gözlenmiştir (386, 387).

Ayrıca yakın zamanda yapılan çeşitli deneysel olarak indüklenmiş meme kanser model çalışmalarında, sırası ile tek doz 25 mg/kg (338), 50 mg/kg (288, 338) ve 80 mg/kg (324) canlı ağırlık dozunda DMBA'nın gavaj yolu ile sıçanlara uygulanmasını müteakip yaklaşık 13, 16 ve 12 hafta sonra meme kanserinin indüklendiği bildirilmiştir.

Tüm bu bilgilerin doğrultusunda, çalışmamızda DMBA ile *in-vivo* meme kanseri oluşturma protokolü şu şekilde belirlenmiştir; sıçanlara, tek doz oral gavaj yolu ile 60 mg/kg canlı ağırlık dozunda DMBA uygulanmıştır. Ayrıca diğer uygulanan ajanlarda olduğu gibi, DMBA'nın uygulanması sırasında da hayvanları irrite etmemek için tüm uygulamalar hafif sedatif eter altında yapılmış olup ve enfeksiyona sebebiyet verilmemesi adına da, her hayvana gavaj uygulaması sırasında ayrı steril sondalar kullanılmıştır. Çalışmanın 15. gününde uygulanan DMBA'dan sonra yaklaşık 115. gününe kadar tümör oluşumu için geçen period, latent dönem olarak adlandırıldı. Bu süre ve sonrasında memedeki kitle oluşumları palpasyonla takip edildi ve ayrıca çalışma sırasında saptanan meme tümörlerinin hacmi, elektronik kumpas yardımı ile, Geran ve ark. (401), tarafından, ortaya konulan protokolle belirlendi ve kayıt altına alındı. Deneyin 23. haftasının sonunda ise sıçanlar sakrifiye edildi.

4.1.3 Kullanılan Kimyasal Ajanlar ve Hazırlanışları

DMBA; çalışmada kullanılan DMBA (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. [TCI], Portland , USA)'nın analitik saflığı > 98% (GS)'dir. DMBA' dan 60 mg/kg doz alınıp 1 mL zeytinyağı içinde tamamen çözündürülerek gavaj uygulamasından hemen önce taze olarak hazırlandı

Pomegranat; çalışmada tedavi ajanı olarak kullanılan Pomegranat ekstresi, toz formda, doğal polifenolik oranı standardize (% 37.5'si Ellagitannin [punikalagin ve gallik asit], % 2.7'si ellajik asit) ve en az 95% saflıkta (HPLC ile) olan ticari tüm nar eksteresi Pomella®(Verdure Sciences®, Noblesville, ABD) kullanıldı.

Tangeretin; çalışmada tedavi ajanı olarak kullanılan Tangeretin (AvaChem Scientific, San Antonio, U.S.A.) toz halde ve % 98 (HPLC ile) analitik saflıktaydı.

DMSO; Pomegranat ve Tangeretin'i çözmek için polar özellikli bir çözücü olan % 0,1'lik Dimetilsülfoksit (DMSO) (Fisher scientific, Leicestershire, UK), gavaj uygulamalarından önce günlük taze hazırlanarak kullanıldı (Terapötik ajanların uygulama dozları, 1mL % 0,1'lik DMSO içinde hazırlandı).

4.1.4. Hayvan Materyallerinden Numunelerin Alınması, Hazırlanması ve Saklanması

4.1.4.1. Kan Numunelerinin Alınması, Hazırlanması ve Saklanması

Son uygulamadan 24 saat sonra sıçanlar ksilazin-ketamin anestezisi altında, steril aletler kullanılarak sakrifiye edildikten sonra kan ve doku numuneleri alındı; çalışmada biyokimyasal analizlerin tayini için kullanılacak kan numuneleri her bir sıçandan uygun şekilde, EDTA'lı biyokimya tüplerine alındı. Alınan kan numuneleri 3000 rpm'de 10 dakika (dk) santrifüj edilerek (Heraeus Biofuge Stratos; Kendo Laboratory Products, Osterode-German) plazmaları ayrıldı. Çalışılacak parametre sayısı fazla olduğu için elde edilen plazma

numuneleri, eppendorf tüplere porsiyonlar halinde bölünerek ELISA analizleri yapılınca kadar -80°C’de saklandı.

4.1.4.2. Doku Numunelerinin Alınması, Hazırlanması ve Saklanması

Tümörlü dokuyu kapsayacak şekilde eksize edilen meme dokusunun bir kısmı % 0,9’luk soğuk (+4°C) sodyum klorür (NaCl) ile yıkandı ve kurutma kâğıdı ile kurutulduktan sonra dokular porsiyonlar halinde oksidan-antioksidan ve western blot çalışmaları yapılana kadar -80°C’de saklandı.

Ayrıca eksize edilen tümörlü meme dokusunun diğer kısmı da histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için, derhal %10’luk formaldehitde tespit edildi ve böylelikle alınan tüm numuneler belirlenen yöntemlerle analiz edilmek üzere hazır hale geldi.

4.2. Yöntemler

4.2.1. Biyokimyasal Yöntemler

4.2.1.1. Enzim İmmun Ölçüm Yöntemleri

Enzim İmmun Ölçüm Yöntemleri (EIA), spesifik antijen-antikor bağlanma reaksiyonlarından faydalanarak aranan antijeni ya da antikoru tayin etmek ya da ölçmek için kullanılan immünokimyasal yöntemlerdir. EIA yöntemlerinin esasında enzimlerin katalitik özelliklerinin kullanılması yatmaktadır. Bu yöntemde belirteç olarak glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve β -galaktozidaz gibi çeşitli enzimlerden yararlanılsa da alkalen fosfataz ve horseradish peroksidaz en sık kullanılan enzimlerdir. EIA tekniği, enzim bağlı immunosorbent ölçüm

(ELISA) ve Enzim-multipıl immün ölçüm tekniği (EMIT) gibi farklı isimlerle de anılmaktadır.

ELISA; serum, plazma, idrar, tükürük, periton sıvısı ve perikard gibi çeşitli vücut sıvılarından ve doku homojenizatlarından elde edilen süpernantantlarda araştırılan antijen (Ag)/ antikör (Ab) düzeylerinin ölçümünde, kendilerine spesifik Ab/Ag' ler ve çeşitli enzimler yardımı ile gözlenen renk değışimlerinin plate okuyucularda otomatize olarak hesaplanmasına dayalı EIA tekniğidir. Klinik analizlerde kabul gören duyarlı bir tekniktir (93, 402). ELISA çalışması için gerekli olan araç ve gereçlerin listesi Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. ELISA Yöntemi için Gerekli Sarflar ve Gereçler

ELISA yöntemi için gerekli olan malzemelerin listesi

ELISA kiti

Standartları hazırlamak için steril eppendorf tüpler

10-100-1000 µL hacim kapasiteli otomatik pipetler ve pipet uçları

0-100 µL hacim kapasiteli ve 8 kanallı otomatik pipet ve pipet uçları

İnkübatör (shaker)

Vortex

ELISA yıkayıcısı, okuyucusu ve yazıcısı

100 mL ve 500ML'lik hacimli beher, erlanmayer

Benmari

Distile su

Kurutma kağıdı

Buzdolabı

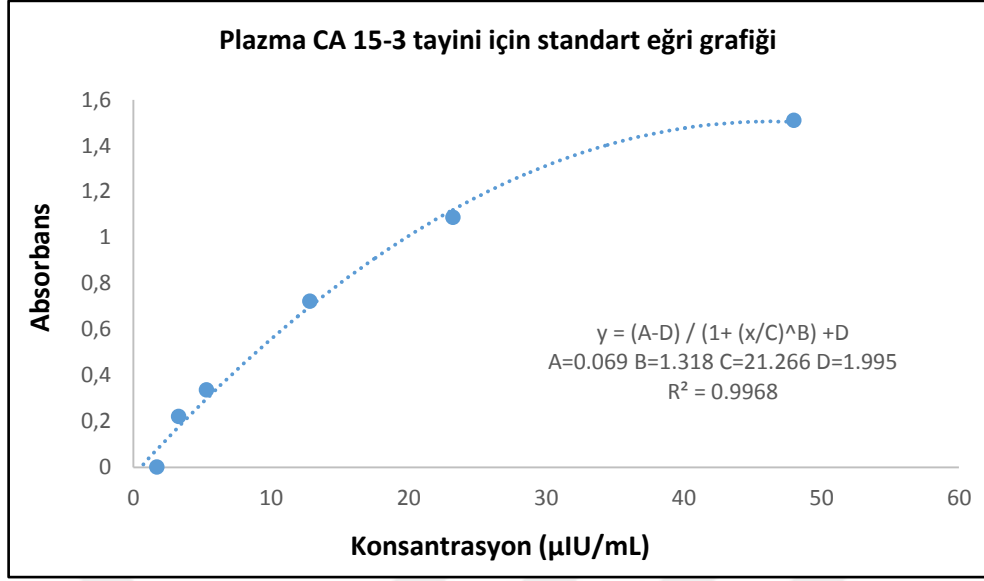
4.2.1.1.1. Plazma CA 15-3 Düzeylerinin Belirlenmesi

Sıçan plazma CA 15-3 düzeyleri, YLbiont marka, sıçan için uyumlu ELISA kiti kullanılarak çalışıldı. Kitin Katolog numarası: YLA0753RA , Lot numarası: 20161111045, intra-assay: CV< %8, inter-assay: CV< %10, ölçüm

aralığı: 0,3-90 $\mu\text{IU/mL}$ ve sensitivitesi: 0,15 $\mu\text{IU/mL}$ idi. Kit içeriğindeki standartlar 450 nm de ELX800 ELISA okuyucusunda (BioTek Instruments, USA) spektrofotometrik olarak okutularak elde edilen otomatik absorbans standart grafiği değerleri (Şekil 25) kullanılarak numune sonuçları ölçüldü. Plate yıkamalarında ise otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) cihazı kullanıldı. Kit içeriğinde bulunan malzemelerin listesi Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. CA 15-3 ELISA Kitinin içeriği

Malzemeler	Miktarları
Stok Standart solüsyonu (96 $\mu\text{IU/mL}$)	0,5 mL
Standart Dilüenti	3 mL
Antikor kaplı ELISA plate	12 Kuyucuk $\times$ 8 (96’lık)
Streptavidin-Horse Radish Peroksidaz (HRP) konjugatı	6 mL
Yıkma solüsyonu 30X	20 mL
Biotinli Anti CA15-3 Monoclonal Ab	1 mL
Kromojen solüsyonu A	6 mL
Kromojen solüsyonu B	6 mL
Stop Solüsyonu	6 mL
Tüketici talimat klavuzu	1 adet
Plate üzerini kapatmak için membran	2 adet
Hermetik Çanta	1 adet



Şekil 25. Plazma CA 15-3'ün Düzey Tayininde Kullanılan ELISA Standart Grafiği

4.2.1.1.2. Plazma CEA Düzeylerinin Belirlenmesi

Plazma CEA düzeyleri, sıçan CEA - ELISA kiti (Ylbiont, Shangai YL Biotech Co Ltd, Katalog no: YLA1432RA, Lot no: 20170801010, Shangai, China) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar ELX800 ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm'de okutuldu. Plate yıkamalarında ise otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) cihazı kullanıldı. Sonuçlar ng/mL olarak kayıt altına alındı. Kitin intra-assay değeri: CV< %8, inter-assay değeri: CV< %10, ölçüm aralığı: 0,05-30 ng/mL ve sensitivitesi: 0,031ng/mL idi.

4.2.1.1.3. Plazma VEGF Düzeylerinin Belirlenmesi

Plazma VEGF düzeyleri, sıçan VEGF - ELISA kiti (Ylbiont, Shangai YL Biotech Co Ltd, Katalog no: YLA0190RA, Lot no: 20170715070, Shangai, China) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Optik

dansiteler ELX800 ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm’de okutuldu. Plate yıkamalarında ise otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) cihazından yararlanıldı. Sonuçlar ng/mL olarak verildi. Kitin intra-assay değeri: CV< %8, inter-assay değeri: CV< %10, ölçüm aralığı: 10-3000 ng/mL ve sensitivitesi: 5,01 ng/mL idi.

4.2.1.1.4. Plazma MMP-9 Düzeylerinin Belirlenmesi

Plazma MMP-9 düzeyleri, sıçan MMP-9 - ELISA kiti (Ylbiont, Shangai YL Biotech Co Ltd, Katalog no: YLA0585RA, Lot no: 20170625036, Shangai, China) kullanılarak kit prosedüründe tarif edildiği gibi çalışıldı. Absorbanslar ELX800 ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm dalga boyunda okutuldu. Plate yıkamalarında ise otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) cihazı kullanıldı. Sonuçlar ng/mL olarak belirtildi. Kitin intra-assay değeri: CV< %8, inter-assay değeri: CV< %10, ölçüm aralığı: 0,05-10 ng/mL ve sensitivitesi: 0,01 ng/mL idi.

4.2.1.1.5. Plazma NF-κB Düzeylerinin Belirlenmesi

Plazma NF-κB düzeyleri, sıçan NF-κB - ELISA kiti (Ylbiont, Shangai YL Biotech Co Ltd, Katalog no: YLA0113RA, Lot no: 20170715071, Shangai, China) kullanılarak kit prosedüründe belirtildiği üzere çalışıldı. Absorbanslar ELX800 ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm’de okutuldu. Plate yıkamalarında ise otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) cihazı kullanıldı. Sonuçlar ng/mL olarak verildi. Kitin intra-assay değeri: CV< %8, inter-assay değeri: CV< %10, ölçüm aralığı: 0,05-20 ng/mL ve sensitivitesi: 0,023 ng/mL idi.

4.2.1.2. Doku Numunelerinin Homojenizasyonu

Derin dondurucuda -80°C 'de saklanan meme dokuları oda ısısına geldikten sonra 100 mg olacak şekilde şekilde hassas terazide (SARTORIUS GMBH, Germany) tartıldı. Daha sonra bu dokular üzerine 900mL 0,15M KCl (1;9,w;v) çözeltisi ilave edilerek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, homojenizatör (Ultra TurraxType T25-B, IKA Labortechnik, Germany) yardımı ile 16000 rpm'de 3 dk homojenize edildi. Elde edilen Homojenatlar $5000\times g$ 'de 1 saat ($+4^{\circ}\text{C}$ 'de) santrifüjlenerek berrak bir süpernantant elde edilene kadar işlem tekrar edildi ve elde edilen berrak süpernatantlar, oksidan ve anti-oksidan parametrelerin ölçümelerini gerçekleştirmek için ayrı ayrı numaralandırılmış eppendorf tüplere aktarıldı ve uygun saklama koşullarında muhafaza edildi.

4.2.1.3 Lowry Yöntemine Göre Protein Düzeylerinin Tayini

Süpernatantlardaki protein düzeyleri Lowry metoduna göre (403), tayin edildi. Bu yöntemin prensibi; alkali ortamda proteinlerin Folin-Fenol ayıracı ile mavi bir renk oluşturmaya dayanmaktadır.

Ayırıcılar:

- 1- Alkali Bakır Ayıracı: 10 g sodyum bikarbonat (Na_2CO_3), 0.1 g Potasyum tartarat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_6$) ve 0.05 g Bakır sülfat (CuSO_4) 0.5 N Sodyum hidroksit (NaOH) içinde çözüldü ve 100 mL'ye tamamlandı. (Bu çözelti oda ısısında 30 gün dayanıklılığı korumaktadır)
- 2- Fenol Ayıracı: 3.75 mL 2.0 N Folin-Ciocalteu-Fenol ayıracı 63.75 mL distile suya ilave edilir.
- 3- Protein Standardı (Albumin): 6.2 g/dL

İşlem:

	<i>KÖR</i>	<i>STANDART</i>	<i>ÖRNEK</i>
Alkali bakır ayırıcı (mL)	0.25	0.25	0.25
BSA standartı (mL)	-	0.25	-
Süpernatant (mL)	-	-	0.25
Deiyonize su (mL)	0.25	-	-
Tüpler iyice karıştırılır ve 10 dk sarsmadan oda ısısında inkübe edildi.			
Fenol ayırıcı(mL)	1.0	1.0	1.0

Tüpler iyice karıştırılıp 55°C’ de 5 dk bekletildi. İnkübasyon sonucu hızlı bir şekilde zaman kaybetmeden soğutuldu. Daha sonra standart ve örnek tüplerinin absorbansları 650 nm’de köre karşı okundu ve kayıt altına alınarak, aşağıdaki işlemle örneklerin toplam protein düzeyleri tayin edildi. Sonuçlar 100’e bölünerek g/mL olarak hesap edildi.

Hesaplama:

$$\text{Toplam Protein Düzeyi (g protein/mL)} = \frac{\text{Örnek abs.} \times \text{Standart konsantrasyonu}}{\text{Standart abs.} \times 100}$$

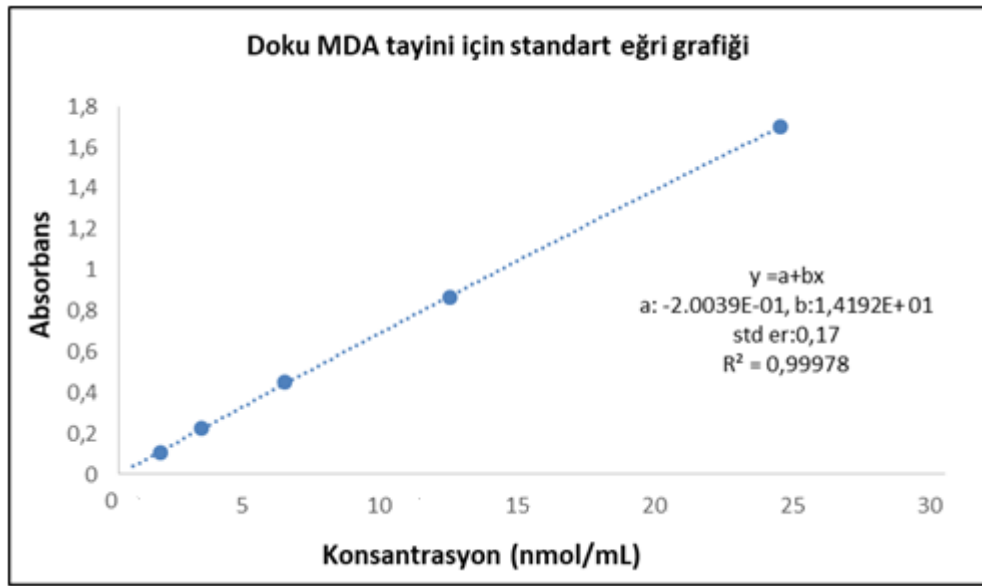
4.2.1.4. Doku Numunelerinde Oksidan-Antioksidan Parametrelerin Belirlenmesi**4.2.1.4.1. Doku MDA Düzeyinin Belirlenmesi**

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak MDA’nın meme dokusundaki düzeyini saptamak için Ohkawa ve ark. (404), tarafından ortaya konulan yöntem kullanıldı ve spektrofotometrik olarak tayin edildi. Bu yöntemin prensibi; asidik ortamda (pH: 3.5) ve aerobik şartlar altında dokudan elde edilen süpernatantların belli sıcaklık etkisinde lipid peroksidasyonu sonucu, açığa çıkan

MDA'nın, Tiyoarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçme esasına dayanmaktadır. Standart çalışma eğrisi ile numunelerin konsantrasyonları aşağıdaki formülle hesaplandı ve sonuçlar toplam protein konsantrasyonlarına bölünerek nmol/g cinsinden verildi (Şekil 26).

Hesaplama:

$$\text{MDA (nmol/g protein)} = \frac{\text{Örnek O.D.} \times \text{Std. Konsantrasyonu}}{\text{Std. O. D.} \times \text{Toplam protein konsantrasyonu (g/mL)}}$$



Şekil 26. MDA Çalışmasında Standart Eğri Grafiği

4.2.1.4.2. Doku SOD Aktivitesinin Belirlenmesi

Meme dokusundaki SOD aktivitesinin tayin edilmesinde; Sun ve arkadaşları tarafından (405), tarif edilen yöntem kullanıldı ve ölçüm spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. Yöntem prensib olarak ksantin ve

ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan O_2^- (süperoksit radikali)'nin, nitroblue tetrazolium (NBT)'u indirgeyerek kırmızı renkli formazon kromojeni oluşturma esasına dayanmaktadır. Ortamdaki kırmızı rengin 505 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okutulması sonucu SOD aktivitesi ölçülür. Oluşan kırmızı rengin şiddeti ile SOD aktivitesi ters orantılıdır.

Hesaplama:

$$\text{SOD aktivitesi (U/g protein)} = \frac{(\Delta A_{\text{kör}}) - (\Delta A_{\text{örnek}}) \times 2 \times \text{D.F.}}{(\Delta A_{\text{kör}}) \times \text{Total Protein (g/mL)}}$$

$\Delta A_{\text{kör}}$: Körün 180.sn'deki okunan Absorbansı (A_2)'ndan, körün 0.sn'deki okunan Absorbans (A_1) farkının, geçen süre (dk cinsinden)'ye oranı ile elde edildi. $(A_2 - A_1)/3\text{dk}$

$\Delta A_{\text{örnek}}$: Örneğin 180.sn'deki okunan Absorbansı (A_2)'ndan, örneğin 0.sn'deki okunan Absorbans (A_1) farkının, geçen süre (dk cinsinden)'ye oranı ile elde edildi. $(A_2 - A_1)/3\text{dk}$

2: %50'sindeki inhibisyonu göstermektedir.

D.F: Dilüsyon faktörünü göstermektedir.

4.2.1.4.3. Doku CAT Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz, hidrojen peroksidin, su ve moleküler oksijen oluşturmak üzere dismutasyonunu katalizlemede görev alır. Çalışmada CAT aktivitesini tayin etmek için Aebi (406), tarafından geliştirilmiş metod kullanıldı. Prensip olarak H_2O_2 konsantrasyonunda birim zamandaki azalmanın 240 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmesi esasına dayanmaktadır.

Hesaplama:

$$\text{CAT aktivitesi (k/g protein)} = \frac{2,3 \times \text{Log} (A_1/A_2) \times 10}{\Delta_t \times \text{Toplam Protein m (g/mL)}}$$

A₁: 240 nm deki 0. sn'deki (ilk okunan) absorbans değerini göstermektedir

A₂: 240 mn deki 60. sn'deki (son okutulan) absorbansı ifade edtmektedir

Δ_t: son absorbans ve ilk absorbans okunması arasında geçen süre (dk)

10: Dilüsyon Faktörü

4.2.1.4.4. Doku GSH-Px Aktivitesinin Belirlenmesi

Doku örneklerinde, GSH-Px aktivite tayini Paglia ve Valentina (407). tarafından ortaya konulan spektrofotometrik yöntemle analiz edildi. Yöntemin esası; ortamdaki hidrojen peroksit varlığında, GSH-Px glutatyonun oksidasyonunu katalizlemesine yani başka bir deyişle redükte glutatyonu (GSH) okside glutatyon (GSSG) formuna yükseltgenmesinde görev alır. GSSG ise glutatyon redüktaz (GSH-Rx) ve NADPH yardımıyla tekrar GSH'ye indirgenir. NADPH'ın NADP⁺'ya yükseltgenmesi esnasındaki absorbans azalmasının 340 nm dalga boyunda okunması, ortamdaki GSH-Px aktivitesini tayin etmeye dayanmaktadır.

Hesaplama:

$$\text{GSH-Px aktivitesi} = \text{U/L (mikromol/min/L)} = \frac{(\Delta A/t) \times V_T \times 10^6}{E \times V_N \times \lambda} \times 10$$

E: NADP'nin ekstinksiyon sabiti (6.22 x 10³)

V_T: Küvetteki son toplam volüm (1.495 mL)

V_N : Kuvette bulunan numune volümü (0.010 mL)

λ : Küvetin çapı (1 cm)

$\Delta A/t$: 3dk'daki absorbans farkı [$(A_{0,dk} - A_{3,dk}) / 3$]

10^6 : Molü mikromole dönüştürme sabiti.

10: Seyreltme faktörü

$$\text{GSH-Px aktivitesi (U/gr protein)} = \frac{\text{U/L}}{1000 \times \text{Total protein (g/mL)}}$$

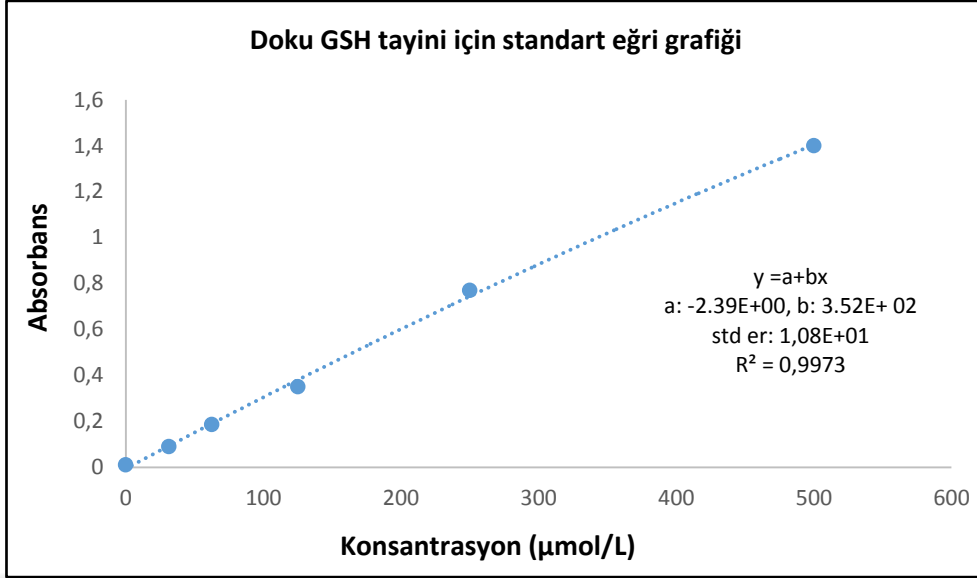
4.2.1.4.5. Doku GSH Düzeyinin Belirlenmesi

Doku numunelerinde redükte glutatyonun tayini Fairbanks ve Klee (408), tarafından geliştirilen yöntemden modifiye edilerek gerçekleştirildi. Yöntemin prensibini özetlersek; numunelerin içinde bulunan glutatyonun sülfidril grupları ile Elman ayırıcının reaksiyona girmesi sonucu oluşan sarı renkli kromejenik kompleksin, absorbansının 412 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmesine dayanır. Numunelerdeki GSH tayinleri, standart çalışma eğrisinden (Şekil 27) faydalananak aşağıdaki formülle hesaplandı.

Hesaplama:

$$\text{GSH } (\mu\text{mol/g protein}) = \frac{\text{Örnek O.D.} \times \text{Std. Konsantrasyonu} \times 10}{\text{Std. O. D.} \times \text{Toplam protein konsantrasyonu (g/mL)}}$$

10: Dilüsyon faktörüdür.



Şekil 27. GSH Çalışmasında Standart Eğri Grafiği

4.2.1.5. Western Blot Yöntemi

Blotlamanın dilimizdeki kelime anlamı ‘lekelemek’ olarak ifade edilse de, bilimsel olarak protein ve nükleik asitlerin jelden membrana geçirilmesini ifade eden tüm metodların genel ismidir. Bu metodlardan ilki 1975 yılında geliştirilen DNA’nın tesbitinde kullanılan Southern blotlama tekniğidir. Metodun ismi, bu yöntemin mucidi Edwin Southern’dan ileri gelmektedir Daha sonraki araştırmacılar tarafından, Edwin’e saygı amacıyla RNA tespit yöntemi Northern blot , protein tespit yöntemi ise Western blot olarak adlandırılmıştır (156).

Western blot yöntemi; moleküler çalışmalarda, spesifik bir proteinin görüntülemesi ve tanımlanması için sıklıkla başvurulmuş bir analiz tipidir. Prensib olarak, Sodyum Dodesil Sülfat-Poli Akrilamid Jel elektroforezi (SDS-PAGE) yardımıyla, bir protein karışımındaki proteinlerin moleküler ağırlıklarından faydalanılarak, ayrıştırılması esasına dayanmaktadır. Kısaca yöntemde; jele yüklenen proteinler katı bir destek membrana (nitrosellülöz ya da polividin florür

[PVDF]) çeşitli yöntemlerle (ıslak ve semi-dry) transfer edilmektedir, bu işlem aynı zamanda blotlama olarak adlandırılmaktadır. Membrana transferi gerçekleşmiş olan proteinlerden, aranan proteine özgü spesifik antikorun non-spesifik olarak bağlanmasını önlemek için genellikle BSA ya da yağsız süt tozu içeren solüsyonlar ile farklı antijenik epitopların üzerleri kapatılarak, bloklama işlemi gerçekleştirilir. Çalışılacak moleküle özgül spesifik birincil antikor aracılığıyla membran inkübe edilir. Ardından bağlı olmayan antikorları ortamdan uzaklaştırmak için yıkama işlemleri uygulanır. Yıkama işlemlerinden sonra ise kullanılacak substratın özelliğine göre çeşitli enzim (alkalen fosfataz, peroksidaz), radyoaktif veya floresan işaretlilerle bağlı ikincil antikorla membran tekrar inkübe edilmektedir. Çeşitli tespit yöntemine uygun substratlar (kromojenik [DAB], kemilüminesan [ECL]) kullanılarak aranan protein bantlarının belirlenmesi gerçekleştirilmektedir edildi (409). Tespit işlemi biten protein bantları, kullanılan yönteme uygun olarak çeşitli görüntüleme sistemleri yardımı ile analiz edilmektedir.

4.2.1.5.1. Western Blot Analizi için Dokuların Hazırlanması ve Total Protein Tayini

4.2.1.5.1.1. Dokuların Homojenizasyonu ve Protein Ekstraksiyonu

Derin dondurucuda (-80 °C'de) bekleyen meme dokuları çıkarıldı. Steril bistrüler yardımı ile parçalara ayrılan dokular, 100 mg şeklinde hassas terazide (Sartorius GMBH, Germany) tartıldı ve RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz® Biotechnology, Inc. USA) çözeltisi içine aktarılan dokular (1;9,w;v), bir homojenizatör (Ultra TurraxType T25-B, IKA Labortechnik, Germany) yardımı

ile 16000 rpm’de 3 dk boyunca homojenize edildi (Homojenizasyon +4 °C’de buz kalıpları içinde gerçekleştirildi). Elde edilen homojenatlardan çekirdek proteini ekstraksiyon işlemleri için, soğutma ayarlı ve kademeli santifügasyon işlemi yapan ultrasantifügasyon cihazı (BECKMAN COULTER Optima™ L-100XP Ultracentrifuge, Brea, CA, US, rotor: TYPE 90 TI) ve bu cihaza uygun rotor başlıkları (CAP ASSY, AL 5/16" TUBE, ürün kodu:344091), mikro santifügasyon tüpleri (2.0 mL Ultra-Clear™ Centrifuge Tube, 8 x 49 mm, ürün kodu; BC.344091) kullanılarak 90.000 rpm’de 1 saat +4 °C’de ultrasantifügasyon işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj işlemi bittikten sonra alınan süpernatantlar numara sıraları baz alınarak ayrı eppendorflara porsiyonlandı. Bu hazırlanan süpernatantlardan hem total protein tayini hem de western blot analizleri gerçekleştirildi.

4.2.1.5.1.2. Doku Numunelerinin Total Protein Tayini

Meme dokusundan hazırlanmış olan homojenatlardan elde edilen süpernatantların total protein düzeyleri, Qubit protein ölçüm kiti (Qubit Protein Assay Kit, İnvitrogen, USA) ve uygun tüpler (Qubit Assay Tubes 500 µL, İnvitrogen, USA) kullanılarak, kit prosedüründe belirtildiği üzere, Qubit Fluorometer-I cihazında (İnvitrogen, USA) tayin edildi. Sonuçlar mg/mL olarak kayıt altına alındı.

4.2.1.5.2. Western Blot Analizinin Uygulama Aşamaları

Çalışma süresince kullanılan gerekli malzemeler bir liste olarak Tablo 9’da verilmiştir. Çalışmamızda western blot analizi sırasında sırası ile aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

1. Jele yüklenecek olan protein numunelerinin hazırlanması,
2. Protein karışımlarının dikey SDS-PAGE'e yüklenmesi, yürütülmesi
3. Blotlama, bloklama ve antikorlarla inkübasyon aşamaları,
4. Protein bantlarının görüntülenmesi ve protein ekspresyon düzeylerinin saptanması,

Tablo 9. Western Blot Analizinde Kullanılan Malzemeler

Western Blot analizi için kullanılan malzemeler
Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, USA)
X Cell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System (Invitrogen™, USA)
Elektroforez Güç Kaynağı (Bio-Rad Laboratories, USA)
NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Jel 1mm X 10 kuyucuklu (Invitrogen™, USA)
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X)
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)
NuPAGE® MES BIS-TRIS Running Buffer Kit COMBO (20 X) (Invitrogen™, USA)
NuPAGE® Antioxidant (Invitrogen™, USA)
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen™, USA)
iBlot® Transfer Stacks, PVDF membran, regular-size 10 Blots (Invitrogen™, USA)
iBlot® Dry Blotting System (iBlot® Gel Transfer Device and apparatus), (Invitrogen™, USA)
Shaker (Metabolik inkübatör, Thermo-shaker MBS100-4A, Poland)
Vorteks (VELP SCIENTIFICA, F20220176, Europe)
Mouse Monoklonal Anti-β-Aktin primer antikoru (NB600-501, NOVUS BIOLOGICALS®, Littleton, USA)
Mouse Monoklonal Anti -p53 primer antikoru (NB200-103, NOVUS BIOLOGICALS®, Littleton, USA)
Mouse Monoklonal Anti -Bax primer antikoru (NBP1-28566, NOVUS BIOLOGICALS®, Littleton, USA)
Mouse Monoklonal Anti -Bcl-2 primer antikoru (NB100-78543, NOVUS BIOLOGICALS®, Littleton, USA)
Mouse Monoklonal Anti -β-Catenin primer antikoru (NBP1-54467, NOVUS BIOLOGICALS®, Littleton, USA)
Mouse Monoklonal Anti -Cyclin D1 primer antikoru (NBP2-32840, NOVUS BIOLOGICALS®, Littleton, USA)
WesternBreeze® Chromogenic Detection Kit-Anti-Mouse (WB7103, Invitrogen™, USA)
Scanner (Hewlett Packard Company, Photosmart C3100, California, ABD)

1- Jele yüklenecek olan protein numunelerinin hazırlanması

Total protein düzeyleri bilinen numuneler %4-12 Bis-Tris gradyenli jel'e 20 µL'lik hacimlerde yüklenmeden önce, Tablo 10'da şematize edildiği üzere kasetteki her bir kuyucuğa yüklenen örnek protein miktarının eşit olabilmesi için (30µg), +4⁰C'de buz kalıpları içinde bulunan numunelere; prosedürlerinde belirtildiği gibi NuPAGE[®] Sample Reducing Agent (10X), NuPAGE[®] LDS Sample Buffer (4X) ve distile su ilave edilerek son hacimler 20 µL olacak şekilde 200 µL'lik eppendorf tüplere protein karışımları konuldu ve 10 dk, 70 °C'de Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, USA) cihazında denatüre edildikten sonra -20 °C'de 5 dk bekletildi.

Tablo 10. Qubit Florometre İle Total Protein Düzeyleri Belirlenen Doku Süpernatantlarından Jele Yüklenecek Olan Protein Karışımının Hazırlanmasını Gösteren Örnek Hesaplama

Ölçülen Protein düzeyleri (mg/mL)	Jele yüklenecek örnek miktarları (µL)	Distile su (µL)	LDS Sample Buffer (4X) (µL)	Sample Reducing Agent (10X) (µL)
3,5	8,6	4,4	5	2

2- Protein karışımlarının dikey SDS-PAGE'e yüklenmesi, yürütülmesi

Yüzde 4-12 oranlarında Bis-Tris jel içeren kasetlerimizin en alt kısımlarındaki beyaz bantlar çıkarıldı ve üst tarafında jele gömülü olan taraklı aparat, kuyucuklara zarar verilmeden dikkatlice çıkarıldı ve kuyucuklar üzerinde kalan hava kabarcıkları ve sıvı pipet yardımı ile bertaraf edildi. Jelli kasetimiz dikey SDS-PAGE tankının (X Cell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System)

içinde sabitlendi. Daha sonra 20 kat konsantre olan SDS yürütme solüsyonundan (20 X) (NuPAGE® MES BIS-TRIS Running Buffer Kit COMBO, İnvitrogen™, USA) 25 mL alınıp bir mesura yardımı ile son hacim 500 mL olacak şekilde distile su ilave edildi. Böylece kullanıma hazır 1X' lik runnig buffer elde edildi ve dikey elektroforez tankına yerleştirilmiş olan kasetlerin orta bölümüne hazırlanan bu 1X'lik yürütme solüsyonu dikkatlice boşaltılarak, kuyucukların üzerini tamamen kapatacak şekilde taşmasına izin verildi. Tankın orta kısmındaki tampon çözeltinin kasetlerin dışına sızmadığından emin olunduktan sonra, jelli kasetlerimizin bulunduğu orta kısma denk gelecek şekilde 500 µL antioxidant (NuPAGE® İnvitrogen™, USA) ilave edildi. Örnekleri jele yüklemekten önce 0-100 µL'lik bir pipet yardımıyla, hazırlanan tampon çözelti ile her bir kuyucuğa pipetaj yapılarak kuyucuklar içindeki hava kabarcıkları alındı. İlk kuyucuğa markerden (SeeBlue Plus2 Pre-stained Standart, İnvitrogen™, USA) 10 µL eklendi. Diğer kuyucuklara da sırası ile 20 µL hacimde, hazırlamış olduğumuz örnek karışımları pipetlendi. Pipetleme işlemlerinin ardından dikey jel elektroforez kapağındaki kutup başlıkları, tanktaki yerlerine tam denk gelecek şekilde kapatılarak, jel üzerindeki proteinlerin negatif (katot) kutuptan, pozitif (anod) kutba doğru göçü için güç kaynağımız (Bio-Rad Laboratories, USA) 150V sabit akımda, 1 saate ayarlandı. Proteinlerin elektroforezdeki yürüme işlemi sonlandıktan sonra güç kaynağı kapatılarak, kasetler steril jel bıçağı yardımı ile bağlantı noktalarından ayrıldı. Bu işlem sırasında jele zarar vermemeye dikkat edildi. Kasetteki kuyucuğa denk gelen jel çıkıntıları ile en alttaki boşluklu kısımlara denk gelen jel kısımları, steril bir jel bıçağı yardımı ile uzaklaştırıldı.

Son olarak jeli kasetten ayırma işlemi ise steril bir kaba aktarılmış distile suyun içerisinde gerçekleştirildi.

3- Blotlama, bloklama ve antikorlarla inkübasyon aşamaları

Blotlama basamağı; bu işlem iBlot Dry Blotting System cihazı içerisinde (iBlot® Gel Transfer Device and apparatus, Invitrogen™, USA), iBlot® Transfer Stack, PVDF membran kit (Invitrogen™, USA) kutusundan çıkarılan bir adet anod, katot, filtre kağıdı ve sünger yardımı ile gerçekleştirildi. Sırası ile anod'un üzerindeki jelatin açılarak plastik kabıyla birlikte blotlama için en alt katman oluşturuldu. Daha sonra distile su içerisinde bulunan jeller dikkatli bir şekilde (kırılmadan) alınarak anod tabakasının üst kısmına aktarıldı. Jelin üzerine homojen olarak hafif ıslatılmış filtre kağıdı serilerek bir rulo yardımı ile üzerinden geçildi ve böylece hava kabarcıklarının giderilmesi sağlandı. Filtre kağıdının üzerine ise yine kit içerisinde çıkan ve blotlama işleminin katot tabakasını oluşturmaya yarayan materyal koyuldu (bu aşamada bakır yüzeyin süngere doğru, jelli kısmın ise filtre kağıdının üzerine bakacak şekilde yerleştirilmesine dikkat edildi). Son olarak cihazın kapak kısmında kendine özgü yeri olan sünger yerleştirildi ve kapak kilitlendi. Cihaz P3 programında 8 dk'ya uyarlandı ve jel üzerindeki proteinlerin ve markerlerin transferi gerçekleştirildi. Blotlama işlemi bittikten sonra cihazın kapağı açılarak sırası ile sünger, katot tabakası, filtre kağıdı ve jel ortamdan dikkatlice yine bir pens yardımı ile uzaklaştırıldı. Anod tabakasının üzerinde bulunan her bir PVDF membran ise daha önceden markere göre bant yerleri tespit edilen noktalardan steril bir bistüri ile cutting (kesim) uygulanarak ikiye bölündü, referans proteinimiz olan β -Aktin ve hedef proteinimiz olan p53 proteinlerini içeren bu membranlar, WesternBreeze®

Chromogenic Kit–Anti-Mouse (WB7103, İnvitrogen™, USA) kiti ile birlikte verilen steril plastik kapların içerisinde bulunan distile suya pens yardımı ile aktarıldılar. Bu böylece SDS kalıntıları membranlardan uzaklaştırmış oldu.

Bloklama basamağı; ticari kit (WesternBreeze® Chromogenic Kit–Anti-Mouse, WB7103, İnvitrogen™, USA) prosedürüne uygun olarak aşağıdaki Tablo 11’e göre hazırlanan bloklama solüsyonundan, her bir plastik steril kapta bulunan membranlara 10 mL aktararak, yarım saat boyunca oda ısısında, inkübatörde bloklama işlemi gerçekleştirildi. Membranlar üzerindeki bloklama solüsyonları giderildikten sonra, membranlar 20 mL distile su ile inkübatörde 5 dk boyunca çalkalandı ve bu yıkama işlemi toplamda 2 defa gerçekleşti.

Primer ve sekonder antikorlarla inkübasyon ve diğer basamaklar; bloklama işlemlerinin ardından, referans protein olarak seçilen Mouse Monoklonal Anti-β-Aktin primer antikor (NB600-501, NOVUS BIOLOGICALS®, Littleton, USA) ve hedef primeri olarak adlandırılan Mouse Monoklonal Anti-p53 primer antikor (NB200-103, NOVUS BIOLOGICALS®, Littleton, USA), antikor sulandırma solüsyonları (bloking solüsyonu) içerisinde Tablo 11’deki gibi sulandırıldıktan sonra, bu primer antikor solüsyonları plastik kaplar içerisinde bulunan membranlar üzerine, pipet yardımı ile aktararak 25°C’de 60 dk çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldılar. Primer antikorlar ile inkübasyon basamağı bittikten sonra, membranlar Tablo 11 ‘de gösterildiği gibi hazırlanan 20 mL antikor yıkama solüsyonu ile muamele edildi bu işlem 5 dk 4 kez çalkalayıcıda gerçekleştirildi ve bu basamakta sonlandırıldı.

Tablo 11. Western Blot Analizinde 3. Basamakta Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Gerekli Solüsyonlar	PVDF Membranda kullanılmak üzere	
Bloklama solüsyonunun hazırlanması	Ultra filtre edilmiş su	14 mL
	Blocker/Diluent A	4 mL
	<u>Blocker/Diluent B</u>	<u>2 mL</u>
	Toplam hacim	20 mL
Referans Primer Antikörün dilüsyonu	β -Aktin primer antikoru, 1:2000 oranında, 10 mL bloklama solüsyonu içerisinde dilüe edildi.	
Hedef Primer Antikörlerin dilüsyonu	p53 primer antikoru,	1:2000,
	Bax primer antikoru,	1:200,
	Bcl-2 primer antikoru,	1:1000,
	β -Catenin primer antikoru,	1:1000,
	Cyclin D1 primer antikoru,	1:400 oranlarında 10 mL bloking solüsyonu ile sulandırıldı.
Antikör Yıkama solüsyonunun hazırlanması	Ultra filtre edilmiş su	150 mL
	<u>Antikör Yıkama solüsyonu (16X)</u>	<u>10 mL</u>
	Toplam hacim	160 mL

Yıkama işlemleri bittikten sonra, membranlar 10 mL kullanıma hazır sekonder antikör ile muamele edilerek çalkalayıcıda 25 C’de 30 dk süresince inkübasyona bırakıldı. Bu işlem sonlandıktan sonra yine 20 mL antikör yıkama solüsyonları ile 5 dk 4kez çalkalayıcıda yıkama işlemleri gerçekleştirildi. Non-spesifik bağlanmaları ortadan kaldırmak ve daha temiz bir bant eldesi için,

membranlar 20 mL distile su ile 2 dk 3 kez yıkandı ve her yıkamadan sonra distile su döküldü.

4- Protein bantlarının görüntülenmesi ve protein ekspresyon düzeylerinin saptanması

Membranların üzerine, kullanıma hazır kromojenik substrattan 5 mL pipetlenerek karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun yaklaşık 20 ila 45. dk'ları içerisinde bantların gelişimi izlendi ve membranlar 20 mL distile su ile yıkandı. Her seferinde membrandaki su dökülüp yenisi ile değiştirildi. Bu işlem de toplamda 2 dk ve 3 kez uygulandı. Daha sonra membranlar bir pens yardımı ile kurutma kağıtları üzerinde kurumaya alındı ve western blot analizinin büyük bir kısmı titizlikle sonlandırıldı. Son olarak protein bantlarımızı içeren membranlarımız uygun bir tarayıcı (Hewlett Packard Company, Photosmart C3100, California, ABD) 600 dpi ile taranarak bilgisayar ortamına aktarıldı. Elde edilen protein bantları; image-j programı (National Institute of Health, Bethesda, ABD) aracılığı ile (8-bit formatında, gri renk skalasına göre kalibre edilerek her bir bant için ayrı grafik çizdirilerek) görüntülendi. Rölatif protein yoğunlukları β -Aktin proteini (çalışmamızda referans olarak kullanılan housekeeping) ile standardize edilerek hesaplandı ve protein ekspresyon düzeyleri kayıt altına alındı.

Ayrıca yukarıda p53 proteini üzerinden göstermiş olduğumuz western blot uygulama prosedürleri, çalışmamızdaki western blot analizi yapılan diğer proteinlerin (Bax, Bcl-2, β -katenin ve Cylin D1) doku ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde de aynı şekilde uygulanmış olup, gereksiz tekrardan kaçınmak üzere detaylandırılmamıştır.

4.2.2. Histopatolojik, İmmunohistokimyasal ve TUNEL Analizleri

Histolojik çalışma için her gruptan alınan meme dokuları %10'luk formol solüsyonunda tespit edildikten sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Dokular daha sonra ksilolde parlatılıp parafin bloklara gömüldü (Tablo 12).

Tablo 12. Histolojik Takip Serileri

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

4.2.2.1. Histopatolojik Analizler

Parafin bloklardan 4-6 mikron kalınlığında elde edilen kesitler, otomatik boyama cihazında hematoksilin-eozin (H&E) ile boyanarak, ışık mikroskobu (Olympus BX53) altında (200X büyütme yapılarak) değerlendirildi ve görüntüleme cihazı (Olympus DP72) ile çekilen fotoğraflar kayıt altına alındı.

Ayrıca sakrifiye edilen hayvanların meme dokularındaki kitleler makroskopik incelemelerden sonra fotoğraflanarak kayıt altına alındı. Meme dokusundaki tümöral oluşumların uzman bir patolog tarafından mikroskopik olarak belirlenmesinden sonra çeşitli hesaplamalar ile gruplardaki tümör tutulum insidans oranları (324), ortalama tümör hacimleri (401) ve tümör ağırlıkları (324) ortaya konuldu.

4.2.2.2. İmmunohistokimyasal Analizler

Parafin bloklardan 4–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara aktarıldı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirildikten sonra antijenin açığa çıkması için sitrat tamponu içinde (pH:6) mikrodalga fırınında (750 Watt) 7+5 dk kaynatıldı. Kaynatma sonrası oda ısısında yaklaşık 20 dk soğutmak için bekletilen dokular, PBS (Phosphate Buffered Saline, P4417, Sigma-Aldrich, USA) ile 3 x 5 dk yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için hidrojen peroksid blok çözeltisi (Hydrogen Peroxide Block, TA-125-HP, Lab Vision Corporation, USA) ile 5 dk boyunca inkübe edildi. PBS ile 3x5 dk yıkanan dokulara zemin boyasını engellemek için 5 dk Ultra V Block (TA-125-UB, Lab Vision Corporation, USA) çözeltisi uygulandı. Daha sonra dokular, sırasıyla 1:100 ve 1:1000 oranlarında dilue edilen Ki-67

(Rabbit polyclonal Anti-Ki-67 antibody, PA5-16785, ThermoFisher Scientific, Rockford, U.S.A.) ve ER- α (Rabbit polyclonal Anti- ER- α antibody, PA1-308, ThermoFisher Scientific, Rockford, U.S.A.) primer antikorları 1 saat nemli ortamda 25°C’de inkübe edildi. Primer antikör ile muamele işlemi biten dokular, PBS ile 3x5 dk yıkandıktan sonra sekonder antikör (biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse / rabbit IgG), TP-125-BN, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dk nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Sekonder antikör ile muamele işlemi biten dokular, PBS ile 3x5 dk yıkayıp Streptavidin Peroxidase (TS-125-HR, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dk nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra PBS içerisine alındı. Dokulara 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrate + AEC Chromogen (AEC Substrate, TA-015 ve HAS, AEC Chromogen, TA-002-HAC, Lab Vision Corporation, USA) solusyonu damlatılıp ışık mikroskobunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak dokular PBS ile yıkamaya alındı. Mayer’s hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular PBS ve distile sudan geçirilerek uygun kapatma solusyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DM500 mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı (Leica DFC295).

Boyamada immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <%25, 0.4: %26-50, 0.6: %51-75, 0.9: %76-100) ve şiddeti (0: yok, +0.5: çok az, +1: az, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu. Histoskor = yaygınlık x şiddet

4.2.2.3. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın prosedüründe belirttiği üzere ApopTag® Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit'i (EMD Milipore Corp, cat no: S7101, Temecula USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi.

Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek Fosfat Buffer Salın (PBS) ile yıkandı. Proteinase K (% 0.05'lik) ile 10 dk inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3 hidrojen peroksit ile 5 dk inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dk Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37° C' de nemli ortamda çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) ile 60 dk inkübe edildi. Stop/Wash Buffer da 10 dk bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Peroksidaz ile 30 dk muamele edildi. Diaminobenzidin (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntülendi. Harris hematoxilen ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Pozitif kontrol için meme dokusu kullanıldı. Negatif kontrol dokusunda Tdt enzimi yerine Reaction Buffer kullanıldı.

Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoxilen 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 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI) hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 13).

Tablo 13. TUNEL Boyama Prosedürü.

	İşlem	Süre
1	60°C etüv	Bir gece
2	Xylol	3x15 dk
3	%100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dk
4	PBS	5 dk
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
6	1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dk
7	PBS	3X5 dk
8	Endojen peroksit blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dk
9	PBS	3X5 dk
10	Equilibration tampon solüsyonu	10 dk
11	Çalışma solüsyonu (%70 µL R.B.+%30 TdT Enzyme) 37°C'de	60 dk
12	Stop/Wash Buffer (2mL) +Distile su (68mL) Oda sıcaklığında	10 dk
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dk
14	PBS	3x5 dk
15	DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dk
16	PBS	3X5 dk
17	Distile su	5 dk
18	Harris hematoksilen	1-5 dk
19	Distile su	5 dk
20	%80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dk
21	Xylol	2x5 dk
22	Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kapatma.	

4.2.3. İstatistiksel Analizler

Biyokimyasal analizler sonucu, elde edilen verilerde kanser oluşumunu ortaya koymak için; bağımsız iki grubun karşılaştırılmasında kullanılan nonparametrik olan Mann-Withney U testi kontrol ve DMBA grupları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermede kullanıldı. İstatistiksel olarak en düşük anlamlılık için $p < 0.05$ değeri kabul edilirken, sonuçlar Median (Min-Max) şeklinde verilmiştir.

Yine biyokimyasal yöntemler sonucu, elde edilen verilerde; ilaçların kemopreventif etkinliğini ortaya koymak için ise; önce ikiden fazla gruplar arasındaki farklılıkların karşılaştırılmasında kullanılan nonparametrik olan Kruskal-Wallis testi D, D+P, D+T, D+P+T grupları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermede kullanılırken, sonrasında ikili grup karşılaştırılmasında kullanılan Dunn Testi ile bu farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı gösterilmiştir. İstatistiksel olarak en düşük anlamlılık için $p < 0.05$ değeri kabul edilirken, sonuçlar Median (Min-Max) şeklinde verilmiştir.

İmmunohistokimyasal ve TUNEL boyama analizleri sonucunda elde edilen verilerde gruplar arasındaki karşılaştırmaları göstermek için; önce parametrik olan tek yönlü varyans analizi testi (One-way ANOVA testi) ile birlikte, sonrasında çoklu karşılaştırmalar için ise post-hoc Tukey HSD testi uygulandı. İstatistiksel olarak en düşük anlamlılık için $p < 0.05$ değeri kullanıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterildi.

Gruplar arasındaki canlı ağırlık farklılıkları ise önce parametrik olan tek yönlü varyans analizi testi (One-way ANOVA testi) ile birlikte sonrasında çoklu karşılaştırmalar için ise post-hoc Bonferroni Testi uygulandı. İstatistiksel olarak

en düşük anlamlılık için $p<0.05$ değeri kullanıldı. Sonuçlar Median (Min-Max) şeklinde verilmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen tüm verilerin istatistiksel değerlendirilmesi Fırat Üniversitesi'ne lisanslı olan IBM SPSS Statistics 22 Paket Programı (Lisans No: 42021148f00141a304ab) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

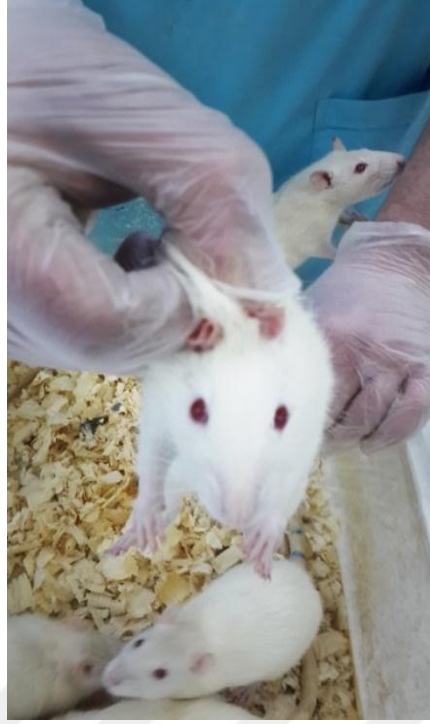


5. BULGULAR

5.1. Gruplara Ait Genel Makroskopik Değerlendirmeler

Çalışmaya Kontrol (K) grubunda 7, Pomegranat (P) grubunda 7, Tangeretin (T) grubunda 7, P+T grubunda 7, DMBA (D) grubunda 10, D+P grubunda 10, D+T grubunda 10, D+P+T grubunda 10 sıçan olmak üzere, 8-10 haftalık 205-220 g ağırlığında toplamda 68 adet dişi *Sprague Dawley* türü sıçan kullanılarak başlandı. Çalışmamızda P+T grubundan 1, D grubundan 3, D+P grubundan 2, D+T grubundan 3 ve D+P+T grubundan da 3 adet sıçan kaybedildi ve çalışmaya 56 adet sıçan üzerinden devam edildi. (K; n=7, P; n=7, T; n=7, P+T; n=6, D; n=7, D+P; n=8, D+T; n=7, D+P+T; n=7). Çalışmanın deneysel aşaması toplamda 23 hafta sürmüştür.

Deney süresi ve sonrasında, hayvanlarda husule gelen makroskopik değişiklikler inspeksiyon ve palpasyon yolu ile değerlendirildi. Bu süreçte kontrol grubundaki hayvanların genel durumlarında herhangi bir patoloji gözlenmedi (Şekil 28). DMBA grubundaki hayvanların tüyleri kontrol grubundakilerle karşılaştırıldığında, kaba karışık görünümde olup yer yer döküntüler gözlenmiştir (Şekil 29). Tedavi gruplarındaki bazı sıçanlarda da benzer belirtiler izlenmesine rağmen, DMBA grubundaki gibi yaygın değildi. Çalışmanın ilk üçte birlik diliminden sonraki süreçte DMBA grubunda birkaç hayvanda inspeksiyonla vaginal kanamalar gözlemlenirken, aynı gruptaki 3 adet hayvanın gözlerinde körlük oluşumu tespit edildi (Şekil 29). Ayrıca diğer tedavi ajanları ile birlikte DMBA uygulanan gruplardaki birkaç hayvanda da körlük geliştiği makroskopik bulgulara eklendi.

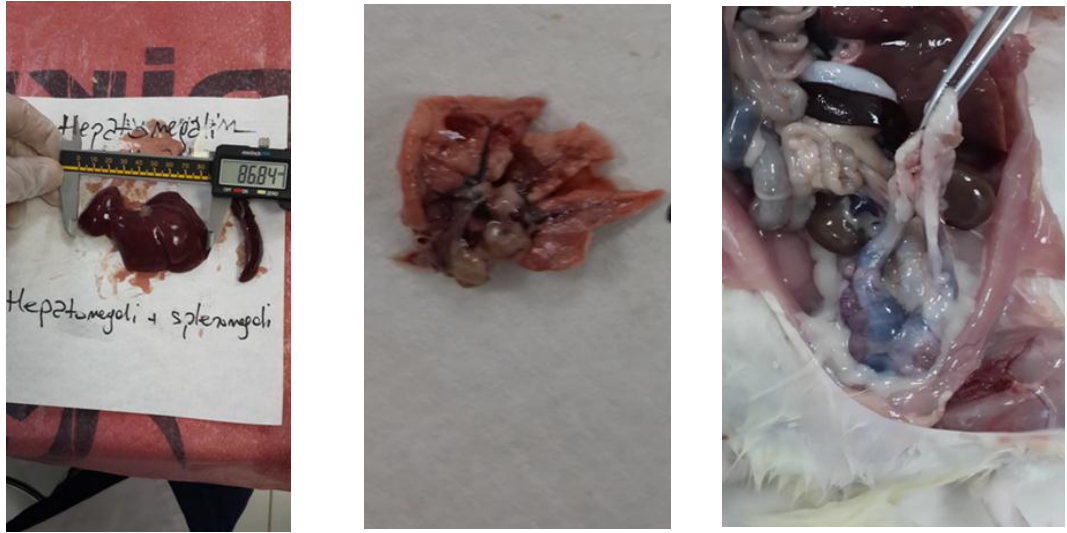


Şekil 28. Kontrol Grubundaki Sağlıklı Hayvanların Genel Görüntüsü



Şekil 29. DMBA Grubundaki Hayvanlarda Gözlemlenen Makroskopik Değişikler

Sakrifikasyon sonrasında çıkarılan organ ve dokuların makroskopik değerlendirilmesinde ise özellikle DMBA grubundaki hayvanların büyük bir çoğunluğunda hepatomegali ve splenomegali gözlemlenirken, aynı gruptan 5 adet hayvanın meme dokusunda ise yaygın tümöral tutulumlar gözlemlendi (Şekil 30). Ayrıca yine aynı gruptaki sıçanların makroskopik organ değerlendirmeleri sonucu bazı hayvanların akciğer ve uterus dokularında kitle oluşumları ve nekrotik odaklarla birlikte, karın iç organlarında aşırı yağlanma belirtileri görülmüştür. Diğer tedavi gruplarında da bu bulgular benzer olarak gözlemlenirken, DMBA grubuna kıyasla gerek meme dokusundaki tümör tutulumlarının sayısı ve gerekse diğer organlardaki makroskobik lezyonların yaygınlığı daha az olduğu gözlemlendi. Tümör oluşumları için detaylı makroskopik ve mikroskopik değerlendirmeler histopatolojik bulgularda verilmiştir.



Şekil 30. Sakrifiye İşleminde sonra DMBA Grubundaki Hayvanların Organlarında Gözlemlenen bazı Makroskobik Değişikler

5.2. Gruplara Ait Vücut Ağırlıkları ve Büyüme Oranları

Çalışma başlangıcında ve deney bitiminde hayvanlar kesilmeden önce gruplardaki hayvanların vücut ağırlıkları ve günlük büyüme oranları arasındaki farklılıklar aşağıdaki şekilde değerlendirildi.

Pomegranat ve Tangeretin'in oral yoldan uygulanmasının vücut ağırlığı artışı veya büyüme oranı üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi olup olmadığını belirlemek için tüm sıçanlar rutin olarak izlendi. Çalışmada bir ay boyunca, sadece bu tedavi ajanları verilen P, T ve P+T gruplarında, kontrol grubuna göre hayvanların başlangıç ve nihai vücut ağırlıklarında anlamlı bir fark bulunmazken, tüm gruplarda vücut ağırlıklarının normal bir oranda arttığı tespit edildi (Tablo 14). DMBA verilen tüm gruplardaki sıçanlarda ise vücut ağırlıkları ve büyüme oranları median değerleri, kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi ($p<0,001$) (Tablo 14). DMBA ile kıyaslandığında, tüm tedavi gruplarındaki (D+P; D+T; D+P+T) vücut ağırlıkları ve büyüme oranlarının anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi (sırası ile $p<0,001$; $p<0,005$; $p<0,001$) (Tablo 14). DMBA'nın, kontrollere göre önemli ölçüde azalmış kilo alımı ve büyüme oranlarına neden olduğu tespit edilirken, DMBA ile meme kanserinin indüklendiği sıçanlarda, Pomegranat ve Tangeretin tedavileri ile canlı ağırlık (CA) kazancı ve büyüme oranlarında önemli bir artış olduğu belirlendi.

Tablo 14. Gruplar Arasındaki Canlı Ağırlık (CA) Kazanç Farkları

Gruplar	1. Hafta CA (g)		23. Hafta CA (g)		Total A. Kazancı (g)		Büyüme oranları (g)	
	Median	(min-max)	Median	(min-max)	Median	(min-max)	Median	(min-max)
K	215	(207-225)	308,5	(298-323,5)	97,1	(87,7-99,5)	0,68	(0,62-0,71)
P	218	(207,5-226)	293,5	(290-325,1)	83,5	(70-99,1)	0,59	(0,50-0,70)
T	213,5	(198-219)	295	(263,6-307,8)	80,2	(55-109,8)	0,56	(0,39-0,78)
T+P	219,7	(202-227)	312,5	(290-325,7)	90,8	(86,1-106,2)	0,64	(0,61-0,75)
D	208,6	(203,8-228)	255,5	(245-260)	44,5 ^a	(32-53,7)	0,31 ^a	(0,23-0,38)
D+P	205,6	(201-217,5)	277	(256,4-287,2)	67,5 ^b	(55,4-81)	0,47 ^b	(0,39-0,57)
D+T	210	(200-214,3)	269,7	(265-280)	66 ^{bb}	(55-69,4)	0,46 ^{bb}	(0,39-0,49)
D+T+P	210	(200,7-220)	280	(274,5-310,5)	71,9 ^b	(65,5-90,5)	0,50 ^b	(0,46-0,64)

^a p<0,001: Kontrol (K) grubuna göre (One-way ANOVA, Bonferroni testi)

^b p<0,001, ^{bb} p<0,005: DMBA (D) grubuna göre (One-way ANOVA, Bonferroni testi)

5.3. Gruplara Ait Biyokimyasal Bulgular

5.3.1. Plazma CA 15-3 ve CEA Düzeyleri

Plazma CA 15-3 düzeyleri median değerleri DMBA grubunda (36,35 ng/mL) kontrol grubuna göre (11,35 ng/mL) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek tespit edildi (p=0,001). DMBA grubu ile D+P (17,72 ng/mL), D+T (18,99 ng/mL) ve D+P+T (18,44 ng/mL) grupları karşılaştırıldığında ise tüm tedavi

gruplarında plazma CA 15-3 düzeyleri'nin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü belirlenmiştir (3 grup için; $p<0,05$) (Tablo 15, Şekil 31).

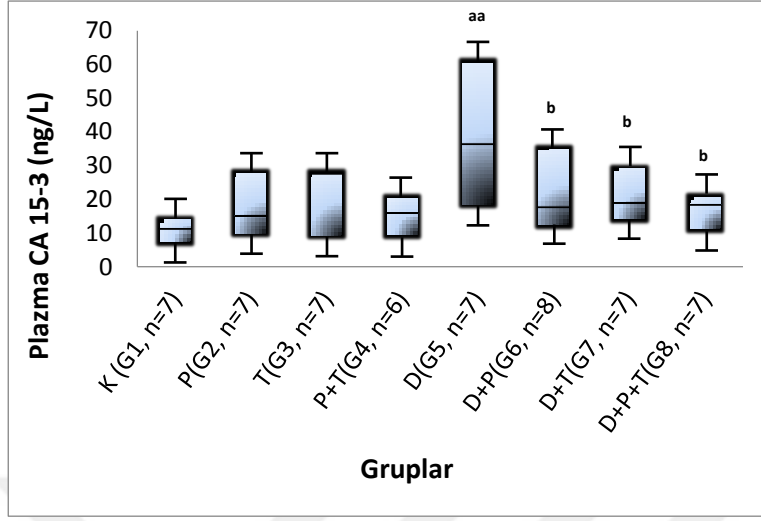
Plazma CEA düzeyleri median değerleri DMBA grubunda (4,47 ng/mL) kontrol grubuna göre (2,80 ng/mL) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek tespit edildi ($p=0,01$). DMBA grubu ile D+P (3,99 ng/mL), D+T (3,61 ng/mL) ve D+P+T (3,6 ng/mL) grupları karşılaştırıldığında ise tüm tedavi gruplarında plazma CEA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düşük tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Tablo 15, Şekil 32).

Tablo 15. Plazma Tümör Belirteçleri Düzeyleri

Gruplar	CA 15-3 (ng/L)		CEA (ng/ml)	
	Median	(min-max)	Median	(min-max)
K (G1, n=7)	11,35	(7,49-13,92)	2,80	(2,22-3,41)
P (G2, n=7)	15,08	(10,02-27,65)	3,45	(2,16-4,13)
T (G3, n=7)	16,95	(9,33-19,71)	3,53	(2,60-4,05)
P+T (G4, n=6)	16,02	(9,54-20,38)	3,09	(2,11-4,15)
D (G5, n=7)	36,35 ^{aa}	(18,54-60,58)	4,47 ^{aa}	(4,00-8,70)
D+P (G6, n=8)	17,72 ^b	(12,61-34,93)	3,99 ^b	(2,80-5,24)
D+T (G7, n=7)	18,99 ^b	(14,25-29,05)	3,61 ^b	(2,79-4,25)
D+P+T (G8, n=7)	18,44 ^b	(11,33-20,59)	3,60 ^b	(2,93-4,42)

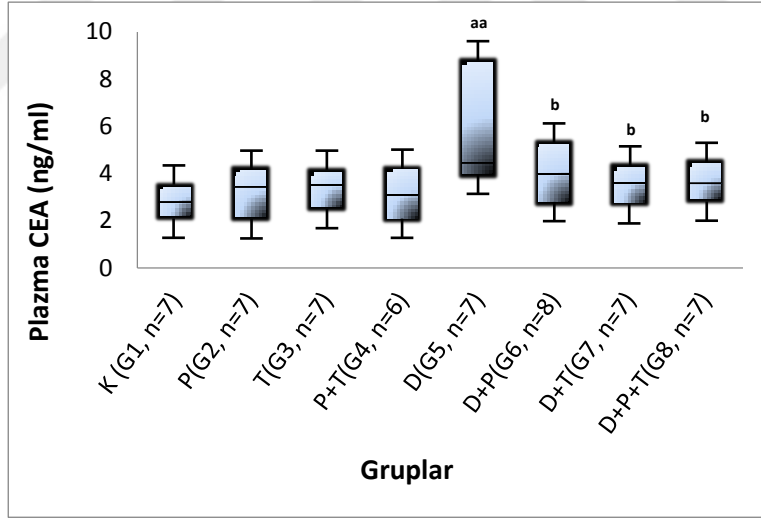
^{aa} $p=0,001$: Kontrol (K, G1) grubuna göre (Mann-Whitney U testi)

^b $p<0,05$: DMBA (D, G5) grubuna göre (Kruskal-Wallis, Dunn testi)



Şekil 31. Gruplara Ait Plazma CA 15-3 Düzeyleri

^{aa} p=0,001: Kontrol (K, G1) grubuna göre (Mann-Withney U testi)
^b p<0,05: DMBA (D, G5) grubuna göre (Kruskal-Wallis, Dunn testi)



Şekil 32. Gruplara Ait Plazma CEA Düzeyleri

^{aa} p=0,001: Kontrol (K, G1) grubuna göre (Mann-Withney U testi)
^b p<0,05: DMBA (D, G5) grubuna göre (Kruskal-Wallis, Dunn testi)

5.3.2. Plazma VEGF, MMP-9 ve NF-κB Düzeyleri

Plazma VEGF düzeyleri median değerleri DMBA grubunda (430,96 ng/mL) kontrol grubuna (203,66 ng/mL) oranla yüksek tespit edildi ve istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,001$). DMBA grubu ile D+P (265,5 ng/mL), D+T (264,98 ng/mL) ve D+P+T (234,88 ng/mL) grupları karşılaştırıldığında ise, tedavi gruplarının tümünde plazma VEGF düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmaların olduğu gözlenmiştir (3 grup için; $p<0,05$) (Tablo 16, Şekil 33).

Plazma MMP-9 düzeyleri median değerleri açısından karşılaştırıldığında DMBA grubunda (1,5 ng/mL) kontrol grubuna (0,96 ng/mL) göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,005$). DMBA grubu ile D+P (1,22 ng/mL), D+T (1,34 ng/mL), D+P+T (1,15 ng/mL) gruplarının karşılaştırılmalarında ise tüm tedavi gruplarında azalmış MMP-9 düzeyleri tespit edilirken bu azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi (Tablo 16, Şekil 34).

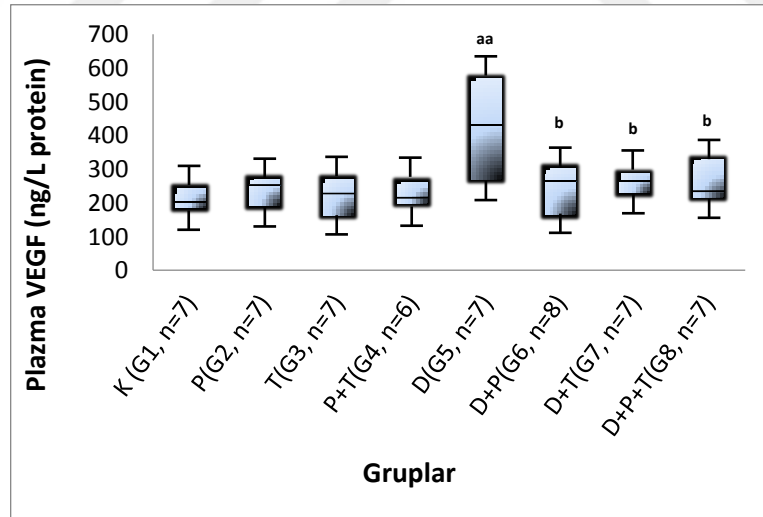
NF-κB düzeyleri median değerleri DMBA grubunda (3,46 ng/mL) kontrol grubuna göre (1,91 ng/mL) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu ($p<0,005$). DMBA grubu ile tedavi grupları karşılaştırıldığında hem D+P (2,35 ng/mL) grubunda ($p<0,05$) hem de D+P+T (2,28 ng/mL) grubunda ($p<0,05$) NF-κB düzeylerinde istatistiksel anlamlı azalışlar tespit edilirken D+T (2,36 ng/mL) grubundaki azalma ise istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Tablo 16, Şekil 35).

Tablo 16. Plazma Anjiyogenez Düzeyleri

Gruplar	VEGF		MMP-9		NF-κB	
	(ng / L protein)		(ng / L protein)		(ng / mL protein)	
	Median	(min-max)	Median	(min-max)	Median	(min-max)
K	203,66	(187,09-244,42)	0,96	(0,86-1,23)	1,91	(1,55-2,63)
P	252,58	(193,11-269,20)	1,01	(0,85-1,67)	1,84	(1,78-2,11)
T	228,26	(164,61-270,10)	1,12	(0,78-1,35)	2,01	(1,61-2,26)
P+T	215,35	(200,16-262,02)	1,03	(0,80-1,41)	1,75	(1,54-2,13)
D	430,96 ^{aa}	(271,16-568,48)	1,50 ^a	(1,07-2,12)	3,46 ^a	(2,34-5,06)
D+P	265,50 ^b	(165,43-302,52)	1,22	(1,11-1,97)	2,35 ^b	(1,97-3,55)
D+T	264,98 ^b	(230,93-286,47)	1,34	(0,80-1,90)	2,36	(2,27-3,92)
D+P+T	234,88 ^b	(217,71-327,73)	1,15	(1,04-1,68)	2,28 ^b	(2,01-2,68)

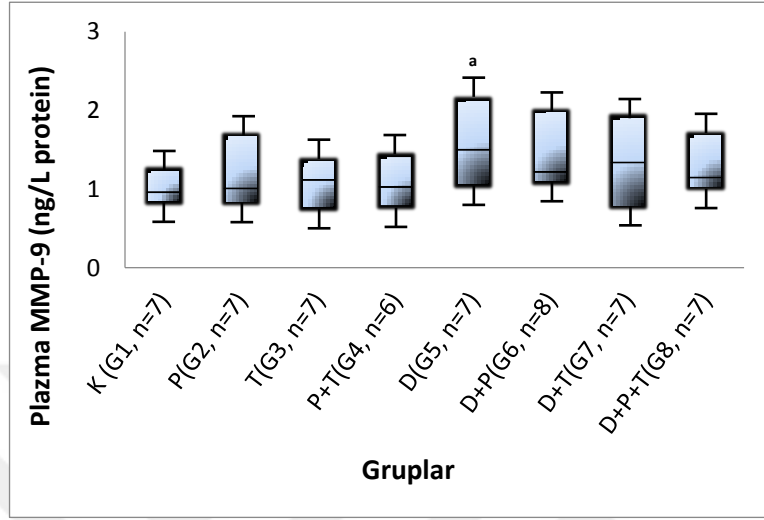
^{aa} p=0,001; ^a p<0,005 Kontrol grubuna göre (Mann-Withney U testi)

^b p<0,05: DMBA grubuna göre (Kruskal-Wallis, Dunn testi)

**Şekil 33.** Gruplara Ait Plazma VEGF Düzeyleri

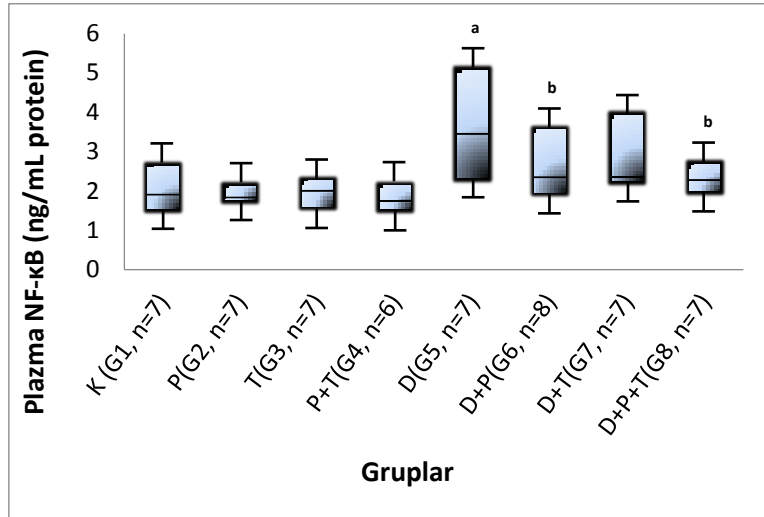
^{aa} p=0,001; ^a p<0,005: Kontrol grubuna göre (Mann-Withney U testi)

^b p<0,05: DMBA grubuna göre (Kruskal-Wallis, Dunn testi)



Şekil 34. Gruplara Ait Plazma MMP-9 Düzeyleri

^a $p < 0,005$: Kontrol grubuna göre (Mann-Withney U testi)



Şekil 35. Gruplara Ait Plazma NF-κB Düzeyleri

^a $p < 0,005$: Kontrol grubuna göre (Mann-Withney U testi)

^b $p < 0,05$: DMBA grubuna göre (Kruskal-Wallis, Dunn testi)

5.3.3. Doku Oksidan ve Anti-Oksidan Düzeyleri

Doku MDA düzeyleri median değerleri DMBA grubunda (63,35 nmol/g protein) kontrol grubuna göre (24,38 nmol/g protein) istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p=0,001$). DMBA grubu ile D+P (51,05 nmol/g protein), D+T (57,94 nmol/g protein), D+P+T (33,5 nmol/g protein) gruplarının karşılaştırılmasında ise, tüm tedavi gruplarındaki doku MDA düzeyleri azalma göstermiş olup istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma sadece iki ilacın birlikte uygulandığı D+P+T tedavi grubunda tespit edilmiştir ($p\leq 0,005$) (Tablo 17, Şekil 36).

Doku SOD aktivite düzeyleri median değerlerinin DMBA grubunda (610,7 U/g protein) kontrol grubuna göre (987,69 U/g protein) istatistiksel açıdan önemli bir şekilde azaldığı gözlenmiştir ($p\leq 0,005$). DMBA grubu ile D+P (754,19 U/g protein), D+T (686 U/g protein), D+P+T (759,74 U/g protein) gruplarının karşılaştırılmasında, tedavi gruplarının tümünde doku SOD aktivite düzeyleri artmış fakat istatistiksel açıdan bir anlamlılık göstermemiştir (Tablo 17, Şekil 37).

Doku CAT aktivite düzeyleri median değerlerinin DMBA grubunda (0,084 k/g protein) kontrol grubuna kıyasla (0,216 k/g protein) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yaklaşık 2.5 kat kadar düşük olduğu tespit edilmiştir ($p\leq 0,005$). D+P (0,231 k/g protein), D+T (0,168 k/g protein), D+P+T (0,192 k/g protein) tedavi gruplarında DMBA grubuna göre, doku CAT aktivite düzeylerinin yüksek olduğu ancak istatistiksel açıdan önemli olmadığı tespit edilmiştir. (Tablo 17, Şekil 38).

Doku GSH-Px aktivite düzeyleri median değerleri DMBA grubunda (923,36 U/g protein) kontrol grubuna göre (2359,71 U/g protein) istatistiksel olarak önemli şekilde azalma göstermiştir ($p\leq 0,005$). D+P (1395,58 U/g protein),

D+T (1519,22 U/g protein), D+P+T (1477,38 U/g protein) tedavi gruplarında DMBA grubuna göre, GSH-Px aktivite düzeylerinin artmış olduğu gözlemlenirken, bu artışların istatistiksel olarak önem taşımadıkları kaydedildi. (Tablo 17, Şekil 39).

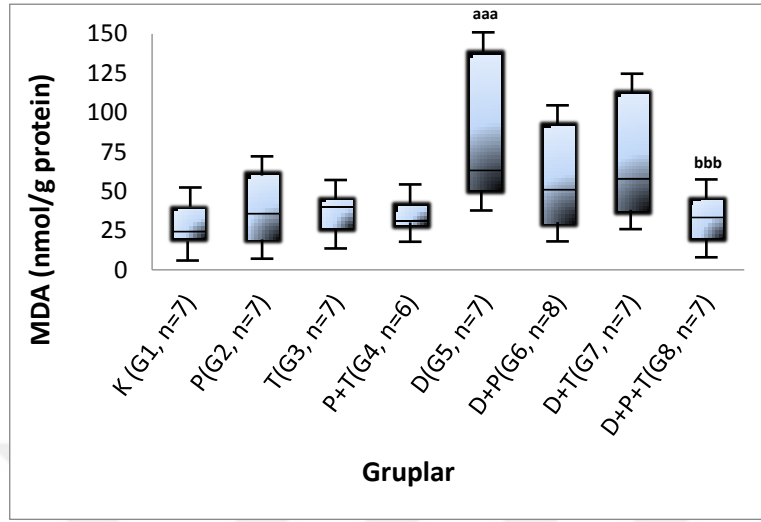
Doku GSH düzeyleri median değerleri açısından DMBA grubunda (0,672 μ mol/g protein) kontrol grubu (12,110 μ mol/g protein) ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde, yaklaşık olarak 20 kat düşük olduğu saptanmıştır ($p=0,001$). DMBA grubu ile D+P (3,889 μ mol/g protein), D+T (2,170 μ mol/g protein) ve D+P+T (3,745 μ mol/g protein) gruplarının mukayesesinde ise, tedavi gruplarının hepsinde doku GSH düzeyleri istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde artmıştır (sırası ile $p<0,01$; $p<0,05$ ve $p<0,01$) (Tablo 17, Şekil 40).

Tablo 17. Gruplararası Oksidan ve Anti-Oksidan Düzeylerinin Karşılaştırılması

Gruplar	MDA (nmol/g protein)		SOD (U/g protein)		CAT (k/g protein)		GSH-Px (U/g protein)		GSH (μmol/g protein)	
	Median	(min-max)	Median	(min-max)	Median	(min-max)	Median	(min-max)	Median	(min-max)
K	24,38	(20,64-38,18)	987,69	(700,48-1123,86)	0,21	(0,10-0,49)	2359,71	(886,28-3803,72)	12,11	(5,57-12,66)
P	35,87	(19,65-60,03)	986,39	(626,22-1246,40)	0,22	(0,13-0,34)	2503,12	(1941,75-4285,75)	11,08	(3,73-17,77)
T	40,15	(26,86-43,94)	688,23	(254,46-783,60)	0,22	(0,14-0,26)	2878,21	(1517,81-3632,45)	8,92	(3,85-15,63)
P+T	31,09	(28,76-40,59)	851,22	(649,84-1024,47)	0,20	(0,15-0,50)	2960,44	(1463,39-4032,70)	11,25	(7,55-15,90)
D	63,35 ^{aaa}	(51,13-136,87)	610,70 ^{aa}	(403-961,92)	0,08 ^a	(0,04-0,21)	923,36 ^{aa}	(496,78-1887,77)	0,67 ^{aaa}	(0,55-1,52)
D+P	51,05	(29,82-91,46)	754,19	(700,43-948,18)	0,23	(0,10-0,29)	1395,58	(983,50-2398,98)	3,88 ^{bb}	(1,46-6,41)
D+T	57,94	(37,64-111,93)	686	(412,67-939,62)	0,17	(0,13-0,24)	1519,22	(779-2042,25)	2,17 ^b	(1,02-5,51)
D+P+T	33,50 ^{bbb}	(20,68-43,86)	759,74	(529,15-927,19)	0,19	(0,09-0,35)	1477,38	(1009,28-5919,28)	3,74 ^{bb}	(1,46-8,57)

^a p<0,05; ^{aa} p≤0,005; ^{aaa} p=0,001: Kontrol (K) grubuna göre (Mann-Withney U testi)

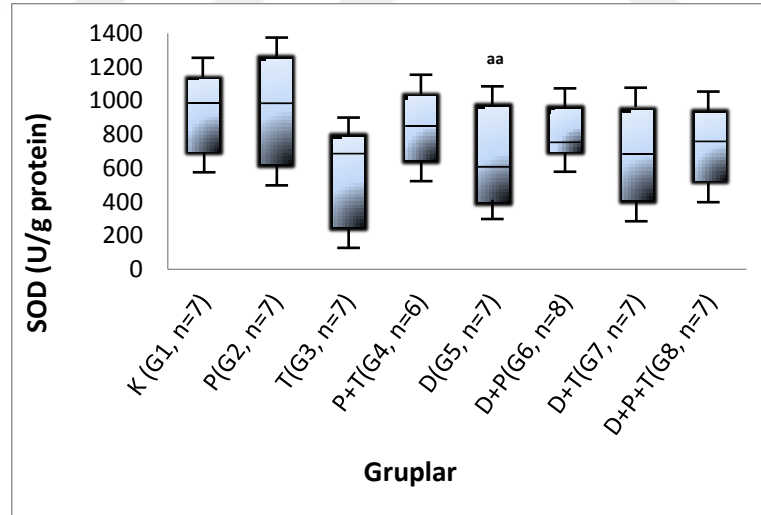
^b p<0,05; ^{bb} p<0,01; ^{bbb} p≤0,005: DMBA (D) grubuna göre (Kruskal-Wallis, Dunn testi)



Şekil 36. Gruplararası Doku MDA Düzeylerinin Karşılaştırılması

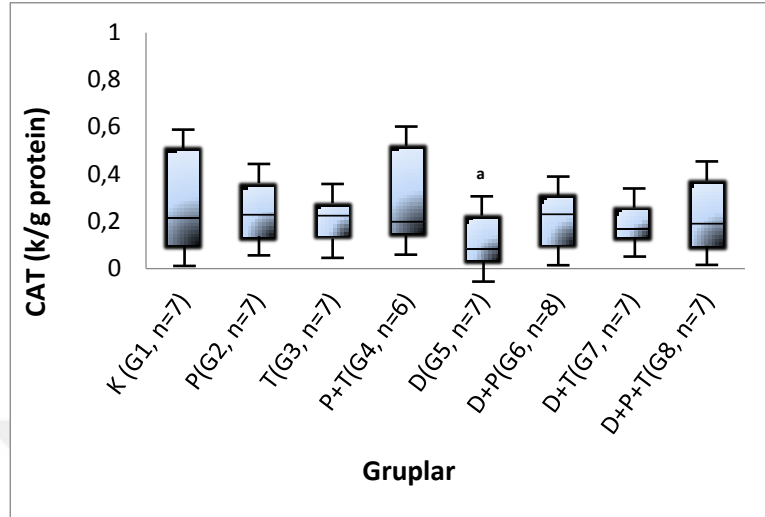
^{aaa} $p=0,001$: Kontrol (K) grubuna göre (Mann-Withney U testi)

^{bbb} $p\leq 0,005$: DMBA (D) grubuna göre (Kruskal-Wallis, Dunn testi)



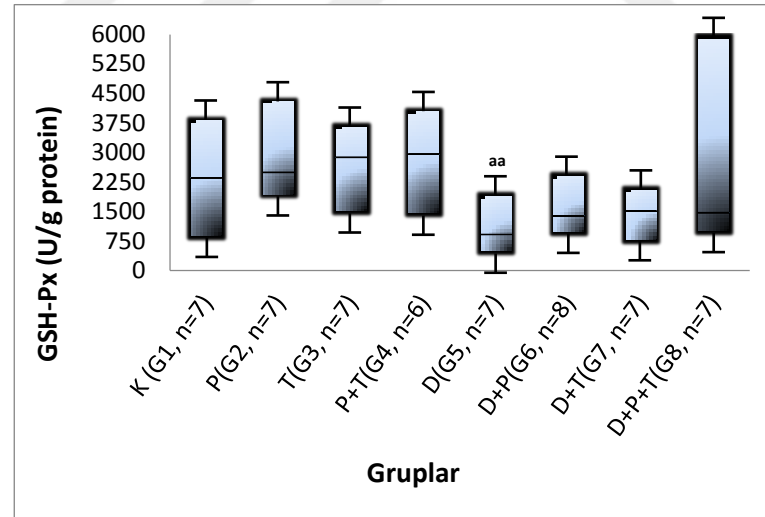
Şekil 37. Gruplararası Doku SOD Aktivitesinin Karşılaştırılması

^{aa} $p\leq 0,005$: Kontrol (K) grubuna göre (Mann-Withney U testi)



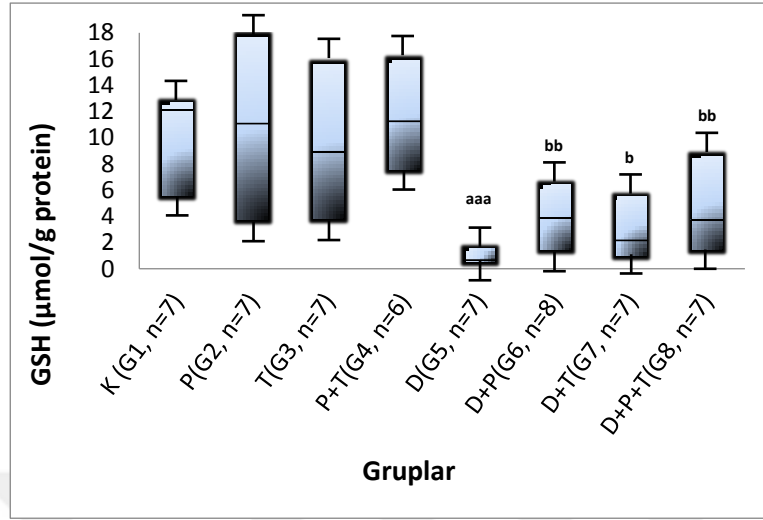
Şekil 38. Gruplararası Doku CAT Aktivitesinin Karşılaştırılması

^a $p < 0,05$; Kontrol (K) grubuna göre (Mann-Withney U testi)



Şekil 39. Gruplararası Doku GSH-Px Aktivitesinin Karşılaştırılması

^{aa} $p \leq 0,005$; Kontrol (K) grubuna göre (Mann-Withney U testi)



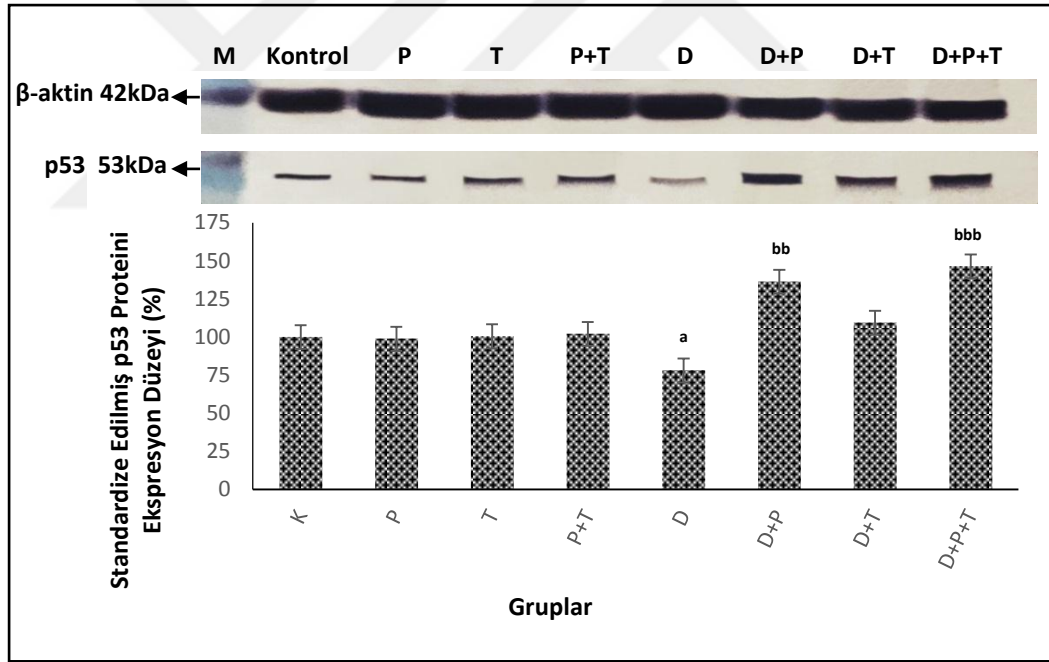
Şekil 40. Gruplararası Doku GSH Düzeylerinin Karşılaştırılması

^{aaa} p=0,001: Kontrol (K) grubuna göre (Mann-Withney U testi)

^b p<0,05; ^{bb} p<0,01: DMBA (D) grubuna göre (Kruskal-Wallis, Dunn testi)

5.3.4. Doku p53 Proteinini Ekspresyon Düzeyleri

Western blot analizine göre, meme dokusundaki p53 protein ekspresyon düzeyleri, kontrol (%100) grubuna göre DMBA (%78) grubunda istatistiksel olarak %22 oranında daha düşük gözlenmiştir ($p<0,01$). Tedavi grupları DMBA ile karşılaştırıldığı zaman, doku p53 protein ekspresyon düzeyleri D+P (%136) ve D+P+T (%146) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artışlar gösterirken D+T (%109) grubundaki artışın ise istatistiksel olarak önemsiz olduğu saptanmıştır (Şekil 41).



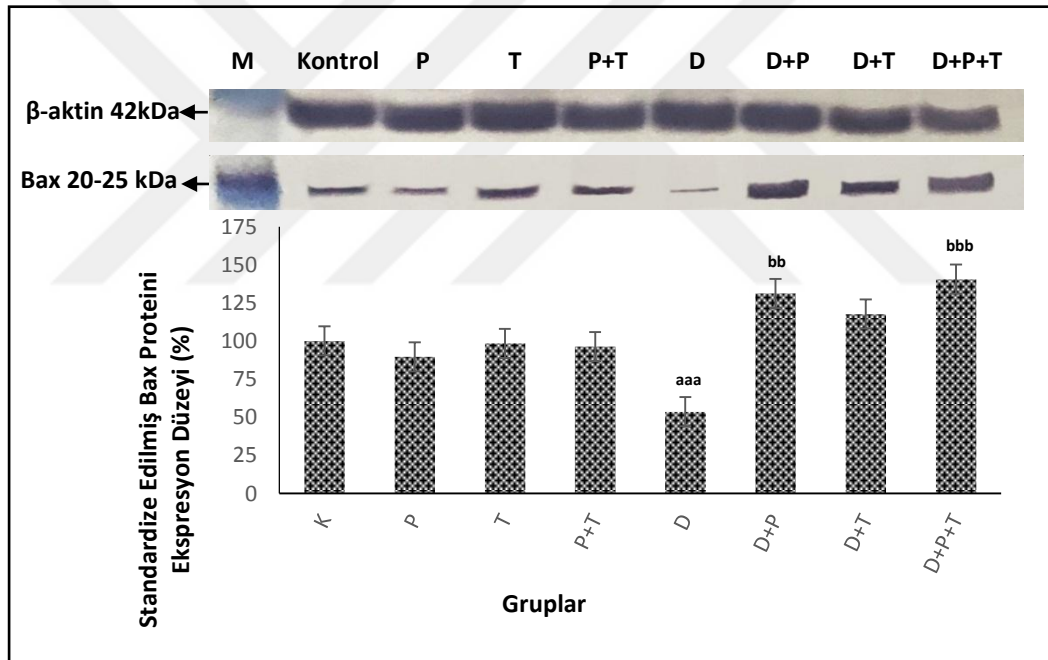
Şekil 41. Gruplara göre Doku p53 Proteinini Ekspresyon Düzeyleri (%)

^a $p<0,01$; ^{aa} $p<0,005$; ^{aaa} $p<0,001$: Kontrol (K) grubuna oranla (Mann-Whitney U testi)

^b $p<0,01$; ^{bb} $p<0,005$; ^{bbb} $p<0,001$: DMBA (D) grubuna oranla (Kruskal-Wallis, Dunn testi)

5.3.5. Doku Bax Proteinini Ekspresyon Düzeyleri

Şekil 42’de gösterilen Western blot histogramına göre, meme dokusundaki Bax protein ekspresyon düzeyleri, kontrol (%100) grubuna kıyasla DMBA (%53) grubunda önemli ($p \leq 0,001$) olarak %50’ye yakın bir oranda azaldığı tespit edilmiştir. Tedavi gruplarının DMBA ile kıyaslanması durumunda, doku Bax protein ekspresyon düzeylerinin D+P (%131) ve D+P+T (%140) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldikleri gözlenirken, D+T (%117) grubundaki yükselme ise istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.



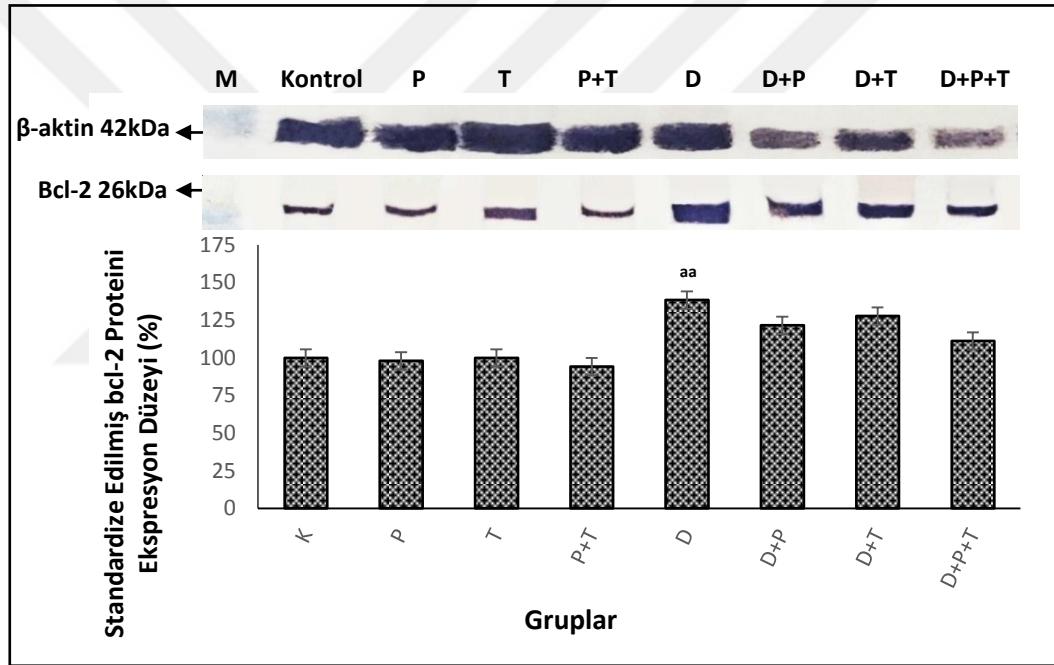
Şekil 42. Gruplara göre Doku Bax Protein Ekspresyon Düzeyleri (%)

^a $p < 0,01$; ^{aa} $p < 0,005$; ^{aaa} $p \leq 0,001$: Kontrol (K) grubuna oranla (Mann-Whitney U testi)

^b $p < 0,01$; ^{bb} $p < 0,005$; ^{bbb} $p < 0,001$: DMBA (D) grubuna oranla (Kruskal-Wallis, Dunn testi)

5.3.6. Doku Bcl-2 Proteinini Ekspresyon Düzeyleri

Şekil 43'deki histogram incelendiğinde meme dokusundaki Bcl-2 protein ekspresyon düzeyleri, kontrol (%100) grubuna oranla DMBA (%138) grubunda istatistiksel açıdan anlamlı ($p \leq 0,001$) olarak %38'lik bir oranda arttığı gösterilmektedir. D+P (%121), D+T (%127) ve D+P+T (%111) tedavi gruplarında, DMBA grubuna göre azalmış olarak saptanan doku Bcl-2 protein ekspresyon düzeyleri ise istatistiksel olarak anlamlı değildi.



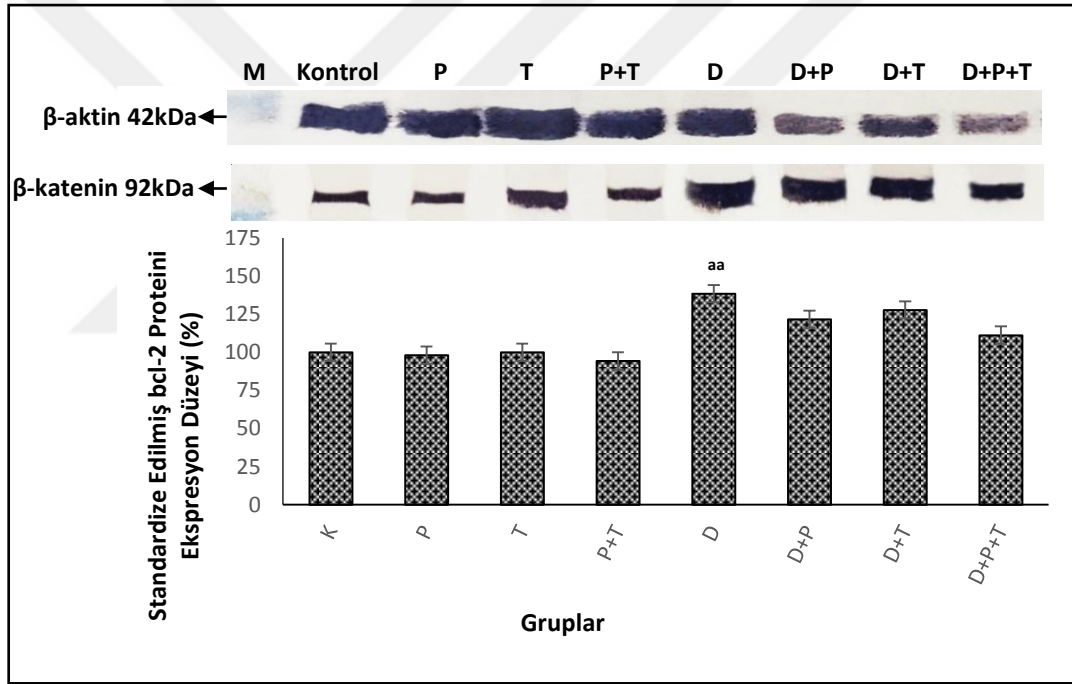
Şekil 43. Gruplara göre doku Bcl-2 Protein Ekspresyon Düzeyleri (%)

^a $p < 0,01$; ^{aa} $p < 0,005$; ^{aaa} $p \leq 0,001$: Kontrol (K) grubuna oranla (Mann-Whitney U testi)

^b $p < 0,01$; ^{bb} $p < 0,005$; ^{bbb} $p < 0,001$: DMBA (D) grubuna oranla (Kruskal-Wallis, Dunn testi)

5.3.7. Doku β -katenin Proteinini Ekspresyon Düzeyleri

Aşağıdaki şekil 44’de görüldüğü üzere β -aktinle standardize edilmiş doku β -katenin protein ekspresyon düzeyleri, kontrol (%100) grubuna göre DMBA (%140) grubunda istatistiksel olarak %40 oranında artmıştır ($p<0,005$). Doku β -katenin protein ekspresyon düzeylerinin D+P (%118), D+T (%122) ve D+P+T (%113) tedavi gruplarında, DMBA grubu ile oranlandığında düşük olduğu tespit edilmiş fakat bu düşüşler istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.



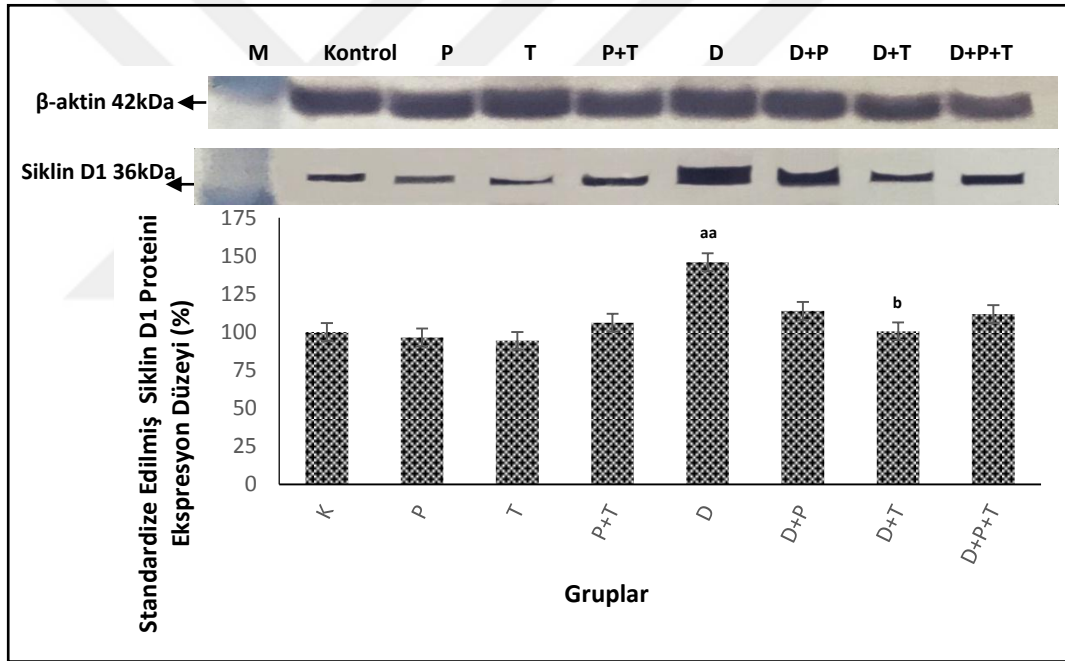
Şekil 44. Gruplara göre Doku β -katenin Protein Ekspresyon Düzeyleri (%)

^a $p<0,01$; ^{aa} $p<0,005$; ^{aaa} $p<0,001$: Kontrol (K) grubuna oranla (Mann-Withney U testi)

^b $p<0,01$; ^{bb} $p<0,005$; ^{bbb} $p<0,001$: DMBA (D) grubuna oranla (Kruskal-Wallis, Dunn testi)

5.3.8. Doku Siklin D1 Proteini Ekspresyon Düzeyleri

Meme dokusu Siklin D1 ekspresyonunu gösteren histogramda (Şekil 45) , normalize edilmiş doku Siklin D1 protein ekspresyon düzeyleri, kontrol (%100) grubuna göre DMBA (%145) grubunda %45 oranında yükselmiştir ve gruplar arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,005$). Ayrıca doku Siklin D1 ekspresyon düzeyleri, DMBA grubuna göre D+P (%138) , D+T (%100.5) ve D+P+T (%116) tedavi gruplarında azalmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık sadece D+T grubunda görülmüştür ($p<0,01$).



Şekil 45. Gruplara göre Doku Siklin D1 Protein Ekspresyon Düzeyleri (%)

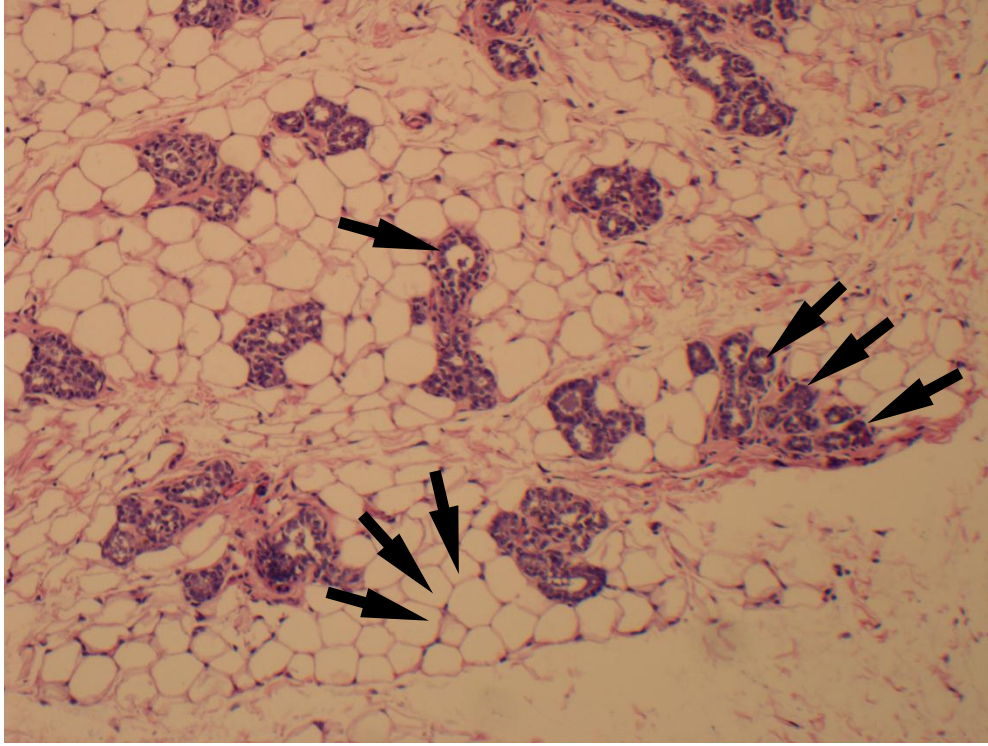
^a $p<0,01$; ^{aa} $p<0,005$; ^{aaa} $p\leq0,001$: Kontrol (K) grubuna oranla (Mann-Withney U testi)

^b $p<0,01$; ^{bb} $p<0,005$; ^{bbb} $p<0,001$: DMBA (D) grubuna oranla (Kruskal-Wallis, Dunn testi)

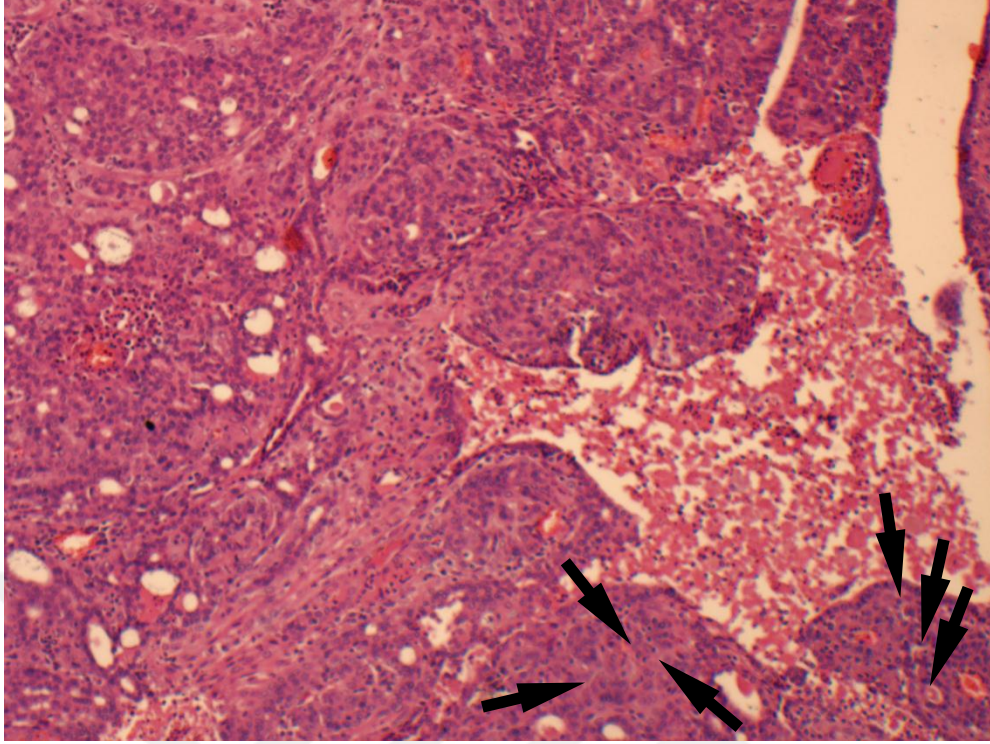
5.4. Histopatolojik, İmmunohistokimyasal Değerlendirme ve TUNEL Analizi

5.4.1. Histopatolojik Bulgular

Kanserli hücrelerin belirlenmesi için yapılan hemotoksilen-eozin boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucunda; sağlıklı sıçanlardan oluşan kontrol grubuna ait meme dokusu kesit alanlarında adipoz dokusu ve asinusleri şekil 46’ da gösterilmiştir. Kanserli sıçanlardan oluşan DMBA grubuna ait meme dokusu kesit alanlarında yer yer solid odaklar izlenmiş olup, duktus yapılarında oluşan invaziv duktal karsinom görünümü şekil 47’de gösterilmiştir.



Şekil 46. Kontrol Grubuna Ait Normal Meme Dokusunun Histopatolojik Görünümü (H&E 200X) (resmin ortasındaki tekli ok; duktal yapıları, resmin altındaki 3’lü oklar; adipoz dokuları, resmin sağındaki 3’lü oklar ise; asiner hücreleri göstermektedir)



Şekil 47. DMBA Grubuna Ait İnvaziv Duktal Karsinomlu Meme Dokusunun Histopatolojik Görünümü (H&E 200X) (resmin alt kısmındaki 3'lü oklar solid alanları, resmin sağ alt kısmındaki 3'lü oklar ise invaziv duktal yapıları göstermektedir)

Ayrıca histopatolojik değerlendirmeler sonucunda ki tüm gruplara ait tümör tutulum insidansları, tümör hacimleri ve tümör ağırlıkları aşağıdaki gibi (Şekil 48, Tablo18) gösterilmiştir.



Şekil 48. DMBA Grubuna Ait Memedeki Tümör Tutulumunun, Hacminin ve Ağırlığının Makroskopik Görünümü



Şekil 49. D+P Grubuna Ait Memedeki Tümör Tutulumunun, Hacminin ve Ağırlığının Makroskopik Görünümü



Şekil 50. D+T Grubuna Ait Memedeki Tümör Tutulumunun, Hacminin ve Ağırlığının Makroskopik Görünümü

Tablo 18. Gruplara Göre Tümör Tutulumu ve İnsidansı, Ortalama Tümör Hacimleri, Tümör Ağırlıklarının Dağılımı

Gruplar	Sıçan Sayısı	Tümör Tutulumu	Tümör İnsidansı (%)	Ortalama Tümör Hacimleri (cm ³)	Ortalama Tümör Ağırlıkları (g)
K	7	-	-	-	-
P	7	-	-	-	-
T	7	-	-	-	-
P+T	6	-	-	-	-
D	7	5*	71,42	5,1	1,49
D+P	8	1*	12,50	1,42	0,39
D+T	7	1*	14,28	0,28	0,29
D+P+T	7	-	-	-	-

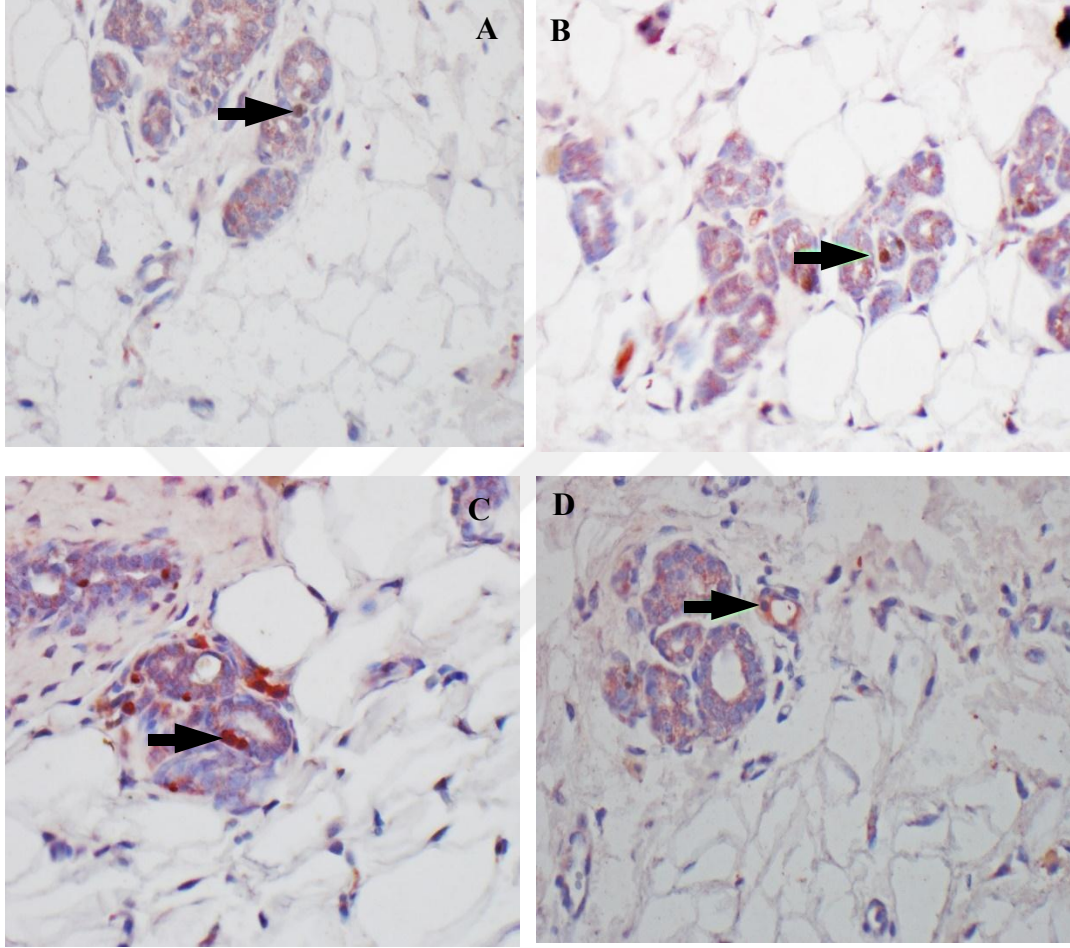
* tümörün histopatolojik çeşidini göstermektedir; oluşmuş tümör tutulumlarının %95'i invazif duktal karsinom tanısı almıştır.

5.4.2. İmmunohistokimyasal ve TUNEL Analiz Bulguları

ER- α

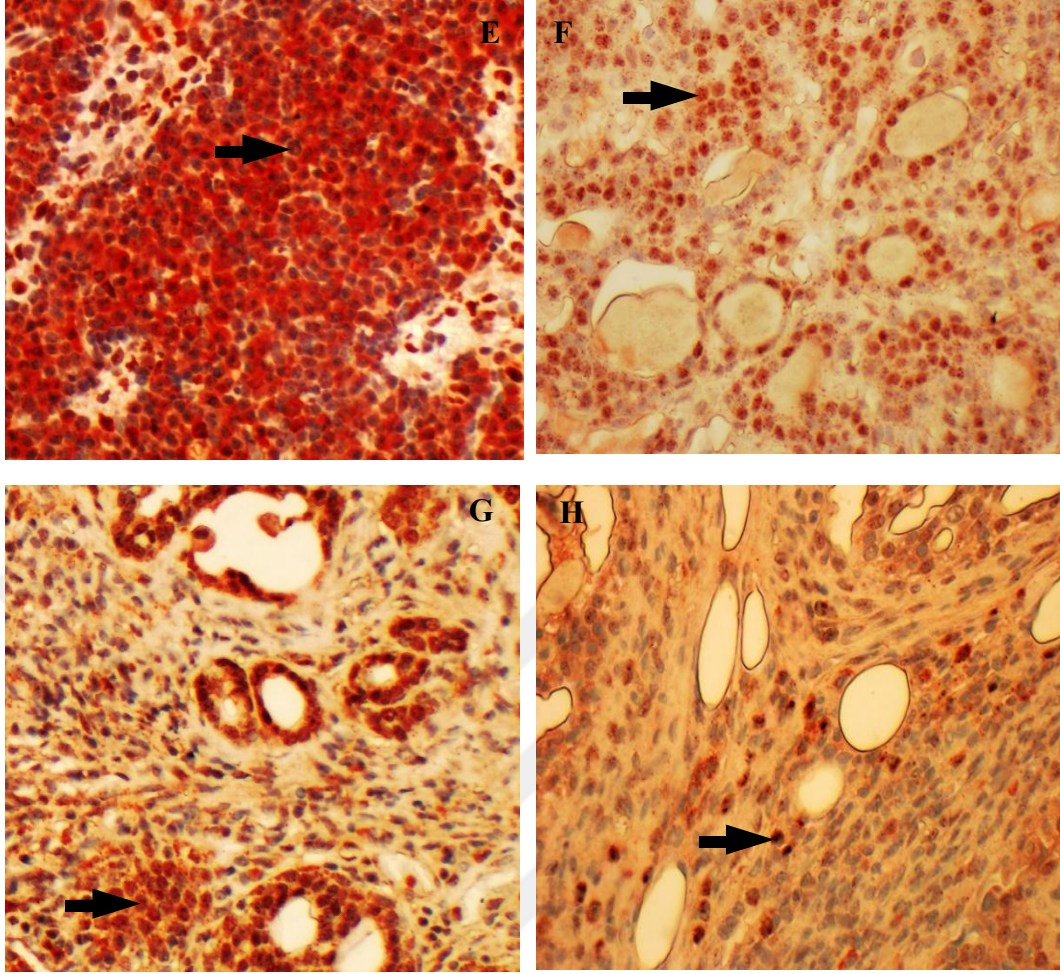
ER- α immune reaktivitesi için yapılan immunohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; ER- α immun reaktivitesi G1 (Şekil 51a), G2 (Şekil 51b), G3 (Şekil 51c), G4 (Şekil 51d) gruplarında benzer olarak izlendi. G1 grubu ile kıyaslandığında ER- α immun reaktivitesi G5 (Şekil 51e), G6 (Şekil 51f), G7 (Şekil 51g) ve G8 (Şekil 51h) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştı ($p<0,05$). Kanser grubu (G5) ile kıyaslandığında ise ER- α immun reaktivitesi tüm tedavi gruplarında (G6, G7 ve G8) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ($p<0,05$) izlendi. Ayrıca tedavi grupları

arasında ER- α reaktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık izlenmedi.



Şekil 51. A, B, C, D ER- α 'nın Gruplara Ait İmmunohistokimyasal Boyanma Özellikleri.(200X)

A: Kontrol; **B:** Pomegranat; **C:** Tangeretin; **D:** Pomegranat+Tangeretin



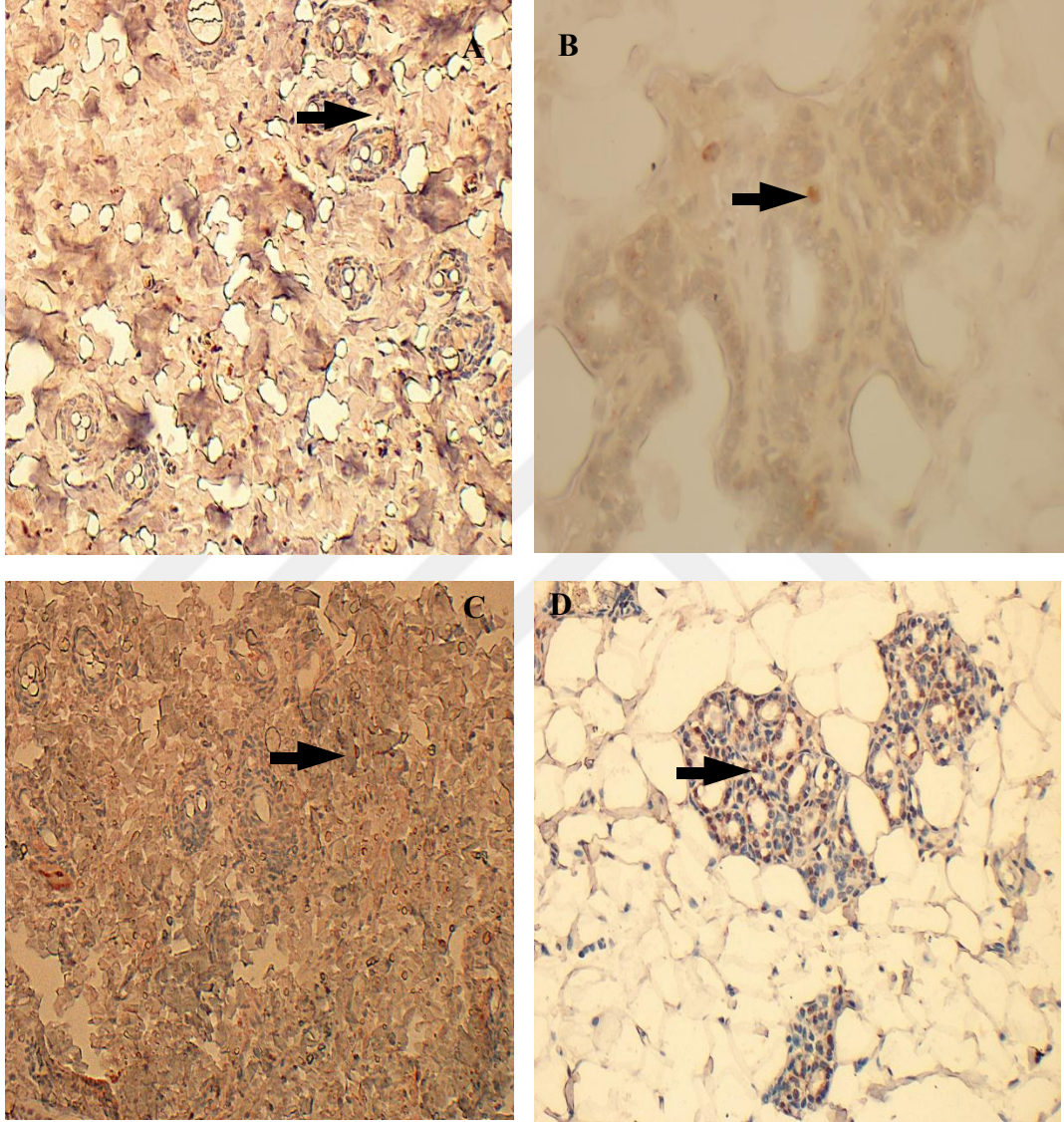
Şekil 51 E, F, G, H ER- α 'nın Gruplara Ait İmmunohistokimyasal Boyanma Özellikleri.(200X)

E: DMBA; F: D+P; G: D+T; H: D+P+T

Ki-67

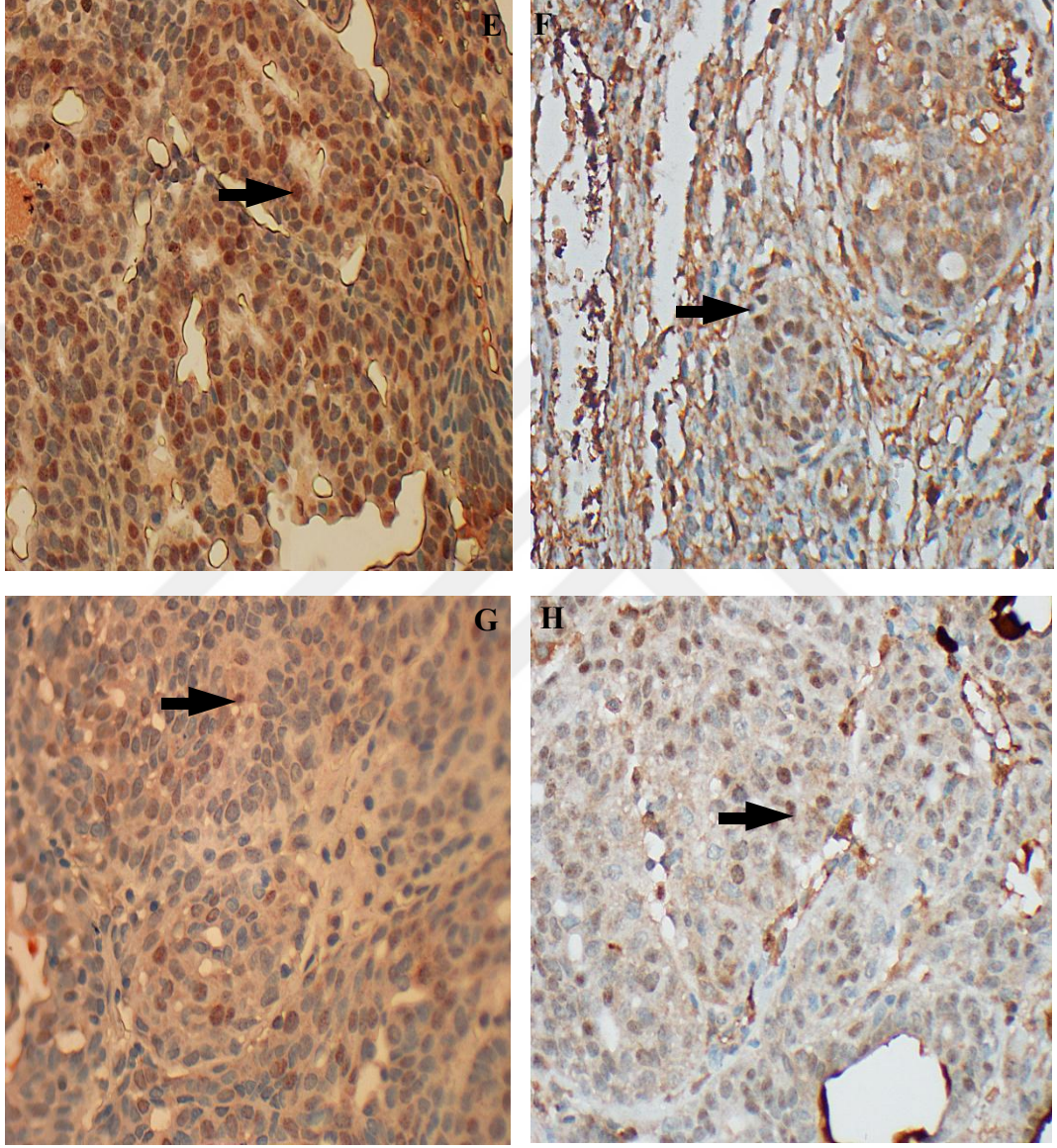
Ki-67 immün reaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; Ki-67 immün reaktivitesi G1 (Şekil 52a), G2 (Şekil 52b), G3 (Şekil 52c), G4 (Şekil 52d) gruplarında benzer olarak gözlemlendi. G1 grubu ile kıyaslandığında Ki-67 immün reaktivitesi G5 (Şekil 52e), G6 (Şekil 52f), G7 (Şekil 52g) ve G8 (Şekil 52h) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,05$). Kanseri grubu (G5) ile kıyaslandığında ise Ki-67 immün reaktivitesi tüm tedavi gruplarında (G6, G7, G8)

istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı saptandı ($p<0,05$). Ayrıca tedavi grupları arasında Ki-67 immün reaktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık izlenmedi.



Şekil 52 A, B, C, D Ki-67'nin Gruplara Ait İmmunohistokimyasal Boyanma Özellikleri.(200X)

A: Kontrol; B: Pomegranat; C: Tangeretin; D: Pomegranat+Tangeretin

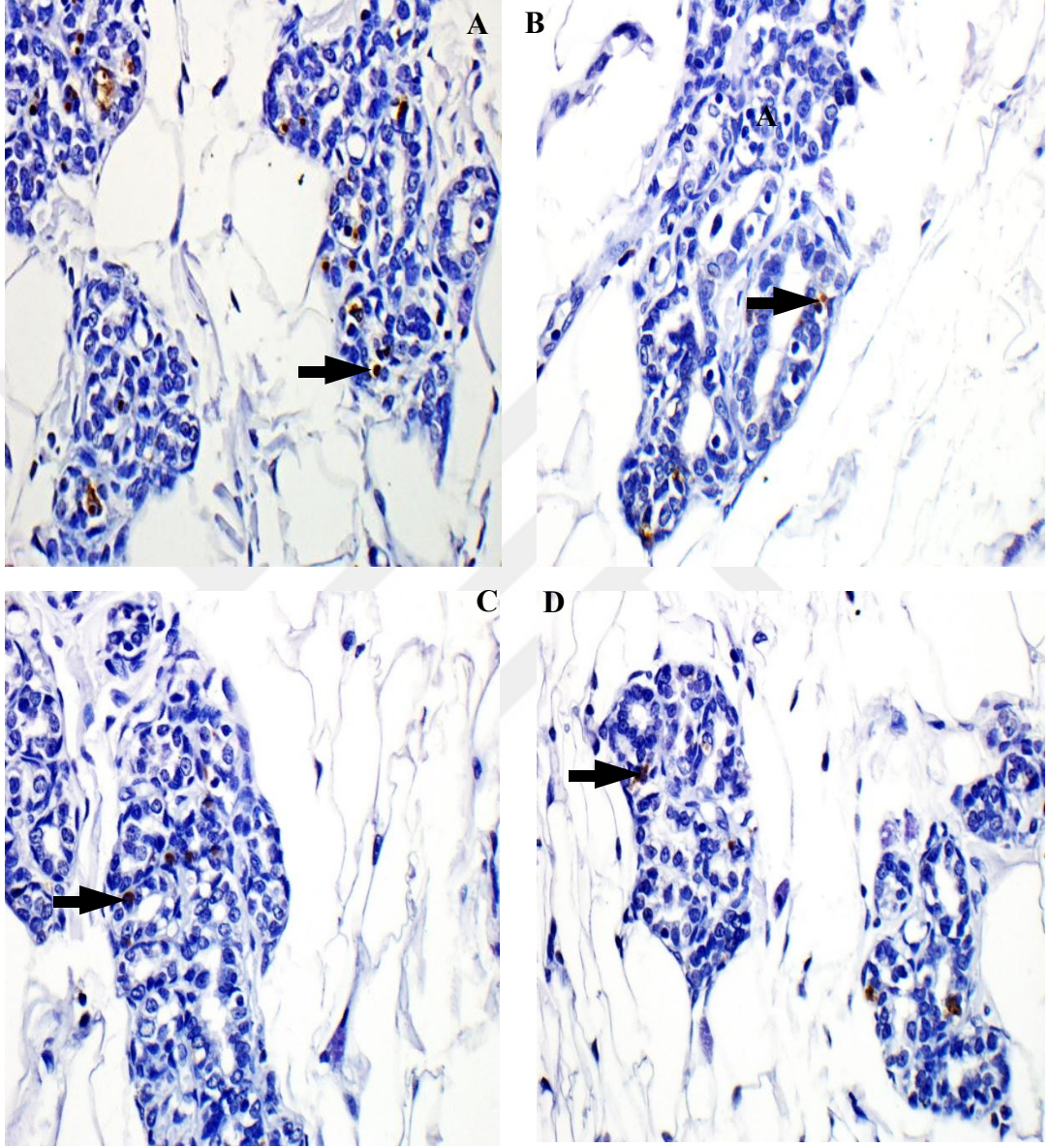


Şekil 52. E, F, G, H Ki-67'nin Gruplara Ait İmmunohistokimyasal Boyanma Özellikleri.(200x)

E: DMBA; F: D+P; G: D+T; H: D+P+T

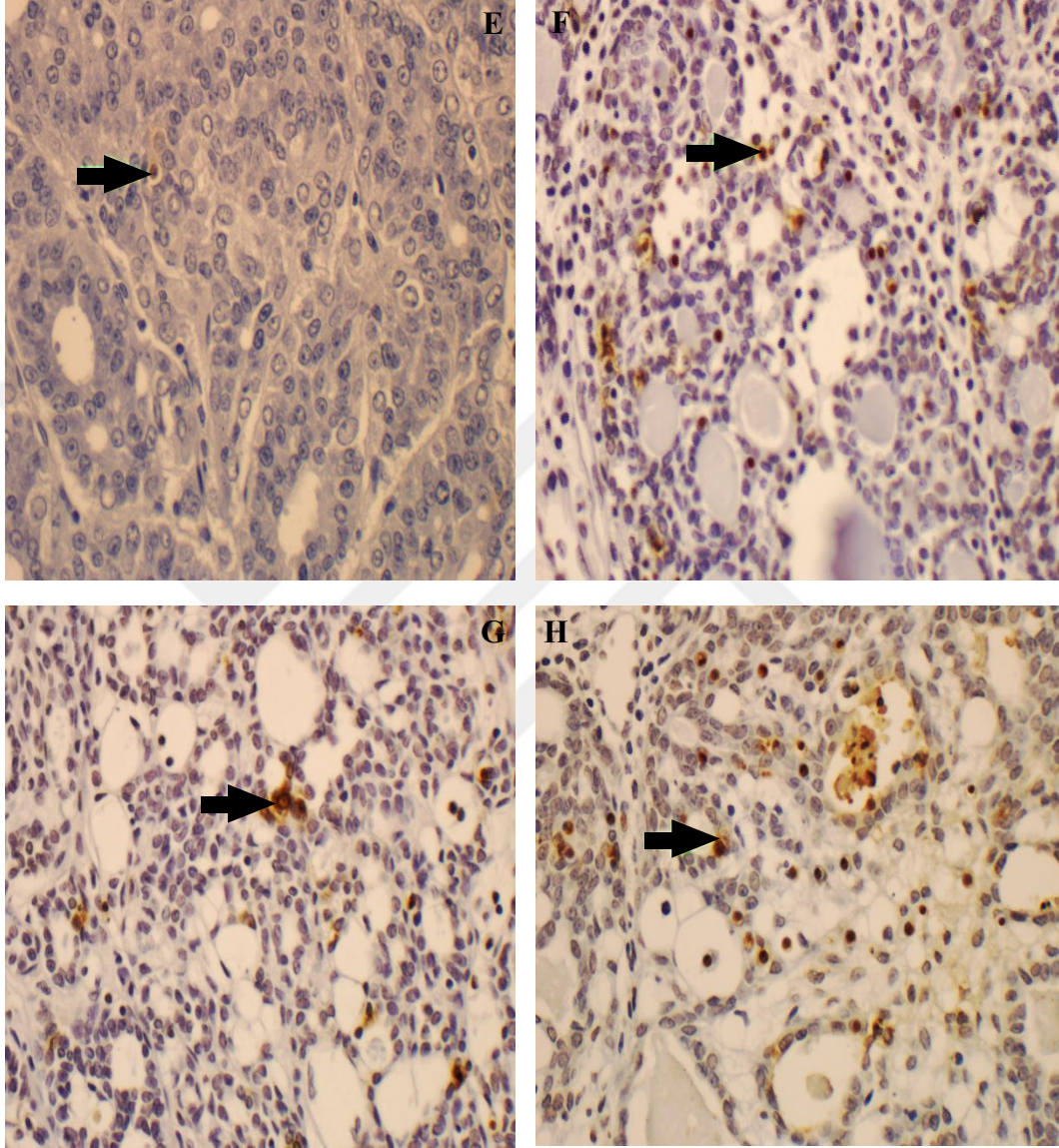
TUNEL

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucunda; TUNEL pozitifliği G1 (Şekil 53a), G2 (Şekil 53b), G3 (Şekil 53c) ve G4 (Şekil 53d) gruplarında benzer olarak izlendi. G1 grubu ile kıyaslandığında TUNEL pozitifliği G5 (Şekil 53e) grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştı ($p<0,05$). G5 grubu ile kıyaslandığında ise G6 (Şekil 53f) ve G8 (Şekil 53h) gruplarında TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış göstermiştir ($p<0,05$) ve kontrolden yüksek olarak saptanırken, bu pozitiflik G7 (Şekil 53g) grubunda istatistiksel olarak anlamlı değildi. G7 ve diğer tedavi grupları arasında (G6 ve G8); TUNEL pozitifliği açısından istatistiksel olarak bir farklılık olmadığı gözlemlendi.



Şekil 53. A, B, C, D Gruplara Ait TUNEL Boyanma ile Apoptotik Hücrelerin Gösterilmesi.(400X)

A: Kontrol; B: Pomegranat; C: Tangeretin; D: Pomegranat+Tangeretin



Şekil 53. E, F, G, H Gruplara Ait TUNEL Boyanma ile Apoptotik Hücrelerin Gösterilmesi.(400X)

E: DMBA; **F:** D+P; **G:** D+T; **H:** D+P+T

Tablo 19. İmmunohistokimya Histoskorları ve Apoptotik İndeks (%)

Gruplar	ER- α Histoskor		Ki-67 Histoskor		Apoptotik İndeks (%)	
	Normal doku	Malign doku	Normal doku	Malign doku	Normal doku	Malign doku
K	0,26 $\pm$ 0,12	-	0,23 $\pm$ 0,12	-	4,14 $\pm$ 1,77	-
P	0,29 $\pm$ 0,18	-	0,22 $\pm$ 0,11	-	2,57 $\pm$ 1,27	-
T	0,35 $\pm$ 0,18	-	0,27 $\pm$ 0,14	-	3,42 $\pm$ 0,97	-
P+T	0,25 $\pm$ 0,14		0,29 $\pm$ 0,16	-	3,33 $\pm$ 1,96	-
D	-	2,57 $\pm$ 0,34 ^a	-	2,57 $\pm$ 0,34 ^a	-	0,71 $\pm$ 0,48 ^a
D+P	-	0,92 $\pm$ 0,19 ^{ab}	-	0,88 $\pm$ 0,13 ^{ab}	-	4,25 $\pm$ 1,83 ^b
D+T	-	0,81 $\pm$ 0,32 ^{ab}	-	0,90 $\pm$ 0,32 ^{ab}	-	3,57 $\pm$ 1,27
D+P+T	0,52 $\pm$ 0,25 ^{ab}	-	0,6 $\pm$ 0,2 ^{ab}	-	4,28 $\pm$ 1,70 ^{ab}	-

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a p<0,05: Kontrol (K) grubuna oranla (One-way ANOVA, post-hoc Tukey HSD)

^b p<0,05: DMBA (D) grubuna kıyasla (One-way ANOVA, post-hoc Tukey HSD)

6. TARTIŞMA

Günümüzde meme kanseri için mevcut tedavi seçenekleri arasında cerrahi rezeksiyonlar, radyoterapi ve neo adjuvan/adjuvan kemoterapiler, hormon ve biyolojik tedaviler yer almaktadır. Meme kanserinin önlenmesi için çok sayıda kemoterapötik ilaç olmasına rağmen, zamanla bu ilaçlara karşı gelişen direnç ve ilaçların hastada oluşturdıkları ciddi yan etkiler, meme kanseri tedavisinin başarısını etkileyen iki önemli neden olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu gerçekler, daha etkili ve daha az toksik olan yeni alternatif ilaçların araştırılmasına ve geliştirilmesine olan ihtiyacı gözler önüne sermektedir.

Bu noktadan hareketle, meme kanseri ile mücadelede diyet/araçları ve/veya farmakolojik ve doğal aktif fitokimyasal molekülleri temsil eden kemoterapötiklerin (nutrasötikler) kullanımı meme kanseri oluşumunun önlenmesinde ihtiyatlı bir alternatif yaklaşım olabileceği düşünülmektedir (285, 288). Ayrıca bu konuda yapılacak olan araştırmalar, bitkisel preparatlar ile hastalıklar arasındaki mekanizmaların aydınlatılmasına ve meme kanserinin tedavisinde kullanılacak potansiyel kanser ilaçlarının oluşumuna ve geliştirilmesine de katkı sağlayacaktır (9). Son zamanlarda kanser hücrelerini yok etmek için gerçekleştirilen araştırmalarda, doğal ürün ya da bitkileri içeren terapötik ajanlarla hedefe yönelik tedaviler ön plana çıkmış ve bir dizi kompleks mekanizmalar gün yüzüne çıkmıştır. Nitekim bu mekanizmalar arasında; antioksidan aktivitenin artırılması/oksidatif stresin baskılanması, reseptör blokajı, Faz-I ve Faz-II enzim blokajları, apoptozun indüklenmesi, hücre proliferasyonunun inhibisyonu, anjiyogenetik yolların baskılanması, hücre siklus arrestinin indüklenmesi, onkogen ekspresyonunun inhibisyonu, hücre

adezyonu ve invazyonun inhibisyonu gibi çeşitli spesifik yolakların düzenlenmesi sayılabilir.

Tüm bu veriler doğrultusunda, bu çalışmada; meme kanserine karşı yapılan klasik tedavi yöntemlerinden kaynaklı maliyetlerin yüksek olması, kemoterapötik ajanların kullanılması sonucu oluşabilen yan etkilerin varlığı, tedavideki etkilerinin yetersiz olması ve bu konu hakkında var olan literatürdeki eksiklik göz önüne alınarak, uygulanacak tedavi ajanının Türkiye de yetişmesi, temin bakımından kolay ve ekonomik olması ve bu bağlamda gelecekte bu konuyla ilgili literatür desteği oluşturması bakımından Pomegranat ve Tangeretin doğal polifenolik ve flavonoid alternatif fitoterapi ajanlarının 7,12-Dimetilbenz [a] antrasen (DMBA) ile oluşturulmuş meme kanser modelinde kemopreventif etkilerinin kıyaslanması ve birlikte uygulanmalarının potansiyel etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

DMBA, tümör oluşturmak için metabolik aktivasyona gereksinim duymaktadır. Bu nedenle antikarsinojenik ajanların etkilerini değerlendirmede, tümörün başlangıç ve ilerleme dönemlerindeki metabolizma ve aktivasyonunu gözlemlemede kullanışlı bir modeldir (386). DMBA ile oluşturulmuş sıçan meme karsinogenez modeli, kemoterapötik ajanların *in-vivo* etkilerini araştırmak için bilinen en iyi sistem olduğu ifade edildiğinden, çalışmada sıçanlarda meme kanseri indüklenmesinde bu model kullanılmıştır (389, 390).

Çalışmada; hayvanların başlangıç ve nihai vücut ağırlıklarının karşılaştırılmasında, kontrol grubu ile P, T ve P+T grupları arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, Sham grubu olarak dizayn edilen bu 4 grupta bulunan sıçanların vücut ağırlıklarının normal bir oranda arttığı

saptanmıştır (Tablo 14). DMBA verilen gruplardaki sıçanlarda vücut ağırlıkları ve büyüme oranları median değerlerinin ise kontrollere göre istatistiksel olarak önemli derecede düşük olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$) (Tablo 14). Tüm tedavi gruplarındaki (D+P; D+T; D+P+T) sıçanların vücut ağırlıkları ve büyüme oranlarının kanser (DMBA) grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (sırası ile $p<0,001$; $p<0,005$; $p<0,001$) (Tablo 14). Çalışmada DMBA ile meme kanserinin indüklendiği sıçanlarda, kontrollere göre kilo alımı ve büyüme oranlarında önemli azalmaların saptanması ayrıca Pomegranat ve Tangeretin'in oral kemopreventif olarak uygulanması sonucu canlı ağırlık artışı ve büyüme oranlarında önemli artışların olması literatür bilgileri ile uyum göstermektedir (338, 410). Periyasamy ve ark. (324), tarafından yapılan DMBA ile meme kanseri oluşturulan in-vivo çalışmada; kanserli gruplardaki deneklerin vücut ağırlıklarında gözlenen düşüşü, çoğalan kanser hücrelerinin azaltılmasında rol oynayan, ksenobiyotiklere karşı organizmanın geliştirdiği doğal savunma sistemleri ile açıklayarak, DMBA'nın etkisi ile kanserli hayvanlarda reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu geliştiğini savunurken, oral tangeretin ile tedavi edilen gruplardaki sıçanların vücut ağırlığındaki önemli artışları ise (kontrole yakın değerler), tangeretin'in toplam antioksidan düzeyleri artırması ile açıklamışlardır. Artan antioksidan düzey, serbest radikal kaynaklı oksidatif hasara karşı gelişen, normal yapısal ve biyokimyasal süreç lehine koruyucu mekanizma ile sonuçlanabilir ve hayvanlarda canlı ağırlık kazancı ile kendini gösterebilir. Bu görüşlere ilave olarak, yaptığımız makroskobik izlemelerimize göre, kanserli hayvanlardaki kilo kaybı, artmış lipid peroksidasyonun bir sonucu olarak hayvanlarda anoreksiye sebep olabileceği

düşünülmekte ve fitoterapötik ajanlarımızla sıçanlardaki artmış anoreksi bulgularının yağ dokusundaki aşırı peroksidasyonun ve kas kayıplarının önüne geçerek, sıçanlarda canlı ağırlık kazançlarının tekrardan geri kazanılmasına neden olduğunu düşünmekteyiz.

Yapılarında doğal polifenol ve flavonoid içeren antioksidan bileşiklerle oksidatif stresin baskılanması, bazı kanser çeşitlerinde başlangıç ve ilerleme safhalarının engellemesinde etkili bir yaklaşım olarak kabul görmektedir (300, 373).

DMBA'nın da içinde bulunduğu polisiklik aromatik hidrokarbonlar, canlıda serbest radikallerin üretilmesine neden olarak oksidatif stres kaynaklı kanserlerin gelişiminde önemli payları olan potansiyel bir mutajenik ve kanserojenik ajanlar olarak görülmektedir (324). Bu radikaller hücre zarları ve hücresel organeller için oldukça toksik olup, aynı zamanda birçok makromoleküllerle etkileşime girerek onların yapı ve fonksiyonlarının bozulmasına neden olurlar. Bu radikallerin çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girmeleri sonucu ortaya çıkan lipid peroksidasyonunun son ürünü MDA oluşmaktadır. MDA lipidler proteinler ve nükleik asitler ile çapraz bağlanmalara yol açar ve doku zincir reaksiyonlarının hız belirleyicisi konumundadır.

Birçok araştırmacı (394, 411-413) tarafından meme kanserinin gelişiminde oksidatif stresin rolünün olduğu ifade edilmiş ve bu süreçte gelişen lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA değerli bir biyobelirteç olarak gösterilmiştir. Nitekim Khanzode ve ark. (411) ile Portakal ve ark. (412)'nin yaptıkları çalışmalarda meme kanserli dokunun ve serum MDA düzeylerinin, tümörlü mikroçevreye yakın bulunan sağlıklı doku ve seruma göre yüksek

konsantrasyonlarda olduğu belirlenmiştir. Aynı araştırmacılar (411, 412), MDA değerlerinin meme kanserli hastalarda yüksek seyretmesini nekroz varlığında yetersiz kanlanmaya bağlı gelişen oksidatif hasar ile örtüştüğünü ifade etmişlerdir. Buna benzer birçok meme kanseri çalışmasında, kanserde artan MDA ve diğer lipid peroksidasyon ürünlerinin direkt olarak DNA zincir kırılmalarına yol açtıkları, lipid peroksil ve alkoksil radikallerinin DNA'daki baz oksidasyonlarını tetikleyerek DNA' da mutajenik ve genotoksik hasar oluşturdukları saptanmıştır (413, 414).

Bu çalışmada da, kanser grubundaki sıçanların meme dokusu MDA düzeylerinin kontrol grubundakilere göre istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,001$, Tablo 17) artış göstermesi literatür (324, 338, 345, 394, 411-415, 425) ile uyumludur. DMBA ile çoğalan kanser hücrelerinde, lipid peroksidasyonu indüklenmiş ve sonuçta kanserin ilerleyişine katkı sağladığı tarafımızdan düşünülmektedir.

Ayrıca çeşitli kanser çalışmalarında, diyetset kökenli birçok biyoaktif bileşimin, serbest radikallerin oluşumu ile indüklenen biyokimyasal dengesizlikleri azaltma potansiyeline sahip olduğu ifade edilmiştir. Dassprakash ve ark. (415), tarafından nar meyvesinin çeşitli kısımlarından elde edilmiş ekstraktın (gallik asit ve quersetinle standardize edilmiş) anti-oksidan ve anti-genotoksik potansiyellerini araştırmak için yapılan bir çalışmada; genotoksin olan siklofosfamid ile farelerde ve hücre kültüründe oluşturulan genotoksisite ve oksidatif stresin nar ekstresi ile tedavisinde, hem *in-vivo* olarak karaciğer dokusundaki MDA düzeylerini düşürdüğünü, hem de *in-vitro* olarak hücrelerdeki ferrik indirgeyici radikal süpürücü etkiyi artırarak nar ekstresinin oksidatif stresi

inhibe ettiğini saptamıştır. Bu etkilerin; içerisindeki fenolik ve flavonid bioaktif ajanların radikal süpürücü özelliklerinden kaynaklanmasının yanında lipid peroksidasyonunu engelleyici etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada nar ve bileşenlerinin, kanser gelişiminin başlangıcında yer alan bir olayı temsil eden DNA hasarını inhibe ettiği bulunmuştur. Araştırmacılar narın bu anti-genotoksik özelliklerini doza bağımlı olarak GST, SOD ve CAT gibi antioksidan enzim aktivitelerini artırmak koşuluyla gerçekleştirdiğini düşünmektedir (415). Ayrıca başka bir çalışma da nar içeriğindeki punikalagin ve ellajik asitin doza bağımlı olarak benzo [a] piren-indüklü DNA hasarını önemli ölçüde engellediği, bu inhibisyonun % 97'sinin punikalagin ve % 77'sinin ellajik asit tarafından gerçekleştiği ortaya konulmuştur (416).

Çalışmamızda tüm tedavi gruplarındaki MDA düzeylerinin, kanserli gruptakilere göre daha düşük olması literatürle bağdaşmaktadır. Ancak kontrole yakın istatistiksel olarak anlamlı düşüş ($p \leq 0,005$), sadece iki tedavi ajanının birlikte uygulandığı grupta (D+P+T) gözlenmiştir (Tablo 17). Bu durum, tedavi ajanı olarak verilen nar ekstresinin içerisindeki biyoaktif polifenol bileşikleri (punikalagin, gallik asit ve ellajik asit polifenolleri) ile flavonoid yapısında olan tangeretinin DMBA ile indüklenmiş lipid peroksidasyonunu engellemek için bir additif etki gösterdikleri şeklinde yorumlanabilir. Çünkü sözü edilen ajanlardan punikalagin, gallik asit ve ellajik asit polifenolleri yukarıda ifade edilen DMBA'nın organizmada oluşturduğu mutajenik etkilerini engelleyerek MDA düzeylerini düşürürken, tangeretin ise süpürücü etkisi ile hidroksil radikallerini elimine ederek MDA düzeylerinin daha da artmasını engellediği düşünülmektedir.

Vücutta herhangi bir hasar gelişmedikçe oksidan ve antioksidan sistemler bir denge halindedir. DMBA'nın oluşturmuş olduğu oksidan hasar sonucu bu denge oksidan sistem lehine kaymaktadır ve sadece oksidatif yolların inhibe edilmesi ile bu denge sağlanmayabilir. Bu sebeptir ki organizmalar ROS ve RNS'lerle başa çıkmak adına, SOD, CAT ve GSH-Px gibi enzimler, GSH ve çeşitli vitaminler gibi molekülleri barındıran antioksidan savunma sistemi geliştirmiştir. Organizmanın dışında bulunan yani ekzojen olarak diyetteki sebze, meyve ve çeşitli besinlerde var olan doğal antioksidanlar da vücudumuzun oksidatif hasara karşı koyması ile yakından ilişkilidir. Ayrıca, diyet, hücrel bileşenleri oksidatif hasardan korumaya yardımcı olabilecek olası en iyi manipülatif antioksidan kaynak olarak görülmektedir (417).

Nar meyvesinden hazırlanmış nar meyve suyu, nar meyve kabuğu ekstresi ve taneleri içeren farklı ekstratlar kullanılarak yapılan insan ve sıçan kanser çalışmalarında; nar meyve ekstresinin oksidatif hasara karşı güçlü bir antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir (418, 419). Bu antioksidan özelliğin, nar meyve kabuk ve öz ekstratlarında bulunan antosiyaninler, tannik asit, gallik asit ve ellajik asit gibi biyolojik olarak aktif bileşikler olan polifenollerden kaynaklandığına işaret edilmektedir (420). Antioksidan kapasite üzerine yapılan bir başka çalışmada (421) ise; pomegranat içeriğindeki bu polifenollerin ilginç bir şekilde β karoten, askorbik asit ve vitamin E'den daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu açıklanmıştır. Enzimatik antioksidanlar üzerine yapılan başka çalışmalarda da (422, 423) nar meyve ekstresinin polifenol ve flavonoidlerce zengin olması nedeniyle CAT, SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde belirgin artış sağladığı, aynı zamanda MDA ve hidroperoksitlerin konsantrasyonlarını azalttığı

belirlenmiş ve bu bulguların ışığında nar ekstresinin oksidatif stresi azalttığı ileri sürülmüştür.

Ayrıca Lakshmi ve ark. (338), Periyasamy ve ark. (324), tarafından yapılan çalışmalarda, DMBA ile sıçanlar üzerinde ayrı ayrı *in-vivo* meme kanser modelleri oluşturulmuş; kanserli grupta bulunan sıçanların doku MDA, dien konjugat düzeyleri ve TBARS düzeylerinde kontrole göre önemli artışların olduğu, doku SOD, CAT, GSH-Px, GST ve GSH, C ve E vitamin düzeylerinde ise anlamlı düşüşlerin olduğu ortaya konmuştur. Bu iki çalışmada; tangeretin ile oral tedavi uygulanan gruplarda kanserli gruplara göre doku oksidan düzeylerinde anlamlı düşüşlerin olduğu ifade edilirken, enzimatik ve non enzimatik antioksidan düzeylerinde de kontrollere yakın oranda anlamlı artışların olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca kemopreventif ve kemoterapötik tedavi protokolleri karşılaştırıldığında ise, tangeretinin oksidatif stres üzerine kemopreventif özelliğinin daha ön plana çıktığı görülmektedir. Tangeretinin bu antioksidan özellikleri nedeniyle memedeki neoplastik oluşumların başlaması ve ilerlemesini önleyebileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda, DMBA ile meme kanseri oluşturulan sıçanların doku SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri ve GSH düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak (SOD, CAT ve GSH-Px için $p \leq 0,005$; GSH için $p = 0,001$) azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 17). DMBA grubu ile karşılaştırıldığında tedavi gruplarının tamamında doku SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde, artışlar saptanmış ancak sadece anlamlı etkin artışlar GSH düzeylerinde tespit edilmiştir (Tablo 17). Çalışmamızın bulguları yukarıdaki bahsedilen çalışmaları destekler nitelikte gözükmemektedir fakat pomegranat ve tangeretinin hem tek başlarına

hemde kombine halde oral tedavileri, DMBA sonucu ortaya çıkan lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresle başa çıkmak için, antioksidan defans sistemini harekete geçirmelerinde, enzimatik yollardan ziyade non-enzimatik antioksidan yollar üzerinden antikanserojen etki gösterdikleri şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca birçok araştırmacı (324, 338, 424-427), tarafından narın yapısındaki fenolik komponentler ile flavon yapısındaki tangeretinin anti-kanserojen ve güçlü antioksidan özellikleri ortaya konmuştur. DMBA ile indüklenen DNA eklentilerinin önlenmesinde ve DMBA tarafından oksidatif stresin bastırılmasında, bu ajanların sitokrom P450 aktivitesinin inhibisyonu (CYP 1A1, 1A2, 3A ve 1B1 gibi) veya faz II enzimlerinin indüklenmesine ya da DMBA'nın metabolitleri ile doğrudan konjugasyon yapabilme mekanizmaları üzerine yoğunlaştıkları gözlenmiştir. Ayrıca polifenol ve flavonların yapılarından dolayı metallerle şelat özelliklerinin olduğuna da dikkat çekmişlerdir. Bu yorumlarda çalışmadaki tedavi ajanlarımızın antioksidan başka enzimatik yolları aktive edebileceğini ayrıca düşündürmektedir.

Çeşitli deneysel ve klinik kanser çalışmaları, anjiyogenez ve kronik inflamasyonun neoplazm oluşumları ile sıkı ilişkili olduklarını, uzak doku/organ metastazlarını ve invazyonları artırarak etkin rol aldıklarını göstermiştir (70, 75, 76, 359, 428). Dolayısı ile kanserde anjiyogenez/metastaz ve inflamasyon yollarının bastırılması hem rekürrensleri hem de invazyonları önlenmek açısından iyi bir tedavi stratejisi olarak görülmektedir (373).

Çalışmamızda meme kanseri indüklenmiş sıçanlarda, pomegranat ve tangeretin'in, anjiyogenez/metastaz ve inflamatuvar yollar üzerindeki etkileri VEGF, MMP-9 ve NF- κ B parametreleri ile değerlendirilmiştir. Metastaz

rekürrens ve prognozun değerlendirilmesinde ise CA15-3 ve CEA tümör belirteçleri kullanılmıştır (Tablo 15, Tablo 16).

Plazma VEGF, MMP-9 ve NF- κ B düzeyleri DMBA ile indüklenen kanserli grupta kontrole göre istatistiksel olarak yükselmiştir (sırası ile $p=0,001$; $p<0,005$ ve $p<0,005$). Tedavi ajanları uygulanan gruplar ile kanser grubunun karşılaştırılmasında, plazma VEGF düzeyleri tüm tedavi gruplarında kontrole yakın düzeylere kadar istatistiksel olarak anlamlı (3 grup için; $p<0,05$) azalışlar göstermiştir, tedavi gruplarının tamamında MMP-9 düzeylerindeki azalmalar istatistiksel olarak önemsiz bulunurken plazma NF- κ B düzeylerindeki azalmalar ise sadece D+P ($p<0,05$) ve D+P+T ($p<0,05$) tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 16). Plazma CA 15-3 ve CEA tümör belirteçleri düzeyleri DMBA grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek tespit edilmiştir ($p=0,001$, $p=0,01$). DMBA grubu ile tedavi grupları karşılaştırıldığında, tüm tedavi gruplarındaki CA15-3 ve CEA düzeylerinde istatistiksel anlamlı bir şekilde azalmalar saptanmıştır ($p<0,05$) (Tablo 15).

Kontrol gruplarına göre DMBA grubunda gözlemlenen bu anjiyogenez ve inflamasyon belirteçlerinin düzeylerindeki artışlar sıçanlarda; DMBA indüksiyonu ile anjiyogenez/metastaz ve inflamasyonun yolaklarının harekete geçtiğini düşündürürken kanserli hayvanların plazma düzeylerinde izlenen tümör belirteçlerinin yüksekliği ise anjiyogenez ve metastaz yolaklarının aktivasyonunu destekler nitelikte olsada daha detaylı çalışmalara gereksinim olduğu kanısındayız.

DMBA ile indüklenen meme karsinogenez sürecinin bastırılmasında, kemopreventif ajanlardan pomegranat ve tangeretinin ayrı ayrı ya da birlikte anti-anjiyogenik/metastaz etkili olduğu gözlenmiştir. Bu etkilerini kanserde artan VEGF düzeylerini MMP-9 inhibisyonundan ziyade NF-κB üzerinden bloke ederek gerçekleştirdikleri kanaatine varılmıştır. Tedavi gruplarındaki MMP-9 düzeylerindeki istatistiksel olmayan azalmaların NF-κB inhibisyonundan kaynaklanmadığı, epigenetik değişimler ve MMP-9'un doku inhibitörlerinin ekspresyonlarının aşırı artmış olabileceğinden ileri gelebileceği düşünülmektedir.

Ayrıca pomegranat ve tangeretin tedavisi ile; DMBA indüksiyonu sonucu artmış NF-κB düzeylerinin azalması, bu fitoterapi ajanlarının ayrı ayrı uygulanmalarının meme kanserine karşı anti-inflamatuar etkinliklerinin de olduğunu ortaya koymaktadır. Yalnız tangeretin tedavisi ile indüklenen NF-κB inhibisyon düzeylerinin pomegranat grubuna çok yakın olduğu halde istatistiksel olarak anlamsız olmasının, gruplar arasındaki hayvan sayılarındaki farklılıktan kaynaklandığını düşündürmektedir. İki ajanın kombine kullanımları sonucu pomegranatın yapısındaki polifenoller ile flavon yapıdaki tangeretinin DMBA ile indüklenmiş meme kanserine karşı sinerjizm göstererek birbirlerinin anti-anjiyogenik/metastatik, anti-inflamatuar etkilerini artırdıklarını ve kuvvetli anti-invaziv etki gösterdiklerini düşünmekteyiz.

Tüm bu etkilerle birlikte, çalışmada uygulanan fitoterapi ajanları ile CA15-3 ve CEA tümör belirteçlerinin düzeylerindeki anlamlı düşüşlerin gözlenilmesi, Periyasamy ve ark. (324,338)'nın yaptıkları çalışma bulguları ile uyumluluk göstermektedir. Ancak meme kanserinden korunma noktasında prognoz ve metastazik rekürrensler açısından faydalı sonuçlar elde edilmiş gibi görünsede,

tedavi gruplarında meydana gelen tümör sayısındaki azalmalar tümör volümlerini de etkilediğinden istatistiksel yöntemlerle analiz edilemediği gibi histopatolojik ya da immunohistokimyasal olarak metastaz varlığı ortaya konulamadığı için net bir yorum yapılması doğru bulunmamıştır. Bu yönü ile daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Terapötik ajan olarak nar ve ekstrelerinin, anti-anjiyogenik/metastatik ve anti-inflamatuar etkinliğini araştıran çeşitli çalışmalarla, bulgularımız paralellik göstermekte, ancak bazı çalışmalardaki ortaya koyulan etki mekanizmaları farklılık içermektedir. Örneğin Yousef ve ark. (98), yaptıkları bir çalışmada; normal meme dokusuna kıyasla meme kanseri hücrelerinde MMP-9 ekspresyonunda anlamlı bir artış bulmuştur. MMP-9'un tümör hücrelerinin yakınındaki vasküler bazal membranda kollajeni (Tip IV) yıkarak metastaza katkı sağladığını ileri sürmüşlerdir. Bu bulgular çalışmamızda ki DMBA grubundaki sıçanların MMP-9 düzeylerinde ki artışla aynı yöndedir.

Schimdt ve ark. (85), yaptıkları çalışmada, çeşitli meme kanseri alt tiplerini içeren hücrelerde kontrollere göre yüksek VEGF ekspresyonu ve onun mRNA'sını bulduklarını bildirilmişlerdir. Bizim çalışmamızda da kontrole göre DMBA ile kanser indüklenen gruptaki VEGF düzeylerinin artması bu çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Toi ve arkadaşları (314), fermente edilmiş meyve suyu polifenollerinin ER + (MCF-7) meme kanseri hücrelerinde VEGF down regülasyonunun aracılık ettiği anti-anjiyogenik özelliklere ve normal insan meme epitel hücreleri (MCF10 A) ile ER - meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-231) anjiyogenik baskılayıcı göç önleme faktörünün (MIF) up regülasyonuna sahip olduğunu göstermiştir. Ek

olarak, insan umbilikal ven endotel hücre hattında (HUVECs), nar ekstresinin (10 g/mL) anti-proliferatif etkisiyle, endoteldeki tüp formasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca yine aynı araştırmada tavuk korioallantoik membranında *in-vivo* olarak oluşturulan anjiyogenez modelinde de, fermente meyve suyu ile damar oluşumlarının önüne geçildiği bildirilmiştir. Toi ve ark'larının yapmış oldukları *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarındaki narın bu anti-anjiyogenik etkileri, bizim bulgularımızla uyum göstermektedir.

Çeşitli çalışmalar nar bileşenlerinin; MMP aktivitesini spesifik olarak inhibe ederek, fokal adezyon kinaz aktivasyonunun ve VEGF ekspresyonunun azalmasına katkı sağladığını ayrıca tümör hücre invazyonlarını normal dokuya kadar indirdiğini ve uzak doku metastazlarına engel olduğunu bildirmişlerdir (306). Ahmed ve ark. (429), tarafından yapılan bir çalışma sonuçlarına göre; osteoartritin tedavisi için kullanan nar polifenolik ekstresi, IL-1beta tarafından indüklenen osteoartriti, MMP-1-3 ve 13 ekspresyonunu inhibe ederek engellediği bildirilmiştir. Nar ekstresi bu anti-anjiyogenik etkinliğini; p38-MAPK'ın ve I κ B α fosforilasyonlarını inhibe ederek NF- κ B' nin DNA'ya bağlanmasını (aktifleşmesine) engelleyerek gerçekleştirdiği ileri sürülmektedir. Bu iki çalışmada pomegranat için atfedilen anti-anjiyogenik mekanizmalar bizim çalışmamızla farklılık göstermektedir. Çalışmamızda MMP-9 aktivitelerindeki azalmalar NF- κ B blokajından kaynaklı olsaydı tüm tedavi gruplarında da azalmaların anlamlı olması beklenirdi ama hiçbir tedavi grubunda anlamlı bir azalma sağlanamadığından epigenetik değişimler bu yolağın baskılanmasında etkili olabileceği kanatındayız.

Literatürde narenciye flavonoidleri ve tangeretinin kanserde anjiyogenez/metastaz yollarına etkisini araştıran çalışmalara dair bulgular ve mekanizmaların kısıtlı olduğu görülmektedir. Ayrıca literatürdeki çalışmalarda bazı araştırmacılar (376), tangeretin ve buna benzer flavonların anjiyogenezi artırdığı yönünde görüş bildirirken çoğunun ise bu flavonların anti-anjiyogenik etkilere sahip olduğunu savunmaktadır (362, 364, 373, 377, 380) .

Puspita ve ark.'nın (376), yaptıkları bir çalışmada; narenciye ekstresinin kolorektal kansere karşı anjiyogenik etki gösterdiği ve bu etkinin de VEGF ekspresyonlarındaki artıştan kaynaklandığı bildirimleri çalışmamızın sonuçları ile uyum göstermemektedir.

Edison ve ark.'nın (377), *in-vivo* olarak yaptıkları çalışmada; narenciye ekstraktının bFGF ile indüklenen damarlaşmayı inhibe ederek, anti-anjiyogenik etkiler gösterdiği bildirimleri ise çalışmamızın bulguları ile örtüşmektedir.

Meiyanto ve ark. (373), tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; flavon yapıdaki fitoterapi ajanı ovaryum neoplazisi üzerine anti-anjiyogenik ve anti-invazif etkileri olduğu ortaya koyulmuştur. Bu etkileri Akt, HIF-1 α , NF- κ B ve VEGF yollarını bloke ederek gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

Yine yakın zamanda Lien ve ark. (362), tarafından yapılan bir çalışmada, flavon ajanla yapılan tedavi sonrası, çeşitli kinaz yollarını inhibe ederek (defosforile ederek) glioma hücrelerinde, damar oluşumlarının önüne geçildiği ortaya konmuş ancak mekanizmalara yönelik detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır.

Yi- Chien ve ark. (380), tarafından gerçekleştirilen *in-vitro* bir çalışmada; farklı kanser hücrelerindeki aşırı MMP-9 ekspresyonlarının invazyon ve metastaz

ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca flavon tedavisi ile MMP-9 düzeylerindeki gözlenen azalmaları flavonların ortaya koydukları anti-anjiyogenik etki ile açıklanırken, mekanizma olarak çeşitli kinaz yollarını bastırabildikleri ve MMP'lerin doku inhibitör düzeylerini artırmalarıyla açıklanmıştır.

Bazı araştırmacılar (310, 311, 315, 320), nar ve nar derivelerinin; çeşitli kanserlerde kemopreventif ve terapötik kullanımları ile anti-inflamatuar aktiviteye ve dolayısıyla anti-kanser potansiyeline sahip olduğunu işaret etmektedir. Bu çalışmaların sonuçları çalışmamızla uyum içerisinde. Ancak araştırmacılar narın anti-inflamatuar etkinliklerini çeşitli mekanizmalarla açıklamışlardır. Örneğin Adam ve ark. (305), tarafından yapılan bir çalışmanın raporlarına göre; nardan elde edilmiş çeşitli derivate fitokimyasal ajanlar (nar suyu, tannin ve punigalagin)'ın, kolon kanser hücrelerine karşı anti-inflamatuar özellik sergilediği gösterilmiştir. Narın bu etkisini, TNF- α ile indüklenen COX-2 ekspresyonlarını ve NF- κ B yolağını bastırarak (hem NF- κ B p65 subünitesinin fosforilasyonun azaltarak, hem de NF- κ B yanıt elementine bağlanarak) gerçekleştirdiği düşünülmüştür.

Khan ve ark. (320), tarafından yapılan başka bir *in-vitro* çalışmada; nar meyve ekstresinin, agresif meme kanseri hücre dizilerinde proliferasyon, invazyon ve motilite ile ilişkili olan NF- κ B 'ye bağlı olarak gerçekleşen gen ekspresyonlarını inhibe ettiğini ortaya koyarak, anti-invaziv etki gösterdiği raporlanmıştır.

Rashed ve ark. (310) tarafından gerçekleştirilen başka bir araştırmada, nar ekstrelerinin veya nar türevli bileşiklerin, inflamasyonla seyreden hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür. Narın bu özelliklerini insan mast

hücrelerinde ve bazofillerde NF- κ B aktivasyonunu ve çeşitli kinaz yollarını suprese etmek koşulu ile gerçekleştirdiği düşünülmüştür.

Banerjee ve ark.'nın (311). azoksimetan kullanarak *in-vivo* oluşturdukları kolon kanser modelinde; terapötik amaçla standardize edilmiş nar deriverilerinin (nar suyu, toplam nar tanen özü, punikalagin) kullanılmasıyla sıçanlardaki kolon kanserinin önüne geçildiği ve bu ajanların güçlü bir anti-inflamatuar, anti-invazyon etki gösterdikleri ortaya konulmuştur. Araştırmacılar, fitokimyasal ajanların tüm bu etkilerini, COX-2 protein ekspresyonlarında azalma ile tutarlı olarak, AKT (Protein kinaz B) aktivitesini ve NF- κ B aktivasyonunu inhibe ederek ortaya koyduklarını gözlemişlerdir.

Literatür taramalarında flavonoidlerin inflamasyon-kanser gelişimi üzerine etkilerini araştıran birçok çalışma olmasına rağmen, tangeretinin etkileri ile ilgili çalışma sayısının yeterli olmadığı gözlenmiştir (346). Bu nedenle tangeretinin içinde bulunduğu bazı polimetoksiflavonlar (PMF) ile yapılan çalışmaların (325, 360, 361) sonuçları, çalışma bulgularımızla karşılaştırılmış, ve benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Örneğin Gao ve ark. (325), tarafından yapılan *in-vivo* kolon kanser modelinde; diyetteki flavonoidlerin anti-inflamatuar ve anti-proliferatif özelliklerinden dolayı, fareler üzerinde inflamasyona bağlı oluşan kolon kanseri üzerine anti-kanseröjenik etkiler oluşturdukları gösterilmiştir. Terapötik amaçla kullanılan fitokimyasalların anti-inflamatuar etkilerini; çeşitli inflamatuvar parametreleri, Siklin D1 ve VEGF düzeylerini azaltarak gösterdikleri düşünülmektedir. Ayrıca bu anti-inflamatuar etkinin kolon tümör insidansını önemli ölçüde düşürdüğüne ve buna bağlı olarak genel tümör volümünün de azaldığı bildirilmiştir. Bu bulgular mevcut çalışmamızın bulgularına yakın

olmakla birlikte, çalışmada sıçanlarda gözlenen tümör insidansı ve volümündeki düşmeler, yukarıdaki çalışmada belirtildiği üzere sadece anti-inflamatuar etkiden kaynaklanmadığı, tangeretinin anti-inflamasyon, anti-oksidan, anti-anjiyogenik ve anti-mitotik özelliklerinin tümü ile alakalı olabileceği kanısındayız.

Ayrıca Kohno ve ark. (361)'nın yapmış oldukları çalışmada; flavonoid ajanın, kolorektal kanseri oluşturulmuş sıçanlarda, prostaglandin E2 (PGE2) üretimini azaltarak anti inflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir. Daha sonra ki yıllarda Vanamada ve ark. (360), tarafından yapılan bir başka *in-vivo* kanser çalışmasında, diyetle bulunan bu flavonoidlerin, iNOS ve COX-2'düzeylerini baskılayarak kolon kanserini önledikleri vurgulanmış ve bir önceki çalışmayı desteklediği görülmüştür.

Lakshmi ve ark. (346), tarafından; DMBA ile sıçanlarda indüklenmiş bir meme kanser modelinde, tangeretinin proinflamasyon ve inflamatuvar yanıt elemanları üzerinden meme karsinogenezinin gelişimini engellediğini çeşitli dokuları koruduğu bildirilmiştir. Bu araştırmalarla mevcut çalışma bulgularımız aynı yönde olup, meme neoplazmlarına karşı tangeretinin bir kemo-önleyici madde olarak etki edebileceği görüşümüzü desteklemektedir.

Çalışmada meme kanseri indüklenmiş sıçanlarda, pomegranat ve tangeretin'in, apoptoz, proliferasyon ve hücre siklus yolları üzerindeki etkilerini ortaya koymak için biyokimyasal olarak doku p53, Bax, Bcl-2, β -katenin ve Siklin D1 protein ekspresyonları çalışılmıştır (Şekil 41-45). Ayrıca bu bulgular, TUNEL ve immunohistokimyasal olarak hücre düzeyinde apoptotik indeks ve ER- α , Ki-67 proliferasyon ve mitotik indeks parametreleri (Tablo 19) ile birlikte değerlendirilmiştir;

Kontrol gruplarına göre DMBA grubundaki sıçanların, doku düzeyindeki p53 ve Bax protein ekspresyonlarında anlamlı olarak düşüşlerin saptanması ve bunun yanında Bcl-2, β -katenin ve Siklin D1 protein ekspresyonlarındaki anlamlı artışların tespit edilmesi; sıçanlarda DMBA indüksiyonu ile oluşturulan meme kanserinde pro-apoptotik yolların baskılandığını, anti-apoptotik yolların ise hücre siklusu ve spesifik onkogenlerle birlikte indüklendiği şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca bu görüşümüzü TUNEL ve immunohistokimyasal bulgular hücre düzeyinde şu şekilde desteklemiştir; yapılan TUNEL analizi ile, sağlıklı hayvanlara göre, kanserli gruptaki sıçanların meme dokularında apoptoz yolağına giren hücre sayısının anlamlı olarak azalması, pro-apoptik yolağın baskılandığına işaret ederken, kanserli sıçanların yine hücre düzeyinde proliferasyonunu ortaya koyan ER- α ve Ki-67'nin immun reaktivitesindeki anlamlı artışlar ise DMBA tarafından sınırsız çoğalabilme yetisi kazanmış kanser hücrelerinde artmış mitotik indeks, onkogen aktivitesi ve artmış anti-apoptotik aktiveyi destekleyen kanıtlar olarak yorumlanabilir.

DMBA grubuna göre pomegranat verilen tedavi grubunda; doku düzeyinde p53 ve Bax protein ekspresyonlarının etkin ve istatistiksel olarak artması, pomegranat tedavisi aracılığıyla NF- κ B yolağı inhibe edilerek, apoptotik yolağın p53/Bax bağımlı uyarılmasını sağladığı yönünde düşünülebilir. Bu pro-apoptotik belirteçlerin artışına bağlı olarak doku düzeyinde tüm tedavi gruplarında Bcl-2 ekspresyonlarında rölatif anlamsız düşüşler gerçekleşmiş olabilir. Ayrıca yine kanserli gruba göre β -katenin'in doku ekspresyon düzeyleri tüm tedavi gruplarında azalmış olup bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu bulgu tedavi ajanlarımızın bu onkogeni spesifik olarak bastıramadığını ortaya koyarken

bu azalışlar bu yolağı oluşturan çeşitli proteinlerin transkripsiyonunun değişmesinden kaynaklanabilir. DMBA grubuna göre pomegranat ile tedavi edilen sıçanların doku Siklin D1 ekspresyon düzeylerinin çok düşük oranda azalması ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamsız olması, pomegranat'ın proliferen olan kanser hücrelerini engellemede, Siklin D1'e spesifik bir inhibisyon yapmadan, hücre siklus arrestini G1 fazının dışında başka bir evrede (G2/M olabilir) gerçekleştirdiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca pomegranatın kanser hücreleri üzerine anti-proliferatif etkileri, TUNEL ve immunohistokimyasal olarak hücre düzeyinde, kanserli gruba göre pomegranat verilen tedavi grubundaki sıçanların meme dokularında apoptoz yolağına giren hücre sayısını anlamlı ve etkin oranda artırması ve proliferasyon belirteçleri olarak kullanılan ER- α ve Ki-67'nin immun reaktivitesindeki anlamlı ve etkin düşüşler göstermesi ile desteklenmiştir. Tüm bu değerlendirmelerden yola çıkarak pomegranatın, DMBA ile indüklenmiş meme kanserine karşı kemopreventif etkinliğini, sitotoksik etki göstererek ortaya koyduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda pomegranatın meme kanseri üzerine kemopreventif etkisinin olduğu gösterilmiştir. Nar ya da ekstralarının kullanıldığı çeşitli kanser çalışmaları ile karşılaştırıldığında; bazı araştırmacılar (288, 318, 320, 322, 430), narın kanseri önlemedeki kemopreventif özelliklerini apoptoz indüksiyonu, hücre siklusu ve proliferasyon yollarının baskılanması ile açıklarken bu araştırmaların sonuçları çalışmamızın bulguları ile paralellik göstermektedir. Ancak nar polifenollerinin bu sitotoksik özelliklerini ortaya koyan bir takım araştırmacıların (288, 295, 312, 313, 315, 316, 431, 432) bulguları ve etki mekanizmaları çalışmamızla farklılık göstermiştir.

Khan ve ark.'nın (320) yaptığı çalışmaya göre, nar meyve özlerinin içerdiği polifenoller sayesinde, agresif özellikte olan meme kanser hücreleri üzerine anti-prolifere, anti-invaze edici etki gösterdiği açıklanmıştır. Araştırmacılar tarafından narın bu fitoterapötik etkilerini NF- κ B yolağının inhibisyonuna bağlı gerçekleştiği ileri sürülmüştür.

Ayrıca Dikmen ve ark.'nın (430), yaptıkları çalışmada, toplam fenolik içeriği standardize edilmiş nar kabuklarının yine insan meme kanseri hücre hatları üzerine doza bağımlı olarak, pro-apoptotik etkili yaptığı bulunurken, narın sitotoksik etkisini hücrelerdeki Bax ekspresyonlarını artırarak, Bcl-2 ekspresyonlarını düşürmek sureti ile ortaya koyduğunu göstermiştir

Sonraki yıllarda, Banerjee ve ark. (318), tarafından yapılan *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalar yukarıda yapılan çalışmaları destekler nitelikte olmuştur. Araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda nar polifenollerinin meme kanserini baskıladığını öne sürmüşlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında narın sitotoksik etkilerini, kanser hücrelerinde inflamasyon, anjiyogenez, ve proliferasyon ile ilişkili olan NF- κ B ekspresyonlarını baskılayarak ve buna bağlı apoptotik yolları uyararak kaspaz-3 ekspresyonlarındaki artışlarla ifade etmiştir.

Shirode ve ark. (322), tarafından yapılan bir çalışmanın bulgularına göre; polifenol içeriği standartlaştırılmış nar özütü ekstratının kullanılması ile, insan meme kanseri hücreleri üzerine doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki gözlenmiştir. Araştırmacılar narın bu anti-proliferatif etkilerini sadece konsolide anti-oksidan özelliklerinden ziyade, hücre siklusunu G2/M fazında bloke ederek hücre büyümesini inhibe etmesi ile açıklamışlardır. Görüldüğü üzere yukarıdaki çalışmalar çalışmamızdaki bulgularla uyum içindedir.

Malik A ve ark.'nın (431), yaptığı bir çalışmada, nar polifenollerinin prostat kanseri üzerine kemopreventif ve kemoterapötik etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, narın kanser hücreleri üzerindeki büyümeyi baskılayıcı ve canlılığı azaltıcı etkilerini, p53'ten bağımsız bir şekilde, p21 ve p27 tümör süpresör genlerini yukarı regüle ederek, Siklin D1 ve çeşitli diğer siklinler ve bağımlı kinazların aktivitesini inhibe etmek koşulu ile hücre siklüsünü G1 kontrol noktasında bloke ederek bir seri kompleks mekanizmalarla açıklamış olsalarda, bu düşünceler çalışmamızda pomegranat tedavisi ile gerek p53 ve Bax ekspresyonlarının DMBA'ya göre yüksek ve anlamlı bulunması pomegranat tarafından sağlanan apoptozun p53'e bağımlı gerçekleştiğinin bir göstergesi olarak kabul edilirken ve yine kanserli gruba göre pomegranat grubunda β -katenin, Siklin D1 ekspresyonlarındaki azalışların anlamsız olması çalışmamızda pomegranat'ın hücre siklus blokajını G1 noktasında gerçekleştirmediğini göstererek bu yönü ile yukarıda ki çalışma ile çelişmektedir. Ayrıca pomegranatın biyoaktivitesini ve anti-kanser özelliğini hücre siklus inhibisyonu ve proliferasyonunu baskılayıcı özelliklerle ortaya koyan çalışmalar, pomegranat'ın Wnt/ β -katenin yolağını inhibe etmek koşulu ile Siklin D1 ekspresyonlarını azaltarak G1 kontrol noktasında (288, 313) hücre siklus blokajı yaptığını ileri sürmektedir. Ayrıca başka bir çalışmanın bulguları da standardize nar ekstresinin meme kanserine karşı sitotoksik özelliklerini, kanser hücrelerinin apoptotik ölümünü artırırken ve hücre siklusu üzerine G0/G1 fazında (432), inhibe ettiğini savunmaktadır. Bu çalışmalardaki narın kanser hücreleri üzerine sitotoksik mekanizmalarını aydınlatmaya yarayan hücre siklus blokajı hakkındaki görüşler, çalışmamızın bulguları ile örtüşmemektedir. Literatürdeki bu mekanizmaların

tamamen açıklığa kavuşması adına ileride bu konuda daha fazla çalışmaların yapılması kanaatindeyiz.

Tüm bunların dışında çeşitli araştırmacılar (295, 312, 315), pomegranat polifenollerinin meme kanserine karşı kemopreventif ve anti-proliferatif özelliklerini anti-aromataz aktive göstermesiyle açıklarken, Kim ve ark. (316), tarafından yapılan çalışmada, fitoöstrojenik yapıya sahip nar bileşenlerinin anti-kanserojenik etkilerini, östrojen reseptörlerine karşı rekabetçi bir bağlanma ile 17- β -östradiolün proliferatif etkilerini inhibe etmesi ile açıklamıştır.

Son olarak Mandal ve ark. (288), tarafından DMBA ile oluşturulan meme kanser modelinde, kanserli gruptaki sıçanların meme dokularında immunohistokimyasal değerlendirmeler yapılmıştır. ER- α ve β 'nin çekirdekte çok sayıda olması ve yoğun boya tutulumu göstermesi ile meme karsinogenez sürecinde ER'lerinin östrojenlerden bağımsız olarak artmış ekspresyon düzeyleri ifade edilerek, meme kanserogenezi için potansiyel bir tehlike olabileceği ortaya koyulmuştur. Ayrıca bu çalışmada 'pomegranate ekstresi' tedavisi ile ER'lerinin hücre çekirdeklerinde sayısı ve boya tutulumlarının düştüğü gözlemlenirken, pomegranatın potansiyel kemopreventif ajan olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma bulguları çalışmamızın immunohistokimyasal bulguları ile örtüşmektedir. Araştırmacılar tarafından pomegranatın bu proliferasyonu baskılayıcı etkileri; ER'lerinin aktivasyonunda bir kofaktör gibi rol oynayan Siklin D1'in ve bu genin ekspresyonlarını düzenleyen Wnt- β katenin sinyal yolağını inhibe etmek koşulu ile (klasik olmayan genomik yolağı blokaja uğratarak) gerçekleştirdiği şeklinde ifade edilmektedir. Bu görüşler ise çalışmamızla farklılık göstermektedir. Çalışmamızda DMBA grubuna göre pomegranat uygulanmış tedavi

grubumuzdaki Siklin D1 ve β -katenin ekspresyonlarının aşağı yöndeki ifadeleri istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. Bu nedenle pomegranatın, ER'ler üzerinden kanser hücrelerinde proliferasyonu baskılayıcı mekanizması muhtemelen ER'lerin aktivasyonunda rol oynayan klasik olmayan genomik yolak üzerinden olduğunu ve supresyonun bu yolakta transkripsiyon faktörü olarak görev yapan NF- κ B'nin inhibisyonundan kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz.

DMBA grubuna göre tangeretin uygulanan fitoterapi grubunda; doku düzeyinde p53 ve Bax protein ekspresyonlarının çok düşük oranda artması ve bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olmaması tangeretin apopitotik etkinliğini tartışmalı hale getirmektedir. DMBA grubuna göre tüm tedavi grupları içerisinde sadece tangeretin uygulanan grupta doku Siklin D1 ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı ve etkin bir şekilde azalırken β -katenin ekspresyon düzeylerindeki azalmalar ise istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. Bu bulgular Tangeretin sınırsız çoğalabilme kabiliyeti gösterebilen kanserli hücrelerin proliferasyonunu engellemede, spesifik olarak Siklin D1 baskılanmasını β -katenin ekspresyonu üzerinden göstermediğini ve hücre döngüsünü p53'ten bağımsız (p21 ya da 27) bir şekilde G1 fazında arrest ederek gerçekleştirdiğini ortaya koymaktadır. TUNEL ve immunohistokimyasal olarak hücre düzeyinde, kanserli gruba göre tangeretin verilen tedavi grubundaki sıçanların meme dokularındaki apopitoz yolağına giren hücre sayısında istatistiksel olarak artışların anlamsız olması tangeretin apopitoz yolağını etkin bir şekilde kullanamamasını desteklemektedir. Ayrıca DMBA grubuna göre tedavi ajanı olarak tangeretin uygulanan grupta, mitotik indeks parametreleri olan

ER- α ve Ki-67 immun reaktivitesindeki anlamlı ve etkin düşüşlerin görülmesi tangeretinin anti-proliferatif etkinliğini, kanserli hücelere karşı tümör süpresör bir gen gibi etki gösterdiğini ortaya koyan diğer bulgularımızı destekler niteliktedir. Tüm bu değerlendirmeler doğrultusunda tangeretin, DMBA ile indüklenmiş meme kanserine karşı kemopreventif etkinliğini, sitotoksik etkiden ziyade sitostatik etki ile gösterdiğini düşünmekteyiz.

Literatürde tangeretinin ve benzer yapıdaki flavonların çeşitli kanserler üzerine kemopreve edici ve terapötik özelliklerini sitotoksik (337, 360, 362-364, 366, 367, 372) etkilerle bağdaştıran birçok çalışma olduğu gibi araştırmacılar tarafından ileri sürülen mekanizmalar farklılık göstermektedir. Bununla birlikte bir takım araştırmacıların yapmış oldukları çalışmaların bulguları ise tangeretinin anti-kanser özelliklerini sitostatik (339, 433), etkilerle gerçekleştirdiği yönünde olup, çalışmamızdaki bulgularla uyumlu olduğu görülmektedir. Ayrıca literatürdeki bu farklı yorumların netleşmesi adına, kanser çalışmaları üzerine flavonların etkilerini araştırmaya yönelik yeni ve daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

Kimi araştırmacılar (325, 360, 366, 372), tangeretin ve çeşitli flavon türevlerinin kanseri engelleyici etkilerini, onların sitotoksik özellikleri ile örtüşürken, bu özellikleri, bazı kanser hücrelerinde proliferasyonu düşürmeleri ve apoptozu indüklemeleri ile açıklamaktadır. Örneğin Dong ve ark.'nın (372), yaptıkları *in-vitro* mide kanser çalışmasının raporlarına göre; tangeretinin doza bağımlı olarak sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Tangeretinin bu etkilerini; kanserli hücreler üzerine mitokondriyel membran polaritesini p53'e bağımlı bir şekilde bozarak ve bu hücrelerdeki pro-apoptotik belirteçlerin ekspresyonlarını

up regüle etmek koşulu ile intrinsek ve ekstrinsek apoptotik yolağı indüklediği ve böylece tümör hücrelerinin çoğalmalarını ciddi oranda suprese ettiği ileri sürülmektedir (366). Ayrıca Goa ve ark. (325), tarafından bildirilen çeşitli çalışmalarda tangeretin ya da benzer flavon yapıdaki fito kimyasalların yukarıdaki mekanizmalara ek olarak Bax/Bcl-2 oranlarını da artırmak suretiyle bu sitotoksik etkileri gerçekleştirdikleri açıklanmıştır.

Yapılan çalışmalar, tangeretine atfedilen bu apoptotik özellikler ile birlikte kanser hücreleri üzerine proliferasyonu supresyon yönündeki yapmış olduğu etkilerini, farklı hücre siklus fazlarındaki kontrol noktalarını blokaja uğratmak koşulu ile gerçekleştirdiğini gözler önüne sermektedir. Örneğin, Lien ve ark. (362), tangeretinin ve benzer polimetoksilli flavonların glioma hücrelerine karşı sitotoksik etkilerini hücre siklusunu G0/G1 fazında suprese ederek ortaya koyduklarını ileri sürerken, Ma ve ark. (360), tarafından in-vivo oluşturulan bir hepatokarsinom modelinde ise bu kanser hücrelerine karşı anti-proliferatif etkilerini siklusu G2'de arrest edebilmeleri ile ilişkilendirdikleri görülmektedir. Yine Pan ve ark. (337) 'nın yaptıkları başka bir *in-vitro* kanser çalışmasının bulgularına göre, kolorektal kanser hücre hatları üzerine tangeretinin tek başına ve doza bağımlı olarak sitotoksik bir ajan gibi etki gösterdiği gözlenilmiştir. Bu etkiyi araştırmacılar, kolon karsinomlu hücreler üzerinde p53 ekspresyonlarını artırmak suretiyle apoptozu indüklemesine ve birer CDKİ'leri olan p37 ve p21 tümör süpresör genlerinin ekspresyonlarını artırmak suretiyle spesifik CDK 2 ve 4' ün aktivitesini inhibe ederek, hücre siklusunun G1'de arrestine neden olduğunu ve proliferasyonun önüne geçebildiğini bu mekanizmalarla ortaya koymuştur. Bu etkilerle birlikte yakın zamanda Ma ve ark.'nın (367), yaptığı çalışmada ise

tangeretinin kanserli glial hücreler üzerine G2/M fazında siklus arrestine neden olduğu iddia edilerek bu etkisinin altında yatan mekanizma olarak, çeşitli kinaz yolları üzerinden Wnt/ β -katenin yolağını bloke ettiği ileri sürülmüştür.

Arivazhagan L ve ark.'nın (364), yaptığı bir *in-vivo* çalışma ile yukarıdaki *in-vitro* ve *in-vivo* kanser çalışmalarını apoptoz noktasında destekler nitelikte iken, DMBA ile indüklenmiş meme kanseri üzerine, tangeretinin bu sitotoksik etkileri G1/S fazında kanser hücrelerinin bölünmelerini engellediği açıklanarak farklı bir noktada hücre siklus blokajı yaptığı görülmektedir. Bu çalışmada aynı araştırmacılar tarafından, Tangeretin'in sitotoksik etkilerini, p53/p21 ekspresyonlarını da up regüle etmek koşulu ile apoptoz indüksiyonunda rol oynayarak ve bunun sonucunda metastaz sürecine katılan çeşitli proteinleri down regüle ederek gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür. Ayrıca çalışmada tangeretinin bu etkileri, PCNA ve Ki-67 gibi tümör proliferasyon belirteçlerini süprese ettiğini ortaya koyan immunohistokimyasal bulgularla desteklenerek, sıçanlarda DMBA ile indüklenen meme karsinogenez oluşumunu ve proliferasyonunu inhibe edebildiği ifade edilmiştir. Tangeretinin çeşitli neoplazm türlerindeki kemopreventif ya da teröpötik özellikleri farklı şekilde sitotoksik etkilerle ortaya koyularak açıklanan yukarıdaki çalışmalar ile çalışmamızın bulgularının uyumlu olmadığı gözlenmiştir.

Tüm bu çalışmaların dışında Morley ve ark. (339), tarafından yapılan bir çalışmada, tangeretin ve çeşitli flavonların insan kolon ve meme kanserleri üzerine anti-kanser potansiyelinin olduğuna dikkat çekilmiştir. Araştırmacılar tangeretinin bu potansiyel anti-proliferatif etkilerinin sitostatik özelliklerinden kaynaklandığını ileri sürerek, altta yatan mekanizmaları ise, kanser hücreleri

üzerine G1'evresinde bloke edici etkisi nedeniyle proliferasyonu yüksek oranda suprese etmesi ve hücrelerde apoptoz yolağını tetikleyici herhangi bir etki göstermemesi ile açıklamışlardır. Ayrıca bu çalışma bulguları ile paralel olarak Karen ve ark.'nın çalışmasında (433) tangeretinin bu etkilerini, tümörsüz dokularda sitotoksiteyi ve apoptozu indüklemeden sadece tümörlü hücreler üzerine proliferasyonu suprese etmek şartı ile gösterdiğini açıklamıştır. Ayrıca bu çalışmalar, tangeretinin büyümeyi seçici olarak inhibe etme kabiliyetini, selektif hücre döngüsü olaylarının aracıları ile seçici olarak etkileştiğini gösterirken, çalışmamızın bulguları ile paralellik göstermektedir.

Çeşitli çalışmalar tangeretinin meme kanserine karşı kemopreventif ve proliferasyonu önleyici özelliklerini anti-aromataz aktiveye sahip olması ile ilişkilendirirken (381, 434), Birt ve ark. (382), tangeretinin anti-kanserojen etkilerini; ER'ler için spesifik olarak östrojenlerle yarışmalı inhibisyona girmesi ve fitoöstrojen yapısından kaynaklı zayıf östrojenik etki göstermesi ile ilişkilendirmektedir. Ayrıca yapılan bazı çalışmalar, *in-vitro* (383) ve *in-vivo* (338) olarak meme karsinomlarında proliferasyonun önlenmesi noktasında, tangeretin ve benzer yapıdaki flavonoidlerin kanserli hücrelerdeki artmış ER ekspresyonlarını düşürerek ve burada hücrelerde reseptörün sayı ve boya tutulumundaki azalmalarla kanıtlayarak ortaya koymuştur. Bu bulgularla, çalışmamızın immunohistokimyasal bulgularının uyum içinde olduğu gözlenmiştir.

DMBA grubu ile tüm tedavi grupları kıyaslandığında, doku p53 ve Bax protein ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak en anlamlı artış pomegranat ve tangeretinin birlikte uygulandığı tedavi grubunda bulunmuştur. Bu ajanların

birlikte uygulanması sonucu gözlenen sitotoksik etkinin, p53 ve Bax bağımlı apoptotik yolağın uyarılması ile oluştuğunu ve bu anti-kanser özelliğın pomegranatın sitotoksik etkilerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. DMBA grubuna göre, iki tedavi ajanının kombinasyonu ile tedavi edilen sıçanların doku Siklin D1 ekspresyon düzeylerindeki azalmaların yalnız pomegranat uygulanan gruba göre daha yüksek oranda olması ise tangeretinin sitostatik özelliğı ile açıklanabilir. Ayrıca TUNEL sonuçlarına göre DMBA grubu ile karşılaştırıldığında iki terapötik ajanın birlikte kullanılmasının, kanser hücreleri üzerine, apoptoz yolağına giren hücre sayısını anlamlı bir şekilde artırdığı ve bu artışın pomegranatın pro-apoptotik özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmada yapılan immunohistokimyasal analizlerde, DMBA grubu ile karşılaştırıldığında her iki terapötik ajanın birlikte kullanılmasının, proliferasyon belirteçlerinin düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı saptandı. Bu durum, kombine tedavi ajanları olan pomegranatın sitotoksik etkisinin tangeretinin sitostatik etkisine katkıda bulunarak güçlü bir anti-proliferatif etkinlik sağladığı şeklinde yorumlanmıştır.

Literatürde pomegranat ve tangeretinin birlikte uygulamasını içeren herhangi bir kemopreventif ya da terapötik çalışmaya rastlanılmamış olması başka literatürlerle çalışma sonuçlarımızın tartışılmasını kısıtlasa da, çalışma bulgularımızın, meme kanser hücreleri üzerine nar ekstresi ve tangeretin gibi flavon olan nobiletinin kombine fitoterapisi ile sağlanan anti-kanser etkilerinin, tekli kullanımlarından anlamlı olarak daha yüksek olduğunu rapor eden 2 çalışma (435, 436) ile aynı yönde olduğu görülmektedir.

Çalışmada ki histopatolojik makroskobik bulgular, DMBA ile indüklenen hayvanlardaki tümör tutulum insidans oranları ve tümör hacimlerinin tedavi gruplarında azaldığını ve iki tedavi ajanının birlikte verildiği gruptaki sıçanlarda herhangi bir tutulum izlenmediğini gösterirken (Tablo 18) ayrıca bu bulgularımızın histolojik alt tip olarak DMBA ile sıçanlarda invaziv duktal karsinom oluşumunu (Şekil 47) *in-vivo* olarak ortaya koyan çeşitli çalışmalarla uyum içerisinde olduğu gözlenmiştir (288, 324, 338).

Mevcut çalışma sonuçlarına göre, hem nar ekstresinin hem de tangeretinin ayrı ayrı kullanımlarının sıçanlarda oluşturulmuş meme kanseri modelinde kemopreventif etkinliklerinin olduğu düşünülmektedir. Nar ekstresi ve tangeretinin özellikle kombine uygulanması meme kanserinin gelişimini engellemede daha faydalı olabileceği kanısına varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanseri Dairesi Başkanlığı, 2016.
2. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures, American Cancer Society, Inc, Atlanta, 2013-2014.
3. Donegan WL. Introduction to history of breast cancer. In: Donegan WL and Spratt JS (ed). Cancer of the breast In: Sabiston DC (ed). Textbook of Surgery Philadelphia: Saunders 1995: 1-5.
4. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer. Int. J Cancer 2010; 127(12): 2893-917.
5. Sun J, Liu RH. Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. Cancer letters 2005; 20: 1-11.
6. Patron M, Dowsett M, Smith L. Studies of apoptosis in breast cancer. BMJ 2001; 322: 1528-1532.
7. Sinha D, Biswas J, Sung B, Aggarwal BB, Bishayee A. Chemopreventive and chemotherapeutic potential of curcumin in breast cancer. Curr Drug Targets 2012; 13: 1799-1819.
8. Cazzaniga M, Bonanni B. Breast cancer chemoprevention: Old and new approaches. J Biomed Biotechnol 2012; Article ID 985620, doi:10.1155/2012/985620.
9. Dikmen M, Öztürk N, Öztürk Y. Nar meyve kabuğu ekstresinin mcf-7 hücre proliferasyonu üzerine sitotoksik ve inhibitör etkileri. Ankara Ecz Fak Derg 2008; 37(3): 179-190.
10. Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonu (MHDF). Meme hastalıkları kitabı. İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri, 2012; ISBN: 978-975-277-402-5.
11. Collins LC, Schnitt SJ. Breast: Stacey EM (editor). Histology for Pathologists. 3th ed, Philadelphia: Saunders Lippincott Williams and Wilkins 2007: 57-68.
12. Onat D. Meme Anatomisi ve Fizyolojisi. Ankara: Türkiye Klinikleri Yayınevi 1996: 39-77.
13. Spratt JS, Tabin GR. Gross anatomy of the breast. In: Donegan WL, Spratt JS, eds. Cancer of the breast, 4th edition, Philadelphia: London 1995: 22-42.
14. Erhan Y, Canda T. Meme Hastalıkları Patolojisi ve Meme Kanseri. Mocan Kuzey G (editor). Temel Patoloji. 22.Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 2007: 705-739.
15. Sayek İ. Temel Cerrahi 2004; 75: 895-897.
16. Moore KL, Dalley AF. Clinically Oriented Anatomy. In: Thorax: Breast. Moore KL. 4th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 1999: 72-79.
17. "What Is Breast Cancer ?" http://www.flyerspecials.com/toronto/health_beauty/cancer_breast.htm/ 20.01.2018.
18. Farra WB, Walker MJ, Minton LP. Physiology of the Breast. Cancer of the Breast Ed. Williams 4.Baskı, W.B Saunders, USA 1995:43-51.

19. Dong J, Tsai-Morris CH, Dufau ML. A novel estra-diol/estrogen receptor alpha-dependent transcriptional mechanism controls expression of the human prolactin receptor. *J Biol Chem* 2006; 281: 18825–36.
20. Kirby İ. Bland, copeland, Edward M. Breast. Principles of Surgery, Volume i Ed. Seymouri Schwartz 1995:531-593.
21. Bussolati G, et al. Immunolocalization and gene expression of oxytocin receptors in carcinomas and non-neoplastic tissues of the breast. *Am J Pathol* 1996; 148: 1895–903.
22. Honda K et al. Prolactin releasing peptides modulate background firing rate and milk ejection related burst of oxytocin cells in the supraoptic nucleus. *Brain Res Bull* 2004;63: 315–9.
23. Wilson CL et al. Effects of oestrogen on gene expression in epithelium and stroma of normal human breast tissue. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 617–28.
24. Dickson R, Russo J. Biochemical control of breast development. In Harris J, et al (eds): Diseases of the breast. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2000.
25. Alvarado A, Faustino-Rocha AI, Colaço B, Oliveira PA. Experimental mammary carcinogenesis-Rat models. *Life Sci* 2017; 15;173:116-134.
26. Maeda K, Ohkura S, Tsukamura H. Physiology of reproduction. In: G. Krinke (Ed.), Lab. Rat, Academic Press, UK 2000: 145–176.
27. Masso-Welch, PA, Darcy, KM, Stangle-Castor, NC, Ip, MM. A Developmental Atlas of Rat Mammary Gland Histology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2000;5(2): 165-185.
28. Hvid H, Thorup I, Sjogren I, Oleksiewicz MB, Jensen HE. Mammary gland proliferation in female rats: effects of the estrous cycle, pseudo-pregnancy and age. *Exp. Toxicol. Pathol*. 2012; 64; 321–332.
29. Saraçlıgil B. D Vitamininin MCF-7 Meme Kanseri Hücresi Metabolizması Üzerine Etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Konya: Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, 2015.
30. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70.
31. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 401-410.
32. Vargo-Gogola T, Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature Reviews Cancer* 2007; 7: 659-672
33. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 1956; 123(3191): 309-14.
34. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 2008; 358(5): 502-511.
35. Şahin D. *Referans Patoloji*. 1. Baskı. İstanbul Tıp Kitabevi, 2009.
36. Cooper GM, RE. H. *The Cell*. Hücre, moleküler yaklaşım. Sakızlı M, Atabey N (Çevirenler). 3.Baskı, İzmir, İzmir Tıp Kitabevi, 2006: 631- 668.
37. Çiftçi N. The Role of Oxidative Stress in Cancer: Could Antioxidants Fuel the Progression of Cancer? *Ahi Evran Tıp Dergisi* 2017; 1: 8-13.

38. Zwart De LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999; 26: 202-226.
39. Mandal S, Yadav S, Nema RK. Antioxidants: A review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2009; 1(1): 102-104.
40. Delibaş N, Özcankaya R. Serbest radikaller. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 1995; 2(3): 11-17.
41. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper'ın Biyokimyası. Dikmen N, Özgünen T (Çeviren). 24. baskı, İstanbul: Barış Kitabevi 1996.
42. Karaöz E, Özcan O, Irmak K, Sarsılmaz M. In vitro hidrojen peroksit uygulamasında kolon mukozasında görülen değişiklikler ve buna E vitamininin etkisi. *Gazi Tıp Dergisi* 1992; 3: 177-183.
43. Pham-Huy L A, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci* 2008; 4(2): 89-96.
44. Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MTD, Mazura M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
45. Marnett LJ. Oxy radicals, lipidperoxidation and DNA damage. *Toxicology* 2002; 181-182: 219-222.
46. Gilbert DL. Fifty years of radical ideas. *Annals New York Academy of Sciences* 2000; 899: 1-14.
47. Gutteridge J M C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chemistry* 1995; 41:1819-1828.
48. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715-25.
49. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri *JCEI* 2015; 6(3): 331-6.
50. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 2010; 4(8): 118–126.
51. Özkan A, Fışkın K. Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi* 2004; 14: 52-60.
52. Abuja P.M, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta* 2001; 306: 1-17.
53. Akkuş İ. Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri, 1.Baskı. Konya: Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım, 1995.
54. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res* 2010; 44 (5): 479–496.
55. Auletta CS, Weiner ML, Richter WR. A dietary Toxicity/oncogenicity study of tributyl phosphate in the rat. *Toxicology* 2000; 128: 125-134.

56. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews* 1994; 52(8): 253-265.
57. Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 1999; 4: 339-345.
58. Oberley LW. Representative of Polypeptid Structure of Bovine CuZnSOD. *Superoxide Dismutase* 1982; 1: 28.
59. Sözmen EY. Yaşlanma biyokimyası. Onat T, Emerk K, Sözmen ET (editörler). İnsan Biyokimyası. 1.Baskı, Ankara: 2002; 667-672.
60. İlhan N. Deneysel Olarak Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Kobaylarda Oksidan ve Antioksidan Sistemin İncelenmesi. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1998.
61. Altuntaş İ, Delibaş N. The effects of Fenthion on Lipid Peroxidation and Some Liver Enzymes: The Possible Protective Role of vitamins E and C. *Turk Klin J Med Sci* 2002; 32: 293-297.
62. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189: 41-54.
63. Spallholz JE. Selenium and glutathione peroxidase: Essential nutrient and antioxidant component of the immun system. *Adv. Exp. Med. Biol* 1990; 262: 145-158.
64. Lucente G, Luisi G, Pinnen F. Design and Synthesis of Glutathione Analogues. *Il Farmaco* 1998; 53: 721-735.
65. Sies H. Glutathione and Its Role in Cellular Functions. *Free Radical Biology and Medicine* 1999; 27: 916-921.
66. Hertig AT. Angiogenesis in early human chorion and in the primary placenta of the Macaque monkey. *Contributions to embryology*. 1935; 25 (146): 37-81
67. Rosen L. Antiangiogenic Strategies and Agents in Clinical Trials. *The Oncologist* 2000; 5: 20-27.
68. Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 1997; 72(1): 1-22.
69. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003; 9(6): 669-76.
70. Konukoğlu D, Turhan S. M. Molecular basis of angiogenesis mechanisms and tumor angiogenesis. *Cerrahpaşa J Med* 2005; 36: 42-48.
71. Kılıç T, Yıldırım Ö, Şahin S, Pamir MN. Glial tümörlerin anjiyogenezi, *Türk Nöroşirürji Dergisi* 2005; 15: 1-9.
72. Joan H. Schiller A, Mark A. Angiogenesis Inhibition in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. Socinski, Faculty and Disclosures CME Released: www.medspace.org. Medscape Oncology © 2006 Medscape, LLC./ 25.05.2018.

73. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971; 285(21): 1182-6.
74. ŞAHİN M. Meme Kanseri Antiöstrojen İlaçların Hipoksik Koşullarda VEGF Ekspresyonu Üzerindeki Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2014.
75. Fernandez PM, Rickles FR. Tissue factor and angiogenesis incancer. *Curr Opin Hematol.* 2002; 9(5): 401-6.
76. Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* 2003; 22(42): 6549-56.
77. Kimbro KS, Simons JW. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2006; 13: 739–749.
78. Alp E. Bevacizumab'ın Antianjiyogenik ve Apoptotik Etkilerinin Meme Kanseri Hücre Hattında Araştırılması, Doktora Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2011.
79. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219(4587): 983-5.
80. Bren EC. VEGF in Biological Control. *J Cell Biochem* 2007; 102: 1358-67.
81. BOZDUMAN T. Psöriazis'li hastalarda vasküler endotelyal büyüme faktör polimorfizminin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya A.D., 2014.
82. Cébe-Suarez S, Zehnder-Fjällman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63(5): 601-15.
83. Güllü İH, Akalın İ. Metastaz biyolojisi. *Üroonkoloji Dergisi* 2005; 4: 16-19.
84. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *The oncologist* 5 Suppl 2000; 1: 37–44.
85. Schmidt M, Voelker HU, Kapp M, Diet J, Kammerer U. Expression of VEGFR-1 (Flt-1) in breast cancer is associated with VEGF expression and with node-negative tumour stage. *Anticancer Res* 2008; 28: 1719–1724.
86. Hyder SM, Huang JC, Nawaz Z, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by estrogens and progestins. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 5785-90.
87. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 267-85.
88. Görüroğlu Öztürk. Ö.Matrix Metalloproteinase Enzyme Family. *Archives Medical Review Journal* 2013; 22(2): 209-220.
89. Araki Y, Mimura T. Matrix Metalloproteinase Gene Activation Resulting from Disordred Epigenetic Mechanisms in Rheumatoid Arthritis. *Int. J. Mol. Sci* 2017; 18(5): 905.
90. Yang SF, Hsieh YS, Lin CL et al. Increased plasma levels of urokinase plasminogen activator and matrix metalloproteinase-9 in nonsmall cell lung cancer patients. *Clin Chim Acta* 2005; 354: 91-99.

91. Reel B. Matriks Metalloproteinaz Enzimleri ve Ateroskleroz Türkiye Klin Tıp Bilimleri 2006; 26: 527–537.
92. Yan C, Boyd D D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J. Cell. Physiol* 2007; 211: 19–26.
93. Güngör H. Deneysel Kolorektal Kanser Modelinde Siklooksijenaz-2 İnhibitörlerinin Etkinliği ve Anjiyogenezisin Değerlendirilmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Elazığ; Fırat Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya A.D., 2014.
94. Sidhu HK. Genetic Removal of Matrix Metalloproteinase 9 Rescues the Symptoms of Fragile X Syndrome in a Mouse Model. Doktora Tezi. California; California Riverside Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, 2013.
95. Holanda AO, Oliveira AR, Cruz KJ et al. Zinc and metalloproteinases 2 and 9: What is their relation with breast cancer? *Rev Assoc Med Bras* 2017; 63(1): 78-84.
96. Benson CS, Babu SD, Radhakrishna S, Selvamurugan N, Ravi Sankar B. Expression of matrix metalloproteinases in human breast cancer tissues. *Dis Markers*. 2013; 34(6): 395-405.
97. Mehner C, Hockla A, Miller et al. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget* 2014; 5 (9): 2736–2749.
98. Yousef E M, Tahir M R, St-Pierre Y, Gaboury L A. MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of Breast cancer, *BMC Cancer* 2014; 14: 609.
99. Kumar V, Abbas A K, Fausto N, Lester S C. Cellular responses to stress and toxic insults: adaptation, injury, and death. *Pathologic Basis of Disease*. Editör: Aster JC. Philadelphia PA: Elsevier Saunders 2010.
100. GilmoreTDIntroduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives *Send to Oncogene* 2006; 25(51): 6680-4.
101. The Innovator for Science. <http://www.isogen-lifescience.com/nfkb-knockdown-hela/> 15.02.2018.
102. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 2007; 13(11): 460-9.
103. Greten FR, Karin M. The IKK/NF-kB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett* 2004; 206: 193-199.
104. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol* 2005; 5: 749–759.
105. Lawrence T. The Nuclear Factor NF-κB Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1(6):a001651. doi: 10.1101/cshperspect.a001651.
106. Hayden MS, et al. NF-kB and the immune response. *Oncogene* 2006; 25: 6758–6780.
107. Ghosh S, Karin M. Missingpieces in the NF-nB puzzle. *Cell* 2002; 109: 81–96.
108. Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* 2007; 29: 19-35.

109. Xia Y, Shen S, Verma IM. NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res* 2014; 2(9) :823-30.
110. Shao H, Yang B, Hu R, Wang Y. Matrine effectively inhibits the proliferation of breast cancer cells through a mechanism related to the NF- κ B signaling pathway. *Oncol Lett* 2013; 6: 517-520.
111. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003; 36(3): 131-149.
112. N C, S V. *Lippincott's Illustrated Reviews: Hücre ve Moleküler Biyoloji*. Yanık B (Çeviren) I. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2012: 215-225.
113. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York, Garland Science 2002; 19: 1065-1126.
114. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274(5293): 1672-1677.
115. Prof. Dr. Nevin İLHAN, Tıp Fakültesi Tıbbi biyokimya, Kanser Biyokimyası ders notları, 2018.
116. HC Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81: 323–330.
117. Cabadak H. Hücre siklusu ve kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2008; 9(3): 51–61.
118. Aktaş G. Mesane Karsinomlarında Siklin D1, Siklin E1 Rb, E2F1 ve p27 Gen Ekspresyonlarının Prognostik Faktörlerle İlişkisi, Uzmanlık Tezi, Bolu: Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji A.D., 2015.
119. Aytekin A. Papiller Tiroit Kanseri Hastalarda Siklin D1 (Ccn1) A870g Polimorfizminin Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Gaziantep: Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi A.D., 2014.
120. Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene* 2006; 2: 1620–162.
121. Israels ED, Israels LG. The Cell Cycle. *Oncologist* 2000; 5: 510-513.
122. Ulukaya E. Hücre döngüsü ve Kanserle ilişkisi. <http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf>/25.05.2018.
123. Aktuğ H. Apoptozis ve hücre döngüsü. *Ege Journal of Medicine* 2014; 53(1): 60-64.
124. Casimiro MC, Velasco-Velázquez M, Aguirre-Alvarado C, Pestell RG. Overview of cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape: past and present. *Expert Opin Investig Drugs*. 2014; 23(3): 295-304.
125. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982; 31: 99-109.
126. Nusse R, Varmus HE. Wnt genes. *Cell* 1992; 69(7): 1073-87.
127. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 2017; 169(6): 985-999.
128. Johan H, Nick B, Hans C. you Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway. *Curr. Opin. in genetics, Dev* 2003; 13: 28-33.

129. Willert K, Jones KA. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev* 2006; 20: 1394–1404.
130. Huelsken J, Behrens J. The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2002; 115(21): 3977-3978.
131. McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B. A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* 1991; 254: 1359-1361.
132. Xu W, Kimelman D. Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *J Cell Sci* 2007; 120: 3337-3344.
133. Xing Y, Takemaru K, Liu J et al. Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Structure* 2008; 16: 478-487.
134. Kimelman D, Xu W. Beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 2006; 25(57): 7482-91.
135. Dönmez GH, Demirezen Ş, Bektaş MS. Cytoplasmic Biomolecules of Wnt/Beta-Catenin Signaling Pathway. *Deü Tıp Fakültesi Dergisi* 2011; 25(3): 189-199.
136. Altınok B, Sunguroğlu A. WNT Sinyal Yolağı ve Kanser. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi* 2016; 15(2): 28-38.
137. Santaolalla R, Daniel AS, Jose RR, et al. TLR4 Activates the β -catenin Pathway to cause intestinal neoplasia. *PLoS One* 2013; 8(5): e63298.
138. López-Knowles E, Zardawi S. J, McNeil C M et al. Cytoplasmic localization of beta-catenin is a marker of poor outcome in breast cancer patients' Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev 2010; 19: 301–309.
139. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239-57.
140. Wallach D, Kovalenko A. Keeping inflammation at bay. *e LIFE* 2014; 3: e02583. doi: 10.7554/eLife.02583.
141. Lester SC. Cellular responses to stress and toxic insults: adaptation, injury, and death. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC (editors). *Pathologic Basis of Disease*. 8 th edition, Philadelphia: PA. Elsevier Saunders 2010; 1: 3-42.
142. *Pathologic Basis of Disease*. N, Aster JC (editors). 8 th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders 2010: 3-42.
143. Kurt Nezahat. Mcf-7 Meme Kanseri Hücre Kültüründe Dosetakselin Sin3a, Mdm2 ve P53 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi, İlişkisi, Doktora Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya A.D., 2016.
144. Muller PA, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities, *Cancer Cell* 2014; 25(3): 304-17.
145. Hussain SP, Harris CC. p53 Biological Network: At the Crossroads of the Cellular-Stress Response Pathway and Molecular Carcinogenesis, *J. Nippon Med. Sch* 2006; 73(2): 54-64.
146. Liang SH, Clarke MF. Regulation of p53 localization. *Eur. J. Biochem* 2001; 268: 2779-83.
147. Hanel W, Marchenko N, Xu S, et al. Two hot spot mutant p53 mouse models display differential gain of function in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 2013; 20: 898–909.

148. Gülsar MG, Özdemir HN, Çeviker K et al. Tümöröenezde P53 Geni Ve Genetik Tedavi Yaklaşımaları. Journal of Engineering Sciences and Design Sciences and Design 2016; 4(2): 133-135.
149. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. Annu Rev Immunol 1998; 16: 395-419.
150. Roemer K. Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. Biol Chem 1999; 380: 879-87.
151. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. Annual Review of Physiology 1998; 60: 601-17.
152. Annamalai P, Thayman M, Rajan S et al. Ethyl acetate extract from marine sponge *Hyattella cribriformis* exhibit potent anticancer activity by promoting tubulin polymerization as evidenced mitotic arrest and induction of apoptosis. Pharmacogn Mag 2015; 11: 345-55.
153. Krajewski S, Thor AD, Edgerton SM et al. Analysis of Bax and Bcl-2 expression in p53-immunopositive breast cancers. Clin Cancer Res 1997; 3: 199-208.
154. Gomez-Navarro J, Arafat W, Xiang J. Gene therapy for carcinoma of the breast: Pro-apoptotic gene therapy. Breast Cancer Res. 2000; 2: 32-44.
155. Kartlaşmış K, Kökbaş U, Kayrın L. Biochemistry of Apoptosis Archives Medical Review Journal 2016; 25(1):52-69.
156. Türktez Aydın B. Memenin İnvaziv Duktal Karsinomunda Telomeraz Aktivitesi ve Apoptozisin İmmunohistokimyasal ve Western Blot Yöntemleri Kullanılarak Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji A.D., 2010.
157. Kymionis GD, Dimitrakakis CE, Konstadoulakis MM, et al. Can expression of apoptosis genes, bcl-2 and bax, predict survival and responsiveness to chemotherapy in node-negative breast cancer patients? J Surg Res 2001; 99: 161-168.
158. Trere D, Montanaro L, Ceccarelli C, et al. Prognostic relevance of a novel semiquantitative classification of Bcl2 immunohistochemical expression in human infiltrating ductal carcinomas of the breast. Ann Oncol 2007; 18: 1004-1014.
159. Sierra A, Castellsague X, Escobedo A, et al. Bcl-2 with loss of apoptosis allows accumulation of genetic alterations: a pathway to metastatic progression in human breast cancer. International journal of cancer. Journal international du cancer 2000; 89(2); 142-7.
160. Jindal A, Mohi MK, Kaur M, Kaur B. Endometrial evaluation by ultrasonography hysteroscopy and histopathology in cases of breast carcinoma on Tamoxifen therapy. 2015; 6(2): 59-65.
161. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. Cancer 1989; 63: 181-187.
162. Liu FS, Jan YJ, Lai CR. Expression analysis of apoptosis-related markers TP53, BCL-2, BAX and c-MYC in female genital tract sarcomas, J Chin Med Assoc. 2008; 71: 628-34.

163. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics 2001. *CA Cancer J Clin.* 2001; 51: 15–36.
164. Özdoğan M. “Memenin ve meme kanserinin tarihi”. <https://www.drozdogan.com/memenin-ve-meme-kanserinin-tarihi/> 01.02. 2018.
165. Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed, International Agency for Research on Cancer (IARC) Lyon/Geneva, 12 December 2013.
166. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı. Türkiye Kanser İstatistikleri 2016. <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/922-2009-kanser-insidanslar%C4%B1.html/> 02.02. 2018.
167. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2017. Atlanta: American Cancer Society; 2017.
168. Althuis MD, Dozier JD, WF A, et al. Global trends in breast cancer incidence and mortality. 1973-1997.
169. Amir E, Freedman OC, Seruga B, Evans DG. Assessing women at high risk of breast cancer: A review of risk assessment models. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102: 680-91.
170. Weiss SE. Ethnic differences in risk and prognostic factors for breast cancer. *Cancer* 1995; 76: 268-74.
171. Box BA, Russel CA. Breast Cancer. In: Casciato DA (Ed.). *Manual of clinical oncology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2004: 233-53.
172. Öztürk Cansu. “Meme Kanseri Epidemiyolojisi ve Türkiye’de Güncel Durum” <http://kanser.gov.tr/Dosya/Medya/Haberler/cansu.pdf/> 10.02. 2018.
173. Walsh T, Mandell JB, Norquist BM et al. Genetic Predisposition to Breast Cancer Due to Mutations Other Than BRCA1 and BRCA2 Founder Alleles Among Ashkenazi Jewish Women. *JAMA Oncol* 2017.
174. Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas.* 2001; 38(1): 103-113.
175. Korzeniowsky S. Reproductive history and prognosis in patients with operable breast cancer. *Cancer* 1994; 74: 1591-94.
176. Wohlfahrt J, Melby M. Age at any birth is associated with breast cancer risk. *Epidemiology* 2004; 12: 68-73.
177. Rosner B, Colditz GA, Willett WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 1994; 139: 819-35.
178. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet* 2002; 360(9328): 187-95.

179. Yoo KY, Kang D, Park SK, et al. Epidemiology of breast cancer in Korea: occurrence, high-risk groups, and prevention. *Korean Med Sci* 2002; 17: 1–6.
180. Sherman ME, Figueroa JD, Henry JE, et al. The Susan G. Komen for the Cure Tissue Bank at the IU Simon Cancer Center: a unique resource for defining the “molecular histology” of the breast. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; 5(4): 528–535.
181. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. Breast cancer. *Lancet* 2005; 365: 1727–41.
182. Modan B, Ron E, Lerner-Geva L et al. Cancer incidence in a cohort of infertile women. *Am J Epidemiol* 1998;147: 1038-42.
183. Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 51: 227-238.
184. Gruber CJ, Wieser F, Gruber IM et al. Current concepts in aesthetic endocrinology. *Gynecol Endocrinol* 2002; 16(6): 431-41.
185. Colditz GA, Rosner B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 2000; 152: 950-64.
186. Rosner B, Colditz GA. Nurses'health study: log-incidence mathematical model of breast cancer incidence. *J Natl Cancer Inst.*1996; 88: 359–364.
187. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993; 15.
188. Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *JNCI.*2002; 8: 606–616.
189. Karahan H, Kelicen EP. Aromatase inhibitors in breast cancer therapy. *The Journal of Breast Health* 2011; 7 (2): 90-95.
190. Kahlenborn C, Modugno F, Potter DM, Severs WB. Oral contraceptive use as a risk factor for premenopausal breast cancer: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2006; 81(10): 1290-1302.
191. Casey PM, Cerhan JR, Pruthi S. Oral Contraceptive Use and the Risk of Breast Cancer. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(1): 86-91.
192. Michels KA, Pfeiffer RM, Brinton LA, Trabert. Modification of the Associations Between Duration of Oral Contraceptive Use and Ovarian, Endometrial, Breast, and Colorectal Cancers. *JAMA Oncol.* 2018, doi: 10.1001/jamaoncol 2017.
193. Angioli R, Luvero D, Armento G et al. Hormone replacement therapy in cancer survivors: Utopia? 2018; 124: 51-60.
194. Schairer C, Lubin J, Troisi R et al. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA* 2000; 283: 485-91.
195. Román M, Sakshaug S, Graff-Iversen S et al. Postmenopausal hormone therapy and the risk of breast cancer in Norway. *Int J Cancer* 2016; 138: 584 - 93.

196. American Cancer Society. Breast Cancer Early Detection. <http://www.cancer.org/Cancer/BreastCancer/> 05.03.2018.
197. Garber J. Risk Factors. in: Silva EO, Zumda S (Eds.). Breast cancer. 3dh ed. Oxford: Elsevier Saunders 2005; 26-53.
198. Schwartz GF, Hughes KS, Lynch HT, et al. Proceedings of the international consensus conference on breast cancer risk, genetics, risk management. Cancer 2008; 113(10): 2627-37.
199. Szabo CI, King MC. Inherited breast and ovarian cancer. 1995; (4):1811-7.
200. ‘‘BRCA1 ve BRCA2 DNA Testi (tüm gen)’’<http://www.kansergenetigi.com/tr/brca1-ve-brca2-dna-testi-tum-gen/> 05.03.2018.
201. Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonu Meme Kanseri Eğitim Modülü. http://www.tmhdf.org.tr/Uploads/Editor/files/MemeKanseri_UzmanHekim.pdf/ 06.03.2018.
202. Ahn J, Schatzkin A, Lacey JV Jr, et al. Adiposity, adult weight change, and postmenopausal breast cancer risk. Arch Intern Med 2007; 167(19): 2091-102.
203. Pathak DR, Whittemore AS. Combined effects of body size, parity, and menstrual events on breast cancer incidence in seven countries. Am J Epidemiol 1992; 135: 153-168.
204. Willett WC, Browne ML, Bain C, et al. Relative weight and risk of breast cancer among premenopausal women. Am J Epidemiol 1985; 122: 731-740.
205. Rinaldi S, Key TJ, Peeters PH, et al. Anthropometric measures, endogenous sex steroids and breast cancer risk in postmenopausal women: a study within the EPIC cohort. Int J Cancer 2006; 118: 2832-9.
206. He XY, Liao YD, Yu S, Zhang Y, Wang R. Sex hormone binding globulin and risk of breast cancer in postmenopausal women: a meta-analysis of prospective studies. 2015; 47(7): 485-90.
207. Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. JAMA 2001; 286: 2143-2151.
208. Chen WY, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC. Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. 2011; 306(17): 1884-90.
209. Cho E, Spiegelman D, Hunter DJ et al. Premenopausal intakes of vitamins A, C, and E, folate, and carotenoids and risk of breast cancer. 2003; 12: 713-720.
210. Suzuki R, Ye W, Rylander-Rudqvist T et al. Alcohol and postmenopausal breast cancer risk defined by estrogen and progesterone receptor status: a prospective cohort study. J Natl Cancer Inst 2005; 97: 1601-8.
211. Cui Y, Miller AB, Rohan TE. Cigarette smoking and breast cancer risk: update of a prospective cohort study. Breast Cancer Res Treat 2006; 100: 293-9.

212. John EM, Phipps AI, Knight JA, et al. Medical radiation exposure and breast cancer risk: findings from the Breast Cancer Family Registry. *Int J Cancer* 2007; 121: 386-94.
213. Howard RA, Leitzmann MF, Linet MS, Freedman DM. Physical activity and breast cancer risk among pre- and postmenopausal women in the U.S. Radiologic Technologists cohort. *Cancer Causes Control* 2009; 20: 323-33.
214. Kohler LN, Garcia DO, Harris RB, et al. Adherence to Diet and Physical Activity Cancer Prevention Guidelines and Cancer Outcomes: A Systematic Review. 2016; 25(7): 1018-28.
215. Bernstein L, Ross RK, Lobo RA et al. The effects of moderate physical activity on menstrual cycle patterns in adolescence: Implications for breast cancer prevention. *Br J Cancer* 1987; 55: 681-685.
216. Degnim AC, Visscher DW, Berman HK, et al. Stratification of breast cancer risk in women with atypia: a Mayo cohort study. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2671-7.
217. Kabat GC, Jones JG, Olson N, et al. A multi-center prospective cohort study of benign breast disease and risk of subsequent breast cancer. *Cancer Causes Control* 2010; 21(6): 821-8.
218. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, Sun L, Stone J, Fishell E, et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med* 2007; 356: 227-36.
219. Welsch MA, Cohen LA, Welsch CW. Inhibition of growth of human breast carcinoma xenografts by energy expenditure via voluntary exercise in athymic mice fed a high fat diet. *Nutr Cancer* 1995; 23: 309-318.
220. Welsch CW. Interrelationship between dietary lipids and calories and experimental mammary gland tumorigenesis. *Cancer* 1994; 74: 1055-1062.
221. Trichopoulos A, Toupadaki N, Tzonou A, et al. The macronutrient composition of the Greek diet: Estimates derived from six case control studies. *Eur J Clin Nutr* 1993; 47: 549-558.
222. Adlercreutz CH, Goldin BR, Gorbach S et al. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr.* 1995; 125: 757-770.
223. Cook NR, Lee IM, Gaziano JM, Gordon D, Ridker PM, Manson JE, et al. Low-dose aspirin in the primary prevention of cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005; 294: 47-55.
224. Takkouche, B, Regueira-Mendez C, Etminan M. Breast cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: ameta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 1439-47.
225. Bhatt AP, Redinbo MR, Bultman SJ. The role of the microbiome in cancer development and therapy. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2017; 67(4): 326-44.
226. Sergentanis TN, Zagouri F, Zografos GC. Is antibiotic use a risk factor for breast cancer? A metaβanalysis. *Pharmacoepidemiology and drug safety.* 2010; 19(11): 1101-7.
227. Tarhan ÖR. "Meme Kanseri Tipleri (Çeşitleri)" <http://www.turkcerrahi.com/makaleler/meme/meme-kanseri/tipleri-cesitleri/> 15.03. 2018.

228. Tavassoli FA. Pathology and genetics tumours of the breast and female genital organs WHO Classification of tumours. Devilee P (eds). IARC Press Lyon, 2003.
229. Yoder BJ, Wilkinson EJ, Massoll NA. Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast. *Breast J* 2007; 13(2): 172-9.
230. Leonard GD, Swain SM. Ductal carcinoma in situ, complexities and challenges. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 906-920.
231. Darendeliler E. Meme kanserinin epidemiyolojisi ve etyolojisi. Topuz E (editör). Meme Kanseri Biyoloji, Tanı, Evreleme Tedavi. 3.baskı, İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Yayınları, 1997: 16-32.
232. Anderson BO, Li CI, Rinn KJ et al. Clinical management of lobular carcinoma InSitu. In advanced therapy of Breast Diseases. 2.ed. Singletary SE, Robb GI, Hortabagyi GN. BC Decker Inc 2004: 269-280.
233. Sak SD. Meme kanserlerinin histopatolojik özellikleri. *Klinik Gelişim* 1999; 12: 708-712.
234. Kuzey GM. Temel Patoloji. 1.Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi 2007.
235. Cartens PHB, Greenberg RA, Francis D, et al. Tubular carcinoma of the breast: long term follow-up. *Histopathology* 1995; 9:221-280.
236. Singletary E, Allred C, Ashley P, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 362-7.
237. American College of Radiology: Standards for the performance of diagnostic mammography and problem solving breast evaluation (Adopted by the ACR Council 1994). In: ACR Digest of Official Actions. Reston, VA, American College of Radiology 1994.
238. Abrous-Anane S, Savignoni A, Daveau C, Pierga JY, Gautier C, Rey F. et al. Management of inflammatory breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 2010; 1016: 1 – 9.
239. Paget J. On disease of the mammary areola preceding cancer of the mammary gland. *St Bartholomew's Hosp Rep* 1874; 10: 87.
240. Cleator S, Heller W, Coombes RC. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol* 2007; 8(3): 235-44.
241. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10869-74.
242. Woodward WA, Strom EA, Tucker SL, et al. Changes in the 2003 American Joint Committee on Cancer staging for breast Cancer dramatically affect stage-specific survival. *J Clin Oncol* 2003; 21(17): 3244-8.
243. Dinçol D. Meme Kanserinde Prognostik Faktörler. *T Klin Tıp Bilimleri* 1992.
244. Gianni L, Dafni U, Gelber RD, et al. Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2- positive early breast cancer: a 4-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2011; 12(3): 236-44.

245. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(16): 1659–72.
246. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344(11): 783–92.
247. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31(1): 13-20.
248. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, et al. The Cell Proliferation-associated Antigen of Antibody Ki-67: A Very Large, Ubiquitous Nuclear Protein with Numerous Repeated Elements, Representing a New Kind of Cell Cyclemaintaining Proteins. *The Journal of Cell Biology* 1993; 123: 513- 522.
249. Gökdemir A. Kemiğin Dev Hücreli Lezyonlarında Hücre Siklus Proteinlerinin (Siklin D1, Siklin D3, P21, P27) ve Ki-67'nin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2006.
250. Clark GM, McGuire WL. Steroid receptors and other prognostic factors in primary Breastcancer. *Semin Oncol* 1988; 15: 20-5.
251. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 2006; 116(3): 561-570.
252. Murphy LC, Dotzlaw H, Leygue E, Coutts AS, Watson P. The pathophysiological role of estrogen receptor variants in human breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1998; 65 (1-6): 175-180.
253. Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*. 1999; 140 (12): 5566-5578.
254. Zilli M, Grassadonia A, Tinari N, et al. Consorzio Interuniversitario Nazionale per la Bio-Oncologia (CINBO). Molecular mechanisms of endocrine resistance and their implication in the therapy of breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1795(1): 62-81.
255. Wu X, Hawse JR, Subramaniam M. The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor alpha for degradation in breast cancer cells. *Cancer Res* 2009; 69: 1722-1727.
256. Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH. Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Research*. 1998; 58: 3197-3201.
257. Ali S, Coombes RC. Estrogen receptor alpha in human breast cancer: occurrence and significance. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2000; 5: 271-281.
258. Klinge CM. Estrogen Receptor Interaction with Co-activators and Corepressors. *Steroids*. 2000; 65: 227-251.

259. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *J. Biol. Chem* 2001; 276: 36869-36872.
260. Gül HF, İlhan Necip. Biyosinyalleşme ve Sinyal İletişim Yolakları. Doktora Semineri. Fırat Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü 2014, 33-35.
261. Schote-Frese A. Nuclear reseptors; Variants and their role in neuro-endocrine-İmmune regulation. Doctoral thesis, Luxembourg: University of Trier and the Institute of Immunology, National Laboratory of Health, 2008,
262. Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogen receptors - an overview. *J. Intern Med.* 1999; 246(2): 133-8. Review.
263. Riggins RB, Schrecengost RS, Guerrero MS, Bouton AH. Pathways to tamoxifen resistance. *Cancer Lett.* 2007; 256(1): 1-24.
264. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 1997; 389: 753-758.
265. Aumais JP, Lee HS, Lin R, White JH. Selective interaction of hsp90 with an estrogen receptor ligand-binding domain containing a point mutation. *The Journal of Biological Chemistry.* 1997; 272: 12229-12235.
266. Kong EH, Pike ACW, Hubbard RE. Structure and mechanism of the oestrogen receptor. *Biochemical Society Transactions.* 2003; 31(1): 56-59.
267. NJ McKenna, J Xu, Z Nawaz, et al. Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *The journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 1999; 69(1-6): 3–12.
268. Nilsson S, Makela S, Treuter E, et al. Mechanisms of Estrogen Action. *Phsiol. Rev* 2001; 81: 1535-1565.
269. Griekspoor A, Zwart W, Neefjes J, Michalides R. Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells. *Nuclear Receptor Signaling. The Open Access Journal of the Nuclear Receptor Signaling Atlas* 2007; 5: 1-9.
270. Mehmetoğlu İ. Klinik Biyokimya Laboratuvarı El Kitabı Genişletilmiş ve Gözden Geçirilmiş 4. Baskı, Nobel Matbaacılık, İstanbul, 2007.
271. Cheung KL, Graves CR, Robertson JF. Tumor marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2000; 26: 91-102.
272. Michael J Duffy, Serum Tumor Markers in Breast Cancer: Are They of Clinical Value? *Clinical Chemistry* 2006; 52(3): 345–351.
273. Haagensen DEJr, Kister SJ, Vandevoorde JP, et al. Evaluation of carcinoembryonic antigen as a plasma monitor for human breast carcinoma. *Cancer* 1978; 42, 1512-1519.
274. Mughal AW, Hortobagyi GN, Fritsche HA. Serial plasma carcinoembryonic antigen measurements during treatment of metastatic breast cancer. *JAMA* 1983; 249 (14):1881–1886.
275. Rogers GT. Carcino embryonic antigen and related glycoproteins molecular aspects and specificity. *Biochim Biophys Acta* 1983; 695: 227–249.

276. Hacibekiroğlu Münire. Meme Kanserinde Tümör Marker'lar ve Biyokimyasal Değişimler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Sempozyum Dizisi No: 54. Aralık 2006: 35 – 41.
277. Ergün C. Kronik Karaciğer Hastalıklarında Tümör Belirleyicileri. Uzmanlık Tezi, Konya: Selçuk Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D., 2006.
278. Miserez AR, Gunes I, Muller, et al. Clinical value of a mucin –like carcinoma-associated in monitoring breast cancer patients in comparison with CA 15. 3.Eur J Cancer 1991; 27: 126 – 131.
279. Clinical, Virologic And Pathologic Significance Of Elevated Serum Alpha- Fetoprotein levels in Patients With Chronic Hepatitis C. 1998: 147-9.
280. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UK et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast and ovarian cancers. Clin Chem 2008; 54: 11–79.
281. Kallioniemi OP, Oksa H, Aaran RK, et al. Serum CA 15-3 assay in the diagnosis and follow-up of breast cancer. Br J Cancer 1988; 58: 213-215.
282. Duffy MJ, Evoy D, McDermott EW. CA 15-3: Uses and limitation as a biomarker for breast cancer. Clin Chim Acta. 2010; 411(23-24): 1869-74.
283. Duncan JL, Price A, Rogers K. The use of CA 15 -3 as a serum tumour marker in breast carcinoma. Eur J Cancer Clin Oncol 1991; 17: 16 – 19.
284. Kalra EK. Nutraceutical - Definition and Introduction. AAPS PharmSci. 2003; 5(3): 27–28.
285. Bozovic-Spasojevic, I Azambuja, E McCaskill-Stevens, et al. Chemoprevention for breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* 2012; 38: 329–339.
286. Files JA, Stan DL, Allen SV, Pruthi S. Chemoprevention of breast cancer. *Women's Health* 2012; 8: 635–646.
287. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Review 1998; 56: 317-333.
288. Mandal A, Bishayee A. Mechanism of Breast Cancer Preventive Action of Pomegranate: Disruption of Estrogen Receptor and Wnt/ β -Catenin Signaling Pathways. *Molecules* 2015; 20(12): 22315-22328.
289. Kolaç T, Gürbüz P, Yetiş G, Phenolic Content And Antioxidant Characteristics Of Natural Products. İ.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi 2017; 5(1): 26-42.
290. Surangi H, Thilakarathna HP, Vasantha Rupasinghe. Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. *Nutrients* 2013; 9: 3367-3387.
291. Wang L, Lee IM, Zhang SM, et al. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(3): 905–912.
292. Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research* 1998; 18(12): 1995-2018.

293. Bishayee A, Mandal A, Bhattacharyya P, Bhatia D. Pomegranate exerts chemoprevention of experimentally induced mammary tumorigenesis by suppression of cell proliferation and induction of apoptosis. *Nutr Cancer* 2016; 68(1): 120-130.
294. Sayed DN, Chamcheu JC, Adhami VM, Mukhtar H. Pomegranate extracts and cancer prevention: molecular and cellular activities. *Anticancer Agents Med. Chem* 2013; 13: 1149–1161.
295. Turrini E, Ferruzzi L, Fimognari C. Potential effects of pomegranate polyphenols in cancer prevention and therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2015; Article ID 938475 doi:10.1155/2015/938475.
296. Sreeja S, Hima S, Parvathy M, Juberiya MA, Sreeja S. Pomegranate Fruit as a Rich Source of Biologically Active Compounds. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International 2014; Article ID 686921, doi: 10.1155/2014/686921.
297. Jurenka J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alternative Medicine Review* 2008; 13(2): 128-144.
298. Neurath AR, Strick N, Li YY, Debnath AK. *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC Infectious Diseases* 2004; 4: 41.
299. Negi PS, Jayaprakasha GK, Jena BS. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry* 2003; 80 (3): 393-397.
300. Tache S, Ladam A, Corpet DE. Chemoprevention of aberrant crypt foci in the colon of rats by dietary onion. *European Journal of Cancer* 2007; 43: 454-458.
301. Seeram N, Lee R, Hardy M, Heber D. Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology* 2005; 41: 49-55.
302. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002; 13(10): 572-584.
303. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 2002; 20(7): 933-956.
304. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 2004; 36(7): 838-849.
305. Adams LS, Seeram NP, Aggarwal BB, et al. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J Agric Food Chem* 2006; 54(3): 980-985.
306. Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 2007; 109(2): 177-206.
307. Aslam MN, Lansky EP, Varani J. Pomegranate as a cosmetic source: pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *J Ethnopharmacol* 2006; 103(3): 311-318.

308. Okamoto T, Akuta T, Tamura F, et al. Molecular mechanism for activation and regulation of matrix metalloproteinases during bacterial infections and respiratory inflammation. *Biol Chem* 2004; 385(11): 997-1006.
309. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 1996; 12(4): 274-277.
310. Rasheed Z, Akhtar N, Anbazhagan AN, et al. Polyphenol-rich pomegranate fruit extract (POMx) suppresses PMACI-induced expression of pro-inflammatory cytokines by inhibiting the activation of MAP Kinases and NF-kappaB in human KU812 cells. *J Inflamm (Lond)* 2009; 6: 1-12.
311. Banerjee N, Kim H, Talcott S, Mertens-Talcott S. Pomegranate polyphenolics suppressed azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci and inflammation: possible role of miR-126/VCAM-1 and miR-126/PI3K/ AKT/mTOR. *Carcinogenesis* 2013; 34(12): 2814-2822.
312. Faria A, Calhau C. The Bioactivity of Pomegranate: Impact on Health and Disease, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2011; 51(7): 626-634.
313. Bhatia D, Thoppil RJ, Mandal A, et al. Pomegranate Bioactive Constituents Suppress Cell Proliferation and Induce Apoptosis in an Experimental Model of Hepatocellular Carcinoma: Role of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Evid. Based Complement. Altern. Med* 2013; 371813. doi: 10.1155/2013/371813.
314. Toi M, Bando H, Ramachandran C, et al. Preliminary studies on the anti-angiogenic potential of pomegranate fractions in vitro and in vivo. *Angiogenesis* 2003; 6(2): 121-128.
315. Adams LS, Zhang Y, Seeram NP, Heber D, Chen S. Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells In vitro. *Cancer Prevention Research* 2010; 3(1): 108-113.
316. Kim ND, Mehta R, Yu W, et al. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 71(3): 203-217.
317. Mehta R, Lansky EP. Breast cancer chemopreventive properties of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in a mouse mammary organ culture. *Eur. J. Cancer Prev* 2004; 13: 345-348.
318. Banerjee N, Talcott S, Safe S, Mertens-Talcott SU. Cytotoxicity of pomegranate polyphenolics in breast cancer cells in vitro and vivo: Potential role of miRNA-27a and miRNA-155 in cell survival and inflammation. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 136: 21-34.
319. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis, *Seminars in Cancer Biology*. 2000; 10(6): 415-433.
320. Khan GN, Gorin MA, Rosenthal D, et al. Pomegranate fruit extract impairs invasion and motility in human breast cancer. *Integr Cancer Ther* 2009; 8(3): 242-253.
321. Ludwig RL, Bates S, Vousden KH. Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 49-52.

322. Shirode AB, Kovvuru P, Chittur SV, et al. Antiproliferative effects of pomegranate extract in MCF-7 breast cancer cells are associated with reduced DNA repair gene expression and induction of double strand breaks. *Molecular Carcinogenesis* 2014; 53(6): 458-470.
323. Wang G, Gormley M, Qiao J, et al. Cyclin D1-mediated microRNA expression signature predicts breast cancer outcome Theranostics. 2018; 11 (8): 2251-2263.
324. Periyasamy K, Baskaran K, Ilakkia A, et al. Antitumor efficacy of tangeretin by targeting the oxidative stress mediated on 7,12-dimethylbenz(a) anthracene-induced proliferative breast cancer in Sprague-Dawley rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015; 75(2): 263-272.
325. Gao Z, Gao W, Zenga SL, Li P, Liu EH. Chemical structures, bioactivities and molecular mechanisms of citrus polymethoxyflavones. *Journal of Functional Foods* 2018; 40: 498-509.
326. Goldenberg L, Yaniv Y, Porat R, Carmi N. Mandarin fruit quality: a review. *J. Sci. Food Agric* 2018; 98: 18-26.
327. Periyasamy K, Sivabalan V, Baskaran K, Kasthuri K, Sakthisekaran D. Cellular metabolic energy modulation by tangeretin in 7,12-dimethylbenz(a) anthracene-induced breast cancer. *J Biomed Res* 2016; 30(2): 134-141.
328. Sghaiera MB, Skandrani I, Nasra N, et al. Flavonoids and sesquiterpenes from *Tecurium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure–activity relationship study. *Environmental Toxicology and Pharmacology AAPS* 2011; 32: 336–348.
329. Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines, *Eur. J. Nutr* 1999; 38; 133-142.
330. Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, et al. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* 2000; 87(4): 595-600.
331. Hayashi A, Gillen AC, Lott JR. Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon-25 tumor growth in Balb-c mice. *Altern Med Rev* 2000; 5(6): 546-52.
332. Manthey JA, Guthrie N. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines *J Agric Food Chem* 2002; 50(21): 5837-43.
333. Kandaswami C, Perkins E, Soloniuk DS, Drzewiecki G, Middleton EJ. Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro. *Cancer Lett* 1999; 56(2): 147-52.
334. Kandaswami C, Perkins E, Drzewiecki G, Soloniuk DS, Middleton E. Differential inhibition of proliferation of human squamous cell carcinoma, gliosarcoma and embryonic fibroblast-like lung cells in culture by plant flavonoids. *Anticancer Drugs* 1999; 3(5): 525-30.
335. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999; 63(5): 896-918.

336. Yáñez J, Vicente V, Alcaraz M, et al. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutr Cancer* 2004; 49(2): 191-9.
337. Pan MH, Chen WJ, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Tangeretin induces cell-cycle G1 arrest through inhibiting cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2002; 23(10): 1677-84.
338. Lakshmi A, Subramanian S. Chemotherapeutic effect of tangeretin, a polymethoxylated flavone studied in 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene induced mammary carcinoma in experimental rats. *Biochimie* 2014; 99: 96-109.
339. Morley KL, Ferguson PJ, Koropatnick J. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer Lett* 2007; 251(1): 168-78.
340. Surichan S, Arroo RR, Tsatsakis AM, Androutsopoulos VP. Tangeretin inhibits the proliferation of human breast cancer cells via CYP1A1/CYP1B1 enzyme induction and CYP1A1/CYP1B1-mediated metabolism to the product 4' hydroxy tangeretin. *Toxicol In Vitro* 2018; 50: 274-284.
341. Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol* 2006; 71(10): 1397-421.
342. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev* 2003; 23(4): 519-34.
343. Bocco A, Cuvelier ME, Richard H, Berset C. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Food Chem* 1998; 46: 2123-2129.
344. Li BB, Smith B, Hossain MM. Extraction of Phenolics from Citrus Peels, I Solvent Extraction Method. *Sep Purif Technol* 2006; 48: 182-8.
345. Tumbas VT, Cetkovic GS, Djilas SM, et al. Antioxidant Activity of Mandarin (*Citrus reticulata*) peel, *APTEFF* 2010; 41: 195-203.
346. Lakshmi A, Subramanian SP. Tangeretin ameliorates oxidative stress in the renal tissues of rats with experimental breast cancer induced by 7,12-dimethylbenz [a]anthracene. *Toxicology Letters* 2014; 229(2): 333–348.
347. ZhiBiao Y, Yan Y, YiZeng L, Bao Z. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids, *Food Sci Tech* 2008; 41: 597-603.
348. Stapleton AE, Walbot V. Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiol* 1994; 105: 881-889.
349. Kooststra M. Protection from UV-B induced DNA damage by flavonoids. *Plant Mol. Biol* 1994; 26: 771-774.
350. Shimoi K, Masuda S, Furogori M, Esaki S, Kinae N. Radioprotective affect of antioxidative flavonoids in γ -ray irradiated mice. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2669-2672.

351. Benavente-García O, Castillo J, Marin RF, Ortun A, Del Río JA. Uses and Properties of Citrus Flavonoids. *J. Agric. Food Chem* 1997; 45(2): 4505-4515.
352. Elisa T, Maurizio LG, Santo G, Danila DM, Marco G. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review *Food Chemistry* 2007; 104(2): 466-479.
353. Thomas W. Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? *Seminars in Cancer Biology* 2007; 17(5): 354-362.
354. Tamimi RM, Lagiou P, Adami H, Trichopoulos D Prospect for Chemoprevention of Cancer, *Canc Contr J* 2002; 4: 55-64.
355. Nugroho PA, Putri DA, Darma AP, Riyanto S, Meiyanto E. Penelusuran Mekanisme Penekanan Ekspresi N-Ras Ekstrak Etanolik Kulit Jeruk Keprok (*Citrus reticulata*) Sebagai Agen Kemopreventif Docking Molekuler pada Protein Target C-SRC dan CYP1A2, *Proceeding. Kongres Ilmiah XVI Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia* 2008: 184-192.
356. Murakami A, Nakamura Y, Torikai K, et al. Inhibitory Effect of Citrus Nobiletin on Phorbol Ester-Induced Skin Inflammation, Oxidative Stress and Tumor Promotion in Mice. *Cancer Res* 2000; 60: 5059-66.
357. Johann S, Oliveira VL, Pizzolatti MG, et al. Antimicrobial Activity of Wax and Hexane Extracts from Citrus spp. Peels. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 681-5.
358. Nugroho PA, Sukamdi DP, Darma AP, Jenie RI, Meiyanto E. Penelusuran Mekanisme Flavonoid Kulit jeruk keprok (*Citrus reticulata*) Sebagai Agen Kemopreventif Melalui Docking Molekul pada Protein Target CYP1A2. *Farmasains* 2010; 1: 37-44.
359. Jaganathan SK, Vellayappan MV, Narasimhan G, Supriyanto E. Role of pomegranate and citrus fruit juices in colon cancer prevention. *World J Gastroenterol* 2014; 20(16): 4618-25.
360. Vanamala J, Leonardi T, Patil BS, et al. Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1257-1265.
361. Kohno H, Yoshitani S, Tsukio Y, et al. Dietary administration of citrus nobiletin inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Life Sci* 2001; 69: 901-913.
362. Lien LM, Wang MJ, Chen RJ, et al. Nobiletin, a Polymethoxylated Flavone, Inhibits Glioma Cell Growth and Migration via Arresting Cell Cycle and Suppressing MAPK and Akt Pathways. *Phytother Res* 2016; 30(2): 214-21.
363. Ma X, Jin S, Zhang Y, et al. in vivo Inhibitory effects of nobiletin on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Phytother Res* 2014; 28(4): 560-7.
364. Arivazhagan L, Sorimuthu PS. Tangeretin, a citrus pentamethoxyflavone, exerts cytostatic effect via p53/p21 up-regulation and suppresses metastasis in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary carcinoma. *J Nutr Biochem* 2014; 25(11): 1140-1153.
365. Van SS, Parmar VS, Sharma SK. Tangeretin inhibits extracellular-signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation. *FEBS Lett* 2005; 14: 579(7): 1665-9.

366. Yoshimizu N, Otani Y, Saikawa Y, et al. Anti-tumour Effects of Nobiletin, A Citrus Flavonoid, on Gastric Cancer Include: Antiproliferative Effects, Induction of Apoptosis and Cell Cycle Deregulation, *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 1: 95-101.
367. Ma LL, Wang DW, Yu XD, Zhou YL. Tangeretin induces cell cycle arrest and; apoptosis through upregulation of PTEN expression in glioma cells. *Biomed Pharmacother* 2016; 81: 491-496.
368. Das A, Miller R, Lee P, et al. A novel component from citrus, ginger, and mushroom family exhibits antitumor activity on human meningioma cells through suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Tumor Biol* 2015; 36: 7027–7034.
369. Min HP, Wei JC, Shoei YLS, Chi TH, Jen KL. Tangeretin induces cell-cycle G1 arrest through inhibiting cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1677-84.
370. Hirano T, Abe K, Gotoh M, Oka K. Citrus Flavone Tangeretin Inhibits Leukemic HL-60 Cell Growth Partially through Induction of Apoptosis with Less Cytotoxicity on Normal Lymphocytes. *Br J Cancer* 1995; 72: 1380-8.
371. Kim H, Moon JY, Mosaddik A, Cho SK. Induction of apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells by polymethoxylated flavone-rich *Citrus grandis* Osbeck (Dangyuja) leaf extract. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(8-9): 2435-42.
372. Dong Y, Cao A, Shi J, et al. Tangeretin, a citrus polymethoxyflavonoid, induces apoptosis of human gastric cancer AGS cells through extrinsic and intrinsic signaling pathways. *Oncol Rep* 2014; 31(4): 1788-9.
373. Meiyanto E, Hermawan A. Anindyajati Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(2): 427-36.
374. Pratomo I, Sri L, Perdana H, Edy Meiyanto E. Chemoprevention effects of ethanolic extract Keprok Citrus peels (*Citrus reticulata*) on epithelial mammary and liver cells of Sprague Dawley rats induced by 7,12-Dimethylbenz-[a]anthracene; *Proceeding The International symposium on Molecular targeted Therapy*. 2008: 83-93.
375. Hanahan D, Weinberg RA. Review hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674.
376. Puspita N, Ardiani M, Gunadi FA, Septisetyani EP, Meiyanto E. *reticulata* Meningkatkan Ekspresi Faktor Angiogenik VEGF pada Sel Kanker Kolon WiDr. *Kongres Ilmiah XVI Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia*, 50-54 (In Indonesia). *Ekstrak Etanolik Kulit Jeruk Mandarin Citrus* 2008.
377. Edison C, Rosa A, Dyaningtyas DPPMN, et al. Antiangiogenic Effect of Ethanol Extract of *Citrus Reticulata* Peel In The Chorio Allantoic Membrane (CAM) Induced by bFGF. *Proceeding Molecular Targeted Therapy Symposium Faculty of Pharmacy UGM* 2008: 57-66.

378. Chen J, Chen A, Huang H, et al. The flavonoid nobiletin inhibits tumor growth and angiogenesis of ovarian cancers via the Akt pathway. *Int J Oncol* 2015; 46(6): 2629–2638.
379. Chien SY, Hsieh MJ, Chen CJ, Yang SF, Chen MK. Nobiletin inhibits invasion and migration of human nasopharyngeal carcinoma cell lines by involving ERK1/2 and transcriptional inhibition of MMP-2. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (2015); 19(3): 1–14.
380. Yi-Chieh L, Tsan-Hwang C, Jung-Shin L, et al. Nobiletin, a citrus flavonoid, suppresses invasion and migration involving FAK/PI3K/Akt and small GTPase signals in human gastric adenocarcinoma AGS cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2011; 347(1–2): 103–115.
381. Khan SI, Zhao J, Khan IA, Walker LA, Dasmahapatra AK. Potential utility of natural products as regulators of breast cancer-associated aromatase promoters. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 21 (9): 91-101.
382. Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther.* 2001; 90(2-3): 157-77.
383. Totta P, Acconcia F, Leone S, Cardillo I, Marino M. Mechanisms of Naringenin-Induced Apoptotic Cascade in Cancer Cells: Involvement of Estrogen Receptor Alpha and Beta Signalling. *IUBMB Life* 2004; 56: 491-9.
384. Mishra P, Kale RK, Kar A. Chemoprevention of mammary tumorigenesis and chemomodulation of the antioxidative enzymes and peroxidative damage in prepubertal Sprague Dawley rats by Biochanin A. *Mol Cell Biochem* 2008; 312(1-2): 1-9.
385. Choi SY, Ko HC, Ko SY, et al. Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol Pharm Bull.* 2007; 30(4) :772-8.
386. Zeybek Ü. Kanser Araştırmaları ve Deneysel Modeller. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi* 2013; 5: 1-12.
387. Russo IH, Russo J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environmental Health Perspectives* 1996; 104(9): 938.
388. Özcan M. Kimyasal Olarak İndüklenmiş Meme Kanseri Modelinde Klorofilin-Cu Kompleksinin Antioksidan Etkinliğinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2015.
389. Hong WK, Sporn MB. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* 1997; 278(5340): 1073-1077.
390. Ip C. Mammary tumorigenesis and chemoprevention studies in carcinogen-treated rats. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 1996; 1(1): 37-47.
391. Gelboin HV. Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol. Rev* 1980; 60: 1107–1166.

392. Chen H-W. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid-phase microextraction and liquid chromatography. *Anal Sci* 2004; 20: 1383-1388.
393. Stewart PA, Coble JB, Vermeulen R, et al. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pac J Trop Biomed* 2015; 5(3): 182-189.
394. Telo S. Meme Kanseri Oluşturulan Ratlarda Isırgan Otunun Antioksidan Enzimler Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D., 2006.
395. RamaKrishna NV, Devanesan PD, Rogan EG, et al. Mechanism of metabolic activation of potent carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Chem. Res. Toxicol* 1992; 5: 220-226.
396. Marston CP, Pereira C, Ferguson J, et al. Effect of a complex environmental mixture from coal tar containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) on the tumor initiation, PAH-DNA binding and metabolic activation of carcinogenic PAH in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 2001; 22(7): 1077-86.
397. Miyata M, Furukawa M, Takahashi K, Gonzalez FJ, Yamazoe Y. Mechanism of 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-Induced Immunotoxicity: Role of Metabolic Activation at the Target Organ. *Jpn J Pharmacol* 2001; 86(3): 302-9.
398. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872-879.
399. Gungor H, İlhan N, Eroksuz H. The effectiveness of cyclooxygenase-2 inhibitors and evaluation of angiogenesis in the model of experimental colorectal cancer. *Biomedicine Pharmacotherapy* 2018; 102: 221-229.
400. Bishayee A, Mandal A, Bhattacharyya P, Bhatia D. Pomegranate exerts chemoprevention of experimentally induced mammary tumorigenesis by suppression of cell proliferation and induction of apoptosis *Nutr Cancer* 2016; 68(1): 120-30.
401. Geran RI, Greenberg NH, MacDonald MM, Schumacher A, Abbott BJ. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemother. Rep* 1972; 3: 61-63.
402. İlhan N. Biyokimyasal Teknikler Ders Notları. 2010.
403. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurements with the Folin Fenol Reagent. *J. Biol. Chem* 1951; 193(1): 265-75.
404. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem* 1979; 95(2): 351-358.
405. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 1988; 34(3): 497-500.
406. Aebi H. Catalase In: Buergmeyer U (eds). *Method of enzymatic analysis*. New York and London Academic Press 1974: 673-677.
407. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.

408. Fairbanks V, Klee GG. Biochemical aspects of hematology. In: Burtis CA, Ashwood ER (eds). Textbook of Clinical Chemistry 2nd edition, Philadelphia: Saunders Press 1994: 2026–2027.
409. Yılmaz M. Metabolik Sendrom Oluşturulmuş Ratların Karaciğer, Yağ Dokusu ve Serumlarında Desnutrin ile Chemerin Ekspresyonlarının Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji A.D., 2015.
410. Cheng JL, Futakuchi M, Ogawa K, et al. Dose response study of conjugated fatty acid derived from safflower oil on mammary and colon carcinogenesis pretreated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett* 2003; 196(2): 161-8.
411. Khanzode SS, Muddeshwar MG, Khanzode SD, Dakhale GN. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different stages of breast cancer. *Free Radic Res* 2004; 38: 81–85.
412. Portakal O, Ozkaya O, Erden IM, et al. Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clin Biochem* 2000; 33: 279-284.
413. Gerber M, Astre C, Segala C, et al. Tumor progression and oxidant-antioxidant status. *Cancer Lett* 1997; 114: 211–214.
414. 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.
415. Dassprakash MV, Arun R, Abraham SK, Premkumar K. In vitro and in vivo evaluation of antioxidant and antigenotoxic potential of Punica granatum leaf extract. *Pharm Biol* 2012; 50(12): 1523-30.
416. Zahin M, Ahmad I, Gupta RC, Aqil F. Punicalagin and Ellagic Acid Demonstrate Antimutagenic Activity and Inhibition of Benzo[a]pyrene Induced DNA Adducts. *Biomed. Res Int* 2014; 2014: 467465.
417. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005; 16(10): 577–586.
418. Guizani N, Waly M I, Singh V, Rahman MS. Nabag (*Zizyphus spina-christi*) extract prevents aberrant crypt foci development in colons of azoxymethane-treated rats by abrogating oxidative stress and inducing apoptosis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14: 5031-5035.
419. Guizani N, Waly MI, Ali A, et al. Papaya epicarp extract protects against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human SHSY5Y neuronal cells. *Exp Biol Med* 2011; 236: 1205-1210.
420. Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys* 2008; 476: 107-112.
421. Seeram NP, Nair MG. Inhibition of lipid peroxidation and structure-activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50 (19): 5308–5312.

422. Sudheesh S, Vijayalakshmi NR. Flavonoids from *Punica granatum*-potential antiperoxidative agents. *Fitoterapia* 2005; 76 (2): 181–186.
423. Aviram M, Dornfeld L, Kaplan M, et al. Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs Under Experimental and Clinical Research* 2002; 28 (2-3): 49-62.
424. Aqil F, Vadhanam MV, Gupta R. Enhanced activity of punicalagin delivered via polymeric implants against benzo[a]pyrene-induced DNA adducts. *Mutat Res* 2012; 743(1-2): 59–66.
425. Patterson LH, Murray GI. Tumour cytochrome P450 and drug activation. *Curr Pharm Des* 2002; 8(15): 1335–1347.
426. Faria A, Monteiro R, Azevedo I, Calhau C. Pomegranate juice effects on cytochrome P450S expression: In vivo studies. *J Med Food* 2007; 10(4): 643–649.
427. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20(7): 933–956.
428. Özüysal S. Tümöral angiogenezis. *Türk Patoloji Dergisi*, 2001; 17: 90-93.
429. Ahmed S, Wang N, Hafeez BB, Cheruvu VK, Haqqi TM. *Punica granatum* L. extract inhibits IL-1 β -induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF- κ B in human chondrocytes in vitro. *J Nutr* 2005; 135(9): 2096-102.
430. Dikmen M, Öztürk N, Öztürk Y. The antioxidant potency of *Punica granatum* L. fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer. *Journal of Medicinal Food* 2011; 14(12): 1638–1646.
431. Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, et al. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(41): 14813–14818.
432. Dai Z, Nair V, Khan M, Ciolino HP. Pomegranate extract inhibits the proliferation and viability of MMTV-Wnt-1 mouse mammary cancer stem cells in vitro. *Oncology Reports* 2010; 24(4): 1087–1091.
433. Karen L. Morley, Peter J, Ferguson, James K. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer Letters* 2007; 251: 168–178.
434. Ye L, Chan FL, Chen S, Leung LK. The citrus flavonone hesperetin inhibits growth of aromatase-expressing MCF-7 tumor in ovariectomized athymic mice. *J Nutr Biochem* 2012; 23(10): 1230-1237.
435. Sakamoto T, Horiguchi H, Oguma E, Kayama F. Effects of diverse dietary phytoestrogens on cell growth, cell cycle and apoptosis in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2010; 21(9): 856–864.
436. Jeune MA, Kumi-Diaka J, Brown J. Anticancer activities of pomegranate extracts and genistein in human breast cancer cells. *J Med Food* 2005; 8(4): 469-75.

8. ÖZGEÇMİŞ

23.06.1987 yılında Almanya’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ’da tamamladım. 2012 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesinden dereceyle mezun oldum. Aynı yıl Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında ÖYP araştırma görevlisi olarak göreve başladım. 2013 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında doktora eğitimime başladım ve halen devam etmekteyim. Uluslararası indeksli dergilerde makalelerim, ulusal ve uluslararası olarak düzenlenen kongre ve konferanslarda sözlü bildiri ve posterlerim bulunmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıyım.