



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ROSMARİNİK ASİT TÜREVLERİNİN
ÜÇLÜ-NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRE
HATTI ÜZERİNDEKİ ANTI-KANSER
ETKİSİNİN HÜCRESEL YOLAKLARIN
İNCELENMESİ ARACILIĞIYLA
BELİRLENMESİ**

GÜLİZAR HOCAOĞLU

**TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ GAMZE YEŞİLAY**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
AĞUSTOS/2023**

İTHAF

“Tezimi, meme kanserinden dolayı yaşamını yitiren tüm kadınlara ithaf ediyorum.”

TEŞEKKÜR

Öncelikle, tez çalışmam boyunca beni her daim sevgi dolu desteği ve inancı ile güçlendiren kıymetli annem Gülminaz HOCAOĞLU, hayatımın her alanında arkamda duran babam Muhlis HOCAOĞLU, her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ablalarım Aysun HOCAOĞLU ve Filiz KAHVECİ'ye, abim Erol HOCAOĞLU'na teşekkürlerimi sunmak istiyorum. Her zaman verdiği öğütler ile bizi yetiştiren, torunlarına karşı sonsuz desteği olan ve her türlü desteğiyle cesaretlendiren canım anneannem (merhum) İpek HELVACI'ya teşekkür ederim.

Bu yolculuk boyunca kendisiyle tanışma fırsatı bulduğum değerli Dr. Öğr. Üyesi Gamze YEŞİLAY'a minnettarlığımı sunmak isterim. Yoğun ve zorlu deney sürecinde gösterdiği sabır ve sorunlara çözüm arayışıyla bize örnek oldu. En basit konularda bile neden ve nasıl sorularını hatırlatarak, zihinsel sınırlarımızı zorlayarak gelişimimize önemli katkılar sağladı. Derslerde verdiğiniz örnekler, "side hiçbir zaman size değildir, stroma, absorpsiyon, kaderin, IgG boyutu, lab defteri, Feynmann, EPR effect" gibi birçok kavramı eğlenceli bir şekilde hafızamda derin yerlerine işledi. Sorular sorduğumda hemen cevabını vermek yerine bize düşünmeyi öğreterek, "ben buldum bir de sen araştırdı bul bakalım" diyerek karşılaştığımız tüm zorluklara karşı bizi yetiştirdiniz. İşimiz vaktimizden çok sözünü duyar gibiyim. Akademi dışında bile her konuda sizden gördüğüm örnekleri hayatımın birçok yerine yerleştirdim. Ayrıca heyecan verici bir TÜSEB projesine dahil olma fırsatı verdiğiniz için çok mutluyum. Başlangıçta bizi nanoteknoloji ve Raman ile tanıştırdığınız, aşağıda daha çok yerin olduğunu öğrenmemizi sağladı. Bu sürecin başında hissettiğim tedirginlik duygusu şimdi yerine deneyim ve özgüvene bıraktı. Sizin gibi bir supervisor'un öğrencisi olduğum için kendimi çok şanslı hissediyorum. Verdiğiniz tüm emek ve harcadığınız zaman için size çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca eşsiz bilginiz ve her daim yardımseverliğinizle beni destekleyen eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Büşra BOLAT'a içten teşekkürlerimi sunmak istiyorum. Sizin deneyiminiz ve uzmanlığınız, tezimin gelişiminde ve ilerlememde önemli bir rol oynadı.

Bu projenin ilk aşamasında birlikte çalışma şansına sahip olduğum ve eşsiz kimya bilgisiyle süreci kolaylaştıran, her zaman bize destek sağladığınızı hissettiğim değerli Doç. Dr. Arif MERMER'e içten teşekkürlerimi sunmak istiyorum.

Ders dönemi boyunca gerek bilgi ve birikimiyle gerek bize sunduğunuz destekleriniz için Doç. Dr. Esra Güzel TANOĞLU'na teşekkürlerimi sunmak isterim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bu yola beraber başladığımız, gece geç saatlere kadar birlikte deney yaptığımız, yardımlarıyla her zaman yanımda olan ve aynı zamanda bir o kadar da kendisiyle didiştığım Zehra Betül AYDIN'a, Selenyum ile macerasını hiç unutmayacağım ve çıkmayan deney sonuçlarında bile gerek olumlu tavırlarıyla "yaparız biz" diyerek gerek koridor boyunca kahkahası ile hepimize neşe getiren Ebral AKGÜN'e, ofisteki masamın üzerine devamlı tatlı bir şeyler bırakan ve deney sürecimde bana yardımcı olan koca yürekli Züleyha DEMİRCİ'ye, çılgin soruları ile bizi güldüren aynı zamanda "evet ya olabilir aslında" diyerek düşündüren, yanına gittiğim zaman konuşmalarıyla motive eden Zeynep KILINÇ'a, içinden çıkılmaz olayları bile en eğlenceli hale getirebilen bazen benim deneylerim yüzünden benimle birlikte geç saatlere kadar duran Şuranur AYVAZ'a ve her zaman bıkmadan usanmadan en zor işlerimde bile bana yardımcı olarak bu süreçte hayatımı kolaylaştıran diğer arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Çalışmam süresince her türlü imkân ve olanakları sağlayan Sağlık Bilimleri Üniversitesi Validebağ Deneysel Tıp ve Uygulama Araştırma Parkı'na teşekkür ederim. Bu tez çalışması Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB 2022-12048 numaralı) projesi tarafından desteklenmiştir. TÜSEB'in proje kapsamında gerçekleştirilmesinde sağladığı maddi katkılar için teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. KANSER	2
2.1.1. Meme Kanseri.....	2
2.1.1.1 Meme kanseri epidemiyolojisi:.....	2
2.1.1.2. Meme kanserinin prognoz ve tedavisi:	3
2.1.1.3. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması:	4
2.2. ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ	7
2.2.1. ÜNМК Mekanizması.....	7
2.2.1.1. ÜNМК hücre hattında görülen değişiklikler:	7
2.2.1.2. Epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMT):	8
2.2.1.3. EMT belirteçleri:	8
2.2.1.4. EMT transkripsiyon faktörleri:	9
2.2.2. ÜNМК Hücre hattında İnvazyon ve Metastaz	9
2.2.3. ÜNМК Anjiyogenez Mekanizması	11
2.2.4. ÜNМК Hücre Hattında Ölüm Mekanizmaları	12
2.2.4.1. ÜNМК hücre hattında apoptoz mekanizması:	12
2.2.4.2. ÜNМК hücre hattında apoptoza direnç mekanizmaları:	13
2.2.4.3. ÜNМК hücre hattında nekroz mekanizması:	14
2.2.4.4. ÜNМК hücre hattında otofaji mekanizması:	15
2.2.5. ÜNМК ve Hücre Döngüsü İlişkisi	15

2.3. DOĞAL BİLEŞİKLERİN ANTI-KANSER ÖZELLİKLERİ.....	16
2.3.1. ÜNMK Üzerinde Doğal Bileşiklerin Temel Moleküler Hedefleri	16
2.3.2. Anti-Kanser Özellikli Doğal Bileşikler	17
2.3.3. Rosmarinik Asit	17
2.3.4. RA'nın ÜNMK Üzerindeki Anti-Kanser Etkileri.....	19
2.3.4.1. RA ile yapılan çalışmalar:	20
2.3.4.2. RA türevli ilaçlarla yapılan çalışmalar:	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	22
3.2. SARF MALZEMELER VE KULLANILAN CİHAZLAR.....	23
3.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ	25
3.3.1. Hücre Çözdürme	26
3.3.2. Hücre Besiyeri Değişimi ve Pasajlama.....	26
3.3.3. Hücre Dondurma	27
3.3.4. Hücre Sayımı	27
3.4. HÜCRE ÇOĞALMASI ANALİZİ	27
3.5. KOLONİ OLUŞTURMA	28
3.6. ÇİZİK YARA İYİLEŞME DENEYİ.....	28
3.7. HÜCRE GÖÇÜ VE İSTİLASI DENEYİ	28
3.8. HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZİ	29
3.9. APOPTOZ/NEKROZ ANALİZİ	29
3.10. FLORESAN MİKROSKOPU İLE HÜCRE ALIMI ANALİZİ.....	30
3.11. KANTİTATİF GEN ANLATIM ANALİZİ	30
3.11.1. Total RNA İzolasyonu.....	30
3.11.2. RNA Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi.....	31
3.11.3. RNA Örneklerinden cDNA Sentezi.....	31
3.11.4. Gerçek Zamanlı PCR.....	31
4. BULGULAR.....	33
4.1. HÜCRE CANLILIK DENEYİ SONUÇLARI	33
4.2. MDA-MB-231 HÜCRE HATTINDA KOLONİ OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ .	42
4.3. MDA-MB-231 HÜCRE HATTINDA YARA İYİLEŞMESİNE ETKİSİ	43
4.4 MDA-MB-231 HÜCRE HATTINDA MİGRASYON YETENEKLERİ	45
4.5 MDA-MB-231 HÜCRE HATTINDA HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE ETKİSİ	46
4.6 MDA-MB-231 HÜCRE HATTINDA HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNE ETKİSİ	47
4.7 FLORESAN MİKROSKOPU İLE HÜCRE İÇİNE ALIM SONUÇLARI	48
4.8. MDA-MB-231 HÜCRE HATTINDA APOPTOTİK GENLERDEKİ ETKİSİ.....	48

5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR	55



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Meme kanserinin moleküler alt tiplerinin sınıflandırılması	5
Tablo 3.1: Kullanılan kimyasalların listesi	22
Tablo 3.2: Kullanılan sarf malzemelerin listesi	23
Tablo 3.3: Kullanılan cihazların listesi	24
Tablo 4.1: MCF-10A ve MDA-MB-231 hücre hattında IC ₅₀ ve terapötik endeksleri.....	42



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Primer tümörün izlediği invazyon ve metastaz adımları (54).....	11
Şekil 2.2: Apoptoz mekanizması (61)	14
Şekil 2.3: Çeşitli kanser türlerinde RA'nın moleküler hedefleri (95).....	19
Şekil 2.4: RA ve esterlerin hücre içine alımı (109).....	21
Şekil 4.1: MDA-MB-231 hücre hattında RA'nın hücre canlılığına etkisi	33
Şekil 4.2: MDA-MB-231 hücre hattında RAME'nin hücre canlılığına etkisi	34
Şekil 4.3: MDA-MB-231 hücre hattında RAEE'nin hücre canlılığına etkisi.....	35
Şekil 4.4: MDA-MB-231 hücre hattında RAPE'nin hücre canlılığına etkisi.....	35
Şekil 4.5: MDA-MB-231 hücre hattında RABE'nin hücre canlılığına etkisi	36
Şekil 4.6: MCF-10A hücre hattında RA'nın hücre canlılığına etkisi.....	37
Şekil 4.7: MCF-10A hücre hattında RAME'nin hücre canlılığına etkisi	37
Şekil 4.8: MCF-10A hücre hattında RAEE'nin hücre canlılığına etkisi	38
Şekil 4.9: MCF-10A hücre hattında RAPE'nin hücre canlılığına etkisi	39
Şekil 4.10: MCF-10A hücre hattında RABE'nin hücre canlılığına etkisi.....	39
Şekil 4.11: MDA-MB-231 hücre hattında RA ve esterlerin IC ₅₀ değerleri.....	40
Şekil 4.12: MCF-10A hücre hattında RA ve esterleri IC ₅₀ değerleri	41
Şekil 4.13: Kolonilerin mikroskop görüntüleri.....	43
Şekil 4.14: MDA-MB-231 hücrelerin yara kapanma görüntüleri (A) ve grafiği (B).....	44
Şekil 4.15: Hücrelerin görüntüleri (A) ve toplam hücre sayısı grafiği (B)	45
Şekil 4.16: MDA-MB-231 hücre hattında hücre döngüsü şekil (A) ve grafikleri (B)	46
Şekil 4.17: Hücre hattın apoptoz deney görüntüleri (A) ve grafikleri (B)	47
Şekil 4.18: MDA-MB-231 hücre hattının floresan mikroskopundaki görüntüleri.....	48
Şekil 4.19: MDA-MB-231 hücre hattında BCL-2 (A) ve Kaspaz 3 (B) gen anlatımı	49
Şekil 4.20: MDA-MB-231 hücre hattında N-kaderin (A) ve Slug (B) gen anlatımı.....	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

BCL-2	: B Hücreli Lenfoma 2
BRCA1	: Meme Kanseri A1 Geni
BRCA2	: Meme Kanseri A2 Geni
°C	: Derece
CDNA	: Tamamlayıcı DNA
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ECM	: Hücre Dışı Matriks
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
ER	: Östrojen Reseptörü
FBS	: Fetal Sığır Serum
FITC	: Floresan İzotiyosiyanat
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2
HSA	: Hidroksisinamik Asit
IC₅₀	: Maksimum inhibisyon konsantrasyonu
MMP2	: Matris Metalloproteinaz-2
MMP9	: Matris Metalloproteinaz-9
PARP1	: Poli (ADP-riboz) polimeraz 1
PBS	: Fosfat Tuz Tamponu
PI	: Propidyum İyodür
PR	: Progesteron Reseptörü
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

qRT-PZT	: Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RA	: Rosmarinik Asit
RABE	: Rosmarinik Asit Bütil Ester
RAEE	: Rosmarinik Asit Etil Ester
RAME	: Rosmarinik Asit Metil Ester
RAPE	: Rosmarinik Asit Propil Ester
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Dakikadaki Dönüş Sayısı
ÜNMK	: Üçlü Negatif Meme Kanseri
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa

ROSMARİNİK ASİT TÜREVLERİNİN ÜÇLÜ-NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ ANTI-KANSER ETKİSİNİN HÜCRESEL YOLAKLARIN İNCELENMESİ ARACILIĞIYLA BELİRLENMESİ

ÖZET

Amaç: Tez çalışmasının amacı Rosmarinik asit (RA) türevlerinin anti-kanser özelliklerinin üçlü-negatif meme kanserine (ÜNMK) karşı yolaklar üzerindeki etkisinin belirlenmesidir.

Gereç ve Yöntem: ÜNMK hücre hattı olan MDA-MB-231 ve normal meme epitel hücre hattı olan MCF-10A kullanılarak RA'nın metil (RAME), etil (RAEE), propil (RAPE), bütil (RABE) esterleriyle hücre canlılık testi ve terapötik endeks değerleri belirlendi. RA, RAME ve RAEE esterlerinin hücre göçü ve invazyon üzerindeki etkisi, koloni oluşturma yetenekleri incelendi. Hücre döngüsünün tutuklanması, hücre apoptoz ve nekroz oranları akış sitometri ile incelendi. RA ve türevlerinin EMT ve apoptoz yolaklarındaki gen anlatım düzeylerine etkisi gerçek zamanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile araştırıldı.

Bulgular: RA, RAME, RAEE, RAPE ve RABE esterlerinin hücre canlılık oranını azalttığı, RAME ve RAEE'nin terapötik endeksleri yüksek olan iki aday olduğu bulunmuştur. RA, RAME ve RAEE ile devam edilen deneylerde, maddelerin koloni oluşumunu engellediği, yara iyileşmesini geciktirdiği, hücre göçünü azalttığı, hücre döngüsünü etkileyerek G₂/M fazında tutuklama yaptığı ve apoptozu tetiklediği tespit edilmiştir. EMT yolağı incelendiğinde N-kaderin ve Slug genlerinde anlatımı azaldı. Apoptoz yolağında BCL-2 geni azalırken Kaspaz 3 gen anlatım seviyesinde artış görüldü.

Sonuç: Sonuç olarak RA sahip olduğu anti-oksidan özelliği ve türevlerinin hücre içine alımı kolaylaştırması ile ÜNMK hücre hattında apoptozu tetikleyici yönde gen ifadelerini değiştirdiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Anti-Kanser Etki, Rosmarinik Asit, Terapötik Endeks, Üçlü Negatif Meme Kanseri

DETERMINING THE ANTI-CANCER EFFECT OF ROSMARINIC ACID DERIVATIVES ON TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER CELL LINE THROUGH CELLULAR PATHWAYS

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to determine the effect of anti-cancer properties of rosmarinic acid (RA) derivatives on pathways against triple-negative breast cancer (ÜNMK).

Materials and Methods: Cell viability test was carried out with methyl (RAME), ethyl (RAEE), propyl (RAPE), butyl (RABE) esters of RA using the ÜNMK cell line MDA-MB-231 and the normal breast epithelial cell line MCF-10A. Therapeutic index values were determined. The effects of RA, RAME and RAEE esters on cell migration and invasion, and their colony forming abilities were investigated. Cell cycle arrest, cell apoptosis and necrosis rates were examined by using flow cytometry. The effects of RA and its derivatives on gene expression levels in EMT and apoptosis pathways were investigated by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR).

Results: RA, RAME, RAEE, RAPE, and RABE esters have been identified as candidates that decrease cell viability, with RAME and RAEE showing high therapeutic indices. Continued experiments with RA, RAME, and RAEE revealed that these substances inhibit colony formation, delay wound healing, reduce cell migration, induce cell cycle arrest at the G₂/M phase, and trigger apoptosis. Examination of the EMT pathway demonstrated decreased expression of N-cadherin and Slug genes. In the apoptosis pathway, the expression of the BCL-2 gene was reduced, while an increase in the expression level of Caspase 3 gene was observed.

Conclusion: It was found that RA changed gene expressions in the direction of triggering apoptosis in ÜNMK cells with its anti-oxidant properties and facilitating the uptake of its derivatives into the cell.

Key Words: Anti-Cancer Effect, Rosmarinic Acid, Therapeutic Index, Triple Negative Breast Cancer

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, Türkiye’de 2020 yılında yapılan bir araştırma sonucu ortaya çıkan veriye göre en sık görülen ilk 5 kanser grubu içerisinde yer almıştır. Üçlü-negatif meme kanseri (ÜNMK), östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme reseptörü-2 (HER2/neu) eksikliği sonucu ortaya çıkan heterojen yapıya sahip bir meme kanseri alt grubudur. ÜNMK’nin klinikte yüksek başarıya sahip bir tedavisi bulunmamasıyla birlikte mevcut olarak kullanılan tek tedavi seçeneği kemoterapidir. Hastalar üzerinde kemoterapinin meydana getirdiği yan etkilerin azaltılmasına yönelik bitkisel kaynaklı bileşenler üzerinde çalışmalar yapıldı. Rosmarinik asit (RA), biberiye (*Rosmarinus officinalis*) özündeki güçlü polifenolik bileşiklerden biridir. RA’nın sahip olduğu anti-oksidan özelliği ile ÜNMK hücre hattında apoptozu tetikleyici yönde gen ifadelerini değiştirdiği bulunmuştur.

Tez çalışmasının amacı, 12048 no’lu TÜSEB projesi kapsamında sentezlenen özgün RA ester türevlerinin arasında terapötik endeksi en yüksek olan iki RA türevinin apoptoz ve epitelyal-mezenkimal geçiş yolaklarına etkisini aydınlatmaktır. Bu amaçla, sentezlenen özgün RA türevlerinin terapötik endeksini belirledikten sonra terapötik etkisi yüksek olan iki RA türevinin MDA-MB-231 ÜNMK hücre hattında apoptoz oranını ne ölçüde etkilediği, göç ve istila kabiliyetini hangi oranda azalttığı, gen anlatım seviyelerinde nasıl değişikliğe yol açtığını inceleyerek etki mekanizması hakkında fikir edinilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

Kanser, kendi içerisinde bir dizi moleküler süreci içeren, hücrelerin kontrolsüz büyüme, farklılaşma ve yayılma gösterdiği bir hastalık türüdür. İnsanlarda kanserin ilk kanıtları milattan önceki zamanlarda bulunmuştur. M.Ö. 460-370 yılları arasında yaşamış olan Yunan tıp doktoru Hipokrat, ilk kez kanserli dokularda çevre dokuya invaziv olan habis tümör ve invaziv olmayan yani diğer ismiyle iyi huylu tümör kavramını ve arasındaki farklılıkları ortaya koymuştur. Mikroskopun gelişimiyle beraber 17. ve 18. yüzyıllarda kan ve lenf sisteminin daha iyi anlaşılabilmesi ile kanser hücre hattının araştırılmasının önü açılmıştır (1,2).

Kanser hücresinin normal hücrelerden ayıran temel özellikler, Hanahan ve Weinberg tarafından her kanser türünde ortak görülen on farklı başlık altında toplanmıştır (3,4). “Kanserin ayırt edici özellikleri” olarak adlandırılan bu özellikler; büyüme faktörlerine ihtiyaç duymadan büyüebilme, sınırsız bölünme potansiyeline sahip olma ve ölümsüzlük, apoptotik sinyallerden kaçınma, büyümeyi baskılayan sinyallerden kaçış, anjiyogenez, invazyon ve metastaz yeteneği, bağışıklık sisteminden kaçma, kanserleşmeyi destekleyen inflamasyon, genetik mutasyonlar ve enerji metabolizmasını değiştirmedir.

2.1.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, meme hücrelerinin normalden farklı bir şekilde büyüyüp çoğalması sonucu meydana gelen ciddi bir kanser türüdür. Bu hastalık genellikle kadınlarda görülür. Meme kanserinin belirtileri arasında memede dokunulduğunda fark edilen sertlik veya yumru, meme cildindeki değişiklikler, meme başından gelen akıntı ve ciltte kızarıklık gibi işaretler yer alır.

2.1.1.1 Meme kanseri epidemiyolojisi: Globocan 2020 verilerine göre; dünya genelinde her iki cinsiyette ve her yaşta yeni vaka sayısı en başta meme kanseri, ardından akciğer, kolorektal ve prostat kanseri olarak açıklanmıştır (5). Ölüm oranlarına bakıldığında ise ilk sırada akciğer kanseri daha sonra kolorektal, karaciğer, mide ve meme

kanseri Globocan 2020 verilerine göre; Türkiye’de her iki cinsiyette ve her yaşta yeni vaka sayısı en başta akciğer kanseri ardından meme, kolorektal, prostat ve tiroid kanserinde ortaya çıkmıştır (6). Meme kanseri, dünya çapında kadınlarda görülen kansere bağlı ölümlerin başında yer alır (7).

Meme dokusu, süt üreten kısım olan lobüller ve sütü meme başına ileten kanallar olan duktuslar, destek dokusu olarak yağ dokusu ile fibröz dokulardan oluşmaktadır. Bazı kanser türleri başlangıçta semptomlara neden olmayabilir. Bu durum, kanser hücrelerinin henüz yayılmamış veya büyümemiş olduğunu gösterir. Kanser genellikle erken evrelerindeyken, semptomlar belirginleşmeye başlar ve hastalık ilerledikçe daha belirgin hale gelir. Bu nedenle, kanser başlangıcında semptomlara neden olmadığı ve daha az metastaz yeteneğine sahip olduğundan lobül veya duktuslar ile sınırlı alanı kapsamaktadır (9).

Meme kanseri risk faktörlerinin en başında ilerleyen yaş gelmektedir. Bunun yanı sıra obezite, alkol kullanımı, tütün kullanımı, radyasyona maruziyet, menopoz ve hormonlar gibi faktörler meme kanseri oluşumunu tetiklemektedir. Genetik faktörler olarak ailede meme kanserli bireylerin olması risk düzeyini artırmaktadır. Fakat ailede meme kanseri öyküsü olmaması durumunda da risk ortadan kalkmamaktadır. *BRCA1*, *BRCA2* VE *PALB-2* gibi bazı kalıtsal gen mutasyonları da meme kanseri riskini büyük ölçüde artırmaktadır (8).

2.1.1.2. Meme kanserinin prognoz ve tedavisi: Meme kanseri tedavisi, hastalığın evresine, türüne ve hastanın genel sağlık durumuna göre değişiklik gösterir. Tedavi seçenekleri arasında cerrahi işlem, radyoterapi, kemoterapi, hormonal terapi ve hedefe yönelik tedaviler yer almaktadır (9). Mevcut tedavi seçenekleri arasında, hastanın yaşına, hastalığın evresine, kanserin türüne ve hastanın genel sağlık durumuna göre uygun tedavi seçimi belirlenir (9). Örneğin, neoadjuvan kemoterapi kullanımında, hastanın yaşı ve hastalığın evresi önem arz etmektedir (10). Hormonal tedavi, östrojen hormonunun meme kanseri hücrelerinin büyümesini teşvik ettiği durumlarda kullanılır. Hormon reseptörü pozitif metastatik meme kanserinde ve HER2-pozitif tümörlere yönelik yeni tedavi ajanları geliştirilmiştir (11). Hedefe yönelik tedavilerin içinde immünoterapi son yıllarda oldukça yaygın bir tedavi stratejisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Hedefe yönelik tedaviler, kanser hücreleri büyümesini hedefleyen özel ilaçlar kullanılır (9).

Bifosfat tedavisi, kanserin kemiklere yayılması durumunda kullanılan bir tedavi yöntemidir (12). Bifosfatlar, kemikteki kanser hücre hattının büyümesini kontrol altına alır ve kemik yıkımını azaltır. Bu nedenle, bifosfat tedavisi, hedefe yönelik bir tedavi olarak kabul edilir ve kanserin kemiklere yayılmasını kontrol etmek amacıyla kullanılır. Bisfosfonat tedavisinin iskelet sistemi komplikasyonlarını azalttığı gösterilmiştir.

2.1.1.3. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması: Meme kanseri moleküler sınıflandırması, tümörün biyolojik özelliklerine göre yapılan bir sınıflandırmadır. Bu sınıflandırma, tümörün prognozunu ve tedavi seçeneklerini belirlemede rol oynamaktadır. Meme kanseri moleküler alt tipleri, immünohistokimyasal (IHC) belirteçlerle yapılan reseptör analizine ve Ki67 düzeyine göre ayrılmaktadır. Bahsedilen reseptörler temel olarak ER, PR ve HER2 reseptörüdür. Bu üç biyobelirteç arasındaki ilişki, meme kanserinin sınıflandırılmasında kullanılır. Örneğin, HER2 pozitif meme kanseri, ER ve PR negatif olabilir veya pozitif olabilir. Bu nedenle, bir hastanın meme kanseri biyobelirteçlerinin belirlenmesi, tedavi planı ve prognoz tahmini için önemlidir (13).

Epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) bir alt tipi olan HER2 reseptörü, normalde hücre hattın büyümesini ve bölünmesini düzenleyen sinyalleri alır. Ancak, HER2 geni aşırı aktif hale geldiğinde, meme kanseri hücre hattı aşırı büyüme ve bölünme eğilimi gösterir. HER2 pozitif meme kanseri olarak adlandırılan bu tür, diğer meme kanseri türlerinden farklı bir tedavi yaklaşımı gerektirmektedir (14).

ER ve PR hormon reseptörleri ise, meme kanseri hücre hattının hormonlara nasıl yanıt verdiğini belirleyen reseptörlerdir. ER pozitif meme kanseri, östrojen hormonunun büyüme teşvik ettiği hücrelerde oluşurken, PR pozitif meme kanseri, progesteron hormonunun büyüme teşvik ettiği hücrelerde oluşur. Hormon reseptörü pozitif meme kanseri tedavisi, hormon terapiyi veya blokajı ile yapılır (15). ER veya PR reseptörlerinin mevcut olmadığı durumlarda, meme kanser hücreleri östrojen ve progesteron gibi hormonların etkisinden bağımsız bir şekilde büyüme eğilimi gösterir. Bu durum, tedavi seçeneklerini etkileyerek daha özel ve özelleştirilmiş yaklaşımlar gerektirir.

ER yokluğunda meme kanseri hücre hattı hormon etkisine yanıt vermez ve östrojenin büyüme teşvik ettiği hücreler de dâhil olmak üzere herhangi bir hücre tipinde gelişebilir. Bu nedenle, ER negatif meme kanserinin tedavisi, östrojen hormonunun etkisini bloke eden hormonal terapiyi içermez (16). PR yokluğunda da hücreler hormon

etkilerine yanıt vermediğinden ER negatife benzer şekilde tedavi edilir. Ancak PR negatifliği, progesteron hormonunun östrojen hormonunun etkisini bloke ettiği durumlarda progesteron reseptörü pozitifliği ile birleştirilirse, hastalığın prognozunun kötü duruma ilerlediği gösterilmiştir (17,18).

Tablo 2.1’de bahsedilen reseptörlerin varlığına göre, meme kanseri Luminal A, Luminal B, HER2-pozitif ve üçlü negatif olarak alt tiplere ayrılır. Luminal A ve Luminal B alt tipleri, ER ve PR pozitif olan tümörleri içerir. HER2-pozitif alt tip, HER2 proteininin aşırı ifadesi olan tümörleri içerir. Üçlü negatif alt tip, ER, PR ve HER2 negatif olan tümörleri içerir.

Tablo 2.1: Meme kanserinin moleküler alt tiplerinin sınıflandırılması

	İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2)	Östrojen reseptörü (ER)	Progesteron reseptörü (PR)
Luminal A	-	+	+
Luminal B	+	+	+
HER2 pozitif	+	-	-
Üçlü negatif	-	-	-

Meme kanseri moleküler alt tipleri, tümörün biyolojik özelliklerine göre tedavi seçeneklerine yol gösterir (19). Luminal A alt tipi, meme kanseri hastalarında en sık görülen tümör çeşididir. Bu tümörler düşük derecede mitotik aktiviteye ve iyi bir prognoza sahiptir. ER ve PR pozitif olan tümörleri içermektedir. Diğer alt tiplere göre düşük hücre çoğalması oranına ve daha az nüks etme yeteneğine sahiptir. Düşük *HER2* ve *Ki67* (proliferatif hücre nükleer antijeni) gen seviyeleri ile tanımlanmaktadır (20,21).

Luminal A tümörlerinde gen anlatım profili, diğer meme kanseri alt tiplerine göre daha düşük hücre çoğalması oranları ile bilinmektedir. Bu tümörlerin prognozu, diğer alt tiplere göre daha iyidir ve hormon tedavisi ile tedavi edilmektedir (22). Luminal B, ER pozitif ve/veya PR pozitif olan tümörlerin yaklaşık %20-30'unu oluşturur. Luminal B tümörleri, Luminal A tümörlerine kıyasla daha agresiftir ve daha yüksek hücre çoğalması oranlarına sahiptir (23). Luminal B tümörlerinde genellikle HER2 aşırı anlatımı veya kopya sayısı artışı da görülür. Bu, tümörün daha agresif olmasına ve daha kötü bir

prognoza sahip olmasına neden olabilir (24). Luminal B tümörlerindeki gen anlatım profili, daha yüksek hücre çoğalması ve daha düşük hormon reseptörü anlatımı ile ilişkilidir.

Luminal B tümörleri, kemoterapi ve hormonal tedavilerle tedavi edilirler ve tedaviye yanıt oranları, Luminal A tümörlerine göre daha düşüktür. Ancak, HER2 pozitif tümörlerden daha iyi bir prognoza sahiptirler (25). HER2/neu, meme kanserinde de sıklıkla görülen bir proteindir. HER2/neu, hücre büyümesi ve bölünmesi sırasında hücre yüzeyindeki sinyal iletiminde rol alan bir protein olan EGFR'nin bir alt tipidir. Fakat bazı kanser türlerinde HER2 geni aşırı aktif hale gelir ve bu HER2/neu proteininin çok fazla miktarda üretilmesine neden olur. HER2/neu proteininin sayısı arttığı için kanser hücre hattının daha hızlı büyümesine ve bölünmesine yol açar. Bu da kanser hücre hattının daha invaziv ve agresif hale gelmesine neden olmaktadır (14).

Günümüzde, meme kanseri tümörlerinin yaklaşık %20-25'inde artmış HER2/neu aktivitesi tespit edilmektedir. HER2 pozitif meme kanseri, normalden daha fazla HER2 proteinini üreten hücrelerden oluşur. HER2 pozitif meme kanseri tedavisinde hedeflenmiş tedaviler, örneğin *trastuzumab* gibi ilaçlar, kullanılmaktadır. *Trastuzumab*, HER2 pozitif meme kanseri hücre hattındaki HER2 proteinine bağlanarak kanser hücre hattının büyümesini ve yayılmasını engeller. Bu hedeflenmiş tedavi sayesinde, HER2 pozitif meme kanseri tedavisi başarı oranı artmaktadır (25,26).

Üçlü negatif meme kanseri ve bazal tip meme kanseri arasında bazı farklılıklar vardır, ancak bazı durumlarda bu terimler benzer şekilde kullanılmaktadır. Genel olarak ÜNМК, bazal benzeri fenotipe sahiptir ve bazal belirteçlerini ifade eden tümörlerin çoğunluğu üçlü negatif kanserlerdir. Ancak, bazal benzeri kanserlerin tamamı ER, PR ve HER2'den yoksun değildir ve aynı şekilde, ÜNМК'ların tamamı bazal benzeri bir fenotip göstermez. Yani, bazal benzeri fenotip ve üçlü negatif fenotip birbiriyle tam olarak uyuşmamaktadır (27).

Bazal benzeri meme kanserinde, ER, PR ve HER2 gibi yaygın olarak kullanılan biyobelirteçlerinin anlatımı olmadığından, hormon ve HER2 hedefli tedaviler bu tümörlerde etkili olmaz. Diğer meme kanseri alt tiplerine göre daha agresif olma eğilimindedir. ÜNМК hücre hattı, normal meme hücrelerine benzer şekilde bazal epitel hücre hattı özellikleri gösterirler (28,29). ÜNМК, diğer meme kanseri alt tiplerine göre daha agresif ve daha hızlı yayılsa da tedaviye daha iyi yanıt verebilirler ve erken evrede

yakalanırlarsa tedavisi mümkündür. ÜNМК için özel tedavi stratejileri geliştirilmektedir (30,31).

2.2. ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ

Üçlü negatif meme kanseri, meme dokularında gelişen bir tür kanserdir ve diğer meme kanseri türlerine göre farklı bir özellik taşır.

2.2.1. ÜNМК Mekanizması

Üçlü negatif meme kanserinin , hormon reseptörü negatif olması, ÜNМК ile diğer meme kanseri türleri arasında farklı bir ilişki kurulmasına neden olur (32). Hormon reseptörü pozitif meme kanseri, hormonlar tarafından uyarılan büyümeye yanıt verirken, ÜNМК hormonlara tepki vermez ve kanserin büyüüp yayılması için çeşitli faktörler tarafından uyarılır. Bu faktörler arasında genetik mutasyonlar, büyüme faktörleri (EGFR), tümör mikro çevresi ve immün yanıt etkilidir (33). ÜNМК tedavisi, kemoterapi ve cerrahi müdahale gibi seçeneklere sahiptir. Yapılan çalışmalar sonucunda, ÜNМК'nin oluşum mekanizmalarının genetik ve epigenetik değişikliklerle ilişkili olduğunu ve sinyal iletimindeki anormalliklerin kanser gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir (30). Ayrıca, ÜNМК'nin immün sistemle ilgili olabileceği düşünülse de kesin mekanizmalarının tam olarak anlaşılması için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (32,34). ÜNМК tedavisi, kemoterapi, immünoterapi ve hedefe yönelik tedaviler gibi diğer yaklaşımları içerebilir (35).

2.2.1.1. ÜNМК hücre hattında görülen değişiklikler: ÜNМК hücre hattında ER, PR ve HER2 reseptörün eksikliği, bu kanser türünün diğer meme kanseri türlerinden farklı özellikler göstermesine neden olmaktadır (36). ÜNМК'de hücreler, diğer meme kanseri türlerine göre daha yüksek hücre çoğalmasına sahiptir. Bu, hücre bölünmesinin artması ve kanserin daha hızlı ilerlemesi anlamına gelmektedir (37). DNA tamir mekanizmalarındaki bazı değişiklikler nedeniyle daha yüksek bir genomik instabilite oluşmaktadır. Bu da kanser hücre hattının daha kolay mutasyona uğramasına ve tedaviye karşı daha dirençli hale gelmesine neden olmaktadır (38). ÜNМК ile hücre içi sinyal yolları arasında birçok ilişki bulunmaktadır. Örneğin: ÜNМК'de sıklıkla görülen p53 mutasyonları, PI3K/Akt sinyal yolunu aktive ederek tümör hücre hattının çoğalmasına ve hayatta kalmasına yardımcı olur (39).

ÜNМК hücre hattında, EGFR sinyal yolunun aşırı aktivasyonu tespit edilmiştir. Bu yolak, MAPK/Erk ve PI3K/Akt sinyal yolları ile ilişkilidir ve tümör hücre hattının çoğalması, göçü ve invazyonu gibi özellikleri artırır (40). ÜNМК'nin bir alt tipi olan ve androjen reseptörü pozitif olan tümörlerde, androjen sinyal yolunun aktivasyonu, tümör büyümesini inhibe eden p27 proteini seviyelerini artırır ve tümör hücre hattının apoptoza uğramasına neden olur (41).

2.2.1.2. Epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMT): Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), epitel hücre hattının morfolojik ve moleküler değişimleri sonucu mezenkimal fenotipe dönüşmesidir. Kanserin ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. İnvazyon ve metastaz sırasında, kanser hücre hattı EMT yoluyla invaziv mezenkimal fenotipe dönüşür ve böylece normal doku engellerini aşarak yayılım gösterirler. EMT sırasında hücre hattın biyolojik davranışları çok yönlüdür ve pek çok moleküler mekanizma bu sürece katkıda bulunur. Bu mekanizmalar arasında, EMT sinyal yollarının inhibe edilmesi, sitokin ve büyüme faktörlerinin etkileşimi, miRNA'ların düzenlenmesi ve hücre dışı matris bileşenlerinde değişiklikleri yer alır. EMT, kanser ilerlemesinde kritik bir adımdır (42,43).

2.2.1.3. EMT belirteçleri: EMT belirteçleri, hücrelerin fenotipik değişimlerini ifade eden moleküllerdir (44). E-kaderin, hücreler arasında tutunmayı sağlayan bir yapışma proteini olan Kaderin ailesinden bir proteindir. E-kaderin gibi hücre yapışma proteinleri, hücreler arasında sıkı bağların oluşmasını sağlar. Kalsiyum iyonları, E-kaderin moleküllerinin birbirine yaklaşmasını tetikleyerek, hücreler arasında güçlü ve yapısal olarak stabil bağlar oluşmasını sağlar. EMT sırasında, E-kaderin'in ifadesinde azalma görülür. N-kaderin ise, E-kaderin'e benzer bir yapışma proteini olup, normalde mezenkimal hücrelerde ifade edilmektedir fakat EMT sırasında, hücrelerde N-kaderin ifadesinde artış meydana gelmektedir (45).

B-katenin ise, hücre yapışmasını sağlayan kaderinlerin hücre içi etkileşimleri için önemli bir yapısal protein olarak işlev görür. E-kaderin'in hücre zarına bağlanmasını sağlar ve hücrelerin birbirlerine yapışmasını sağlayan kompleksleri oluşturur. EMT sırasında, β -katenin'in nükleusa göçü artar ve bu da hücrelerin metastatik davranış sergilemesine katkıda bulunmaktadır (46).

2.2.1.4. EMT transkripsiyon faktörleri: EMT transkripsiyon faktörleri, hücre hattın morfolojik ve fenotipik özelliklerinde değişikliklere neden olan ve EMT sürecini tetikleyen proteinlerdir. Hücrelerin migrasyon, invazyon ve metastaz yapma yeteneklerini artırır (47–49). Bu faktörler arasında TWIST1, SNAI1, SNAI2 (SLUG), ZEB1 ve ZEB2 gibi proteinler bulunur.

ÜNМК hücre hattında, EMT sürecinin belirli transkripsiyon faktörleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Örneğin, TWIST1, SNAI1, SNAI2 (SLUG) ve ZEB1, ÜNМК hücre hattında EMT sırasında yüksek seviyelerde ifade edilir ve bu da hücre hattın invazyon ve metastaz kabiliyetlerini artırır (50). Buna ek olarak, ÜNМК hücre hattında BAX ve CASP3 genlerinin azalmış anlatımı, BCL-2 geninin ise artmış anlatımı da EMT süreci ile ilişkilendirilmiştir (51). VIM geninin ise EMT sürecinde artan bir ifade gösterdiği saptanmıştır (49,52).

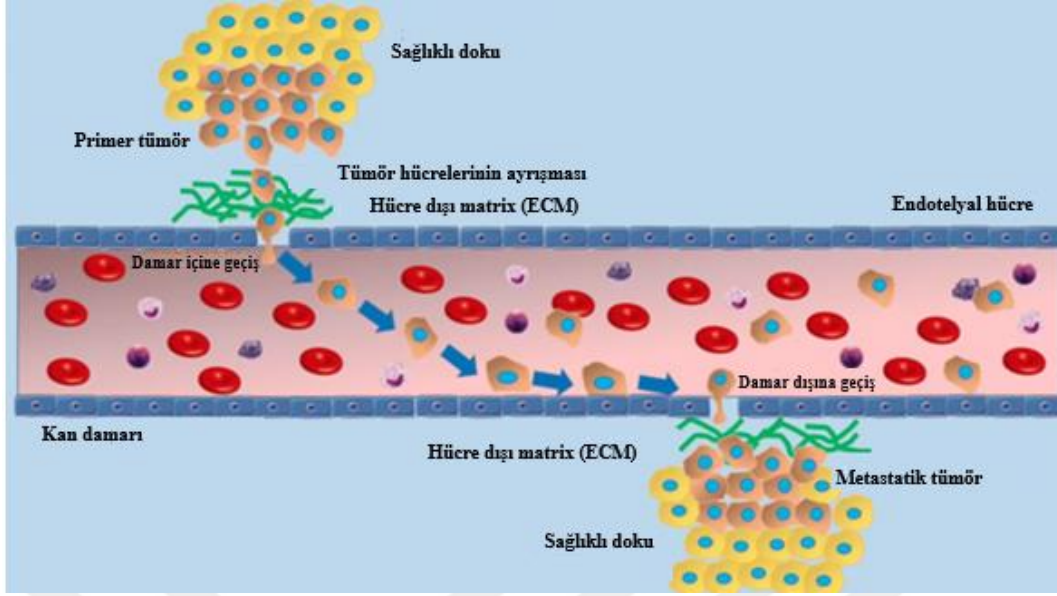
2.2.2. ÜNМК Hücre hattında İnvazyon ve Metastaz

ÜNМК hücre hattı, in vitro büyütüldüğünde genellikle belirli bir sırayla ilerleyen invazyon ve metastaz adımlarını takip eder. İlk adım olarak, Şekil 2.1’de görüldüğü üzere ÜNМК hücreleri hücre dışı matris (ECM) olarak adlandırılan matristen geçerek kendisine en yakın dokuya penetrasyonu gerçekleştirmektedir. ECM, hücre hattın çevre dokulara yayılma yeteneğini kolaylaştıran bir matristir. Daha sonra hücreler, ECM’deki bağlantıları bozarak ve matrisi geçerek dokuya invaze olur. Metastatik süreçte, hücreler birincil tümörden ayrılır, çevreleyen dokuya nüfuz eder, yakındaki kan damarlarına girerek intravazyon yapar (53). Bu adım, hücrelerin invazyon yeteneğini ve metastatik özelliklerini göstermektedir. Hücreler, invazyon adımını tamamladıktan sonra, metastaz adımına geçerek vücudun diğer bölgelerine yayılabilirler.

Metastaz, kanser hücre hattının orijinal tümör bölgesinden ayrılarak kan dolaşımı veya lenfatik sistem aracılığıyla diğer organlara veya dokulara yayılmasıdır. ÜNМК hücre hattı, çevrelerindeki ECM’e doğru ilerleyerek yapışma bağlantıları oluştururlar. Bu süreçte, hücrelerin yüzeyindeki reseptörler ve ligandlar arasındaki etkileşimler gerçekleşir. Daha sonra ECM’in parçalanmasına neden olan metalloproteinazlar gibi proteolitik enzimler salgırlar ve hücre hattın çevrelerindeki dokulara doğru ilerlemesini kolaylaştırır (53). Hücre içi sinyal iletim yollarının aktive edilmesi, hücreler arasındaki iletişimi ve koordinasyonu sağlayan önemli bir mekanizmadır. Bu yollar, hücresel

süreçlerin başlatılmasını, durdurulmasını veya düzenlenmesini kontrol eder. Özellikle kanser gibi durumlarda, bu mekanizmanın bozulması hücrelerin anormal bir şekilde büyümesine, hareket etmesine ve çoğalmasına neden olabilir.

Üçlü negatif meme kanseri hücreleri, kan damarlarına yönelerek dokulara doğru ilerleme eğiliminde olur. Şekil 2.1'de de görüldüğü gibi, bu hücreler dokulara doğru yayılım gösterirler. Bu nedenle, ÜNMK hücre hattının *in vitro* (hücre dışı) ve *in vivo* (canlı organizmalarda) ortamlarda davranışları arasında farklılıklar görülür. *In vitro* çalışmalarda, ÜNMK hücre hattı genellikle kontrollü laboratuvar koşullarında büyütülür. Hücre kültürü aşamaları, hücre ekimi, çoğaltma ve tedavi protokolleri gibi uygulama işlemlerini içerir. Bu çalışmalar, ÜNMK hücre hattının genetik, biyokimyasal ve fenotipik özelliklerini anlamak için kullanılır. *In vivo* çalışmalarda ise genellikle fare modelleri tercih edilir. Bu deneyler canlı organizmalarda gerçekleştirildiği için, ÜNMK hücre hattının tümör büyümesi ve yayılması hakkında bilgiler edinmek mümkündür. *In vivo* adımlar arasında hücre enjeksiyonu, tümör oluşumu, tümör boyutunun üç boyutlu olarak ölçülmesi gibi işlemler yer alır. Bu şekilde kanser modellemesi yapılır ve hücre hattının gerçek dokudaki davranışı ile mikro çevresi hakkında önemli bilgiler elde edilir (54,55).



Şekil 2.1: Primer tümörün izlediği invazyon ve metastaz adımları (54)'ten alınarak düzenlenmiştir.

2.2.3. ÜNМК Anjiyogenez Mekanizması

Üçlü negatif meme kanser hücre hattı, tümör büyümesini ve metastazı desteklemek amacıyla yeni kan damarları oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu yetenek anjiyogenez olarak adlandırılır. Anjiyogenez, ÜNМК hücrelerinin çevrelerindeki normal dokularda veya bağ dokusunda bulunan kan damarlarından büyüme faktörleri salgılayarak tümörün büyümesini ve yayılmasını kolaylaştırmak üzere yeni kan damarları oluşturmalarını ifade eder. Bu süreç farklı sinyal yolları ve proteinler tarafından düzenlenir (54).

Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) gibi büyüme faktörleri, ÜNМК hücreleri tarafından üretilerek anjiyogenez sürecini uyarır. Bu faktörler, çevresel koşulları değiştirerek çevredeki dokulardan yeni kan damarlarının oluşumunu tetikler. ÜNМК hücre hattı, anjiyogenez yoluyla oksijen ve besin maddelerine daha fazla erişim elde ederek hayatta kalmalarını sağlar. Bu süreç ayrıca, ÜNМК hücrelerinin normal hücreler ve bağışıklık hücreleri tarafından tespit edilmesini zorlaştırarak tümörün bağışıklık sisteminden kaçmasını destekler (55). Bu nedenle, ÜNМК hücrelerin anjiyogenez yeteneği, tümörün büyümesini artırma ve çevre ile etkileşimini düzenleme stratejilerinin anlaşılmasında önemli bir rol oynar. Bu

mekanizmaların ayrıntılı şekilde anlaşılması, kanser tedavisinin geliştirilmesi ve tümör yayılmasının engellenmesi açısından kritik önem taşır

2.2.4. ÜNМК Hücre Hattında Ölüm Mekanizmaları

Üçlü negatif meme kanseri hücre hattında görülen ölüm mekanizmaları çeşitli yollarla gerçekleşebilir. Bu yollar arasında en belirgin olanları apoptoz, nekroz ve otofaji olarak sıralanabilir.

2.2.4.1. ÜNМК hücre hattında apoptoz mekanizması: Apoptoz, bir hücrenin normal ömrünün sonunda veya hasar gördüğünde, immün sistemin enfekte hücreleri yok etmek için kullandığı bir mekanizmadır. Apoptoz süreci, bir dizi morfolojik ve biyokimyasal değişiklikleri içerir. Bu değişiklikler arasında hücrenin küçülmesi, çekirdeğin küçülmesi ve kırılması, DNA'nın parçalanması, hücre zarının değişmesi, sitoplazmik içeriğin parçalanması ve hücrenin parçalanması yer alır. Apoptoz, hücrenin kendisini yok etmesi ve parçalanması nedeniyle, özellikle kanser tedavisi alanında araştırmalarda öne çıkar. Kanser hücre hattı, apoptozu engelleyerek veya kaçarak normal hücrelerden farklılaşabilirler (56).

ÜNМК hücre hattında apoptozisin gerçekleşmesi, bir dizi hücrenel yolak tarafından düzenlenir. ÜNМК hücre hattında apoptozisin başlaması için, genellikle mitokondrilerin etkilenmesi yeterlidir. Bu nedenle, mitokondrilerdeki hasarın ve fonksiyon bozukluğunun engellenmesi, ÜNМК hücre hattında apoptozisin engellenmesine neden olabilir. (57). ÜNМК hücre hattında apoptoz mekanizmalarının düzenlenmesinde en önemli faktörlerden biri nükleer faktör kappa B (NF-κB) proteindir. NF-κB, çeşitli hücrenel uyarılara yanıt veren ve apoptozu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. ÜNМК hücre hattında, NF-κB'nin aktivasyonu, hücrenin apoptozu önlemesine ve hücrenin hayatta kalmasına neden olabilir (58).

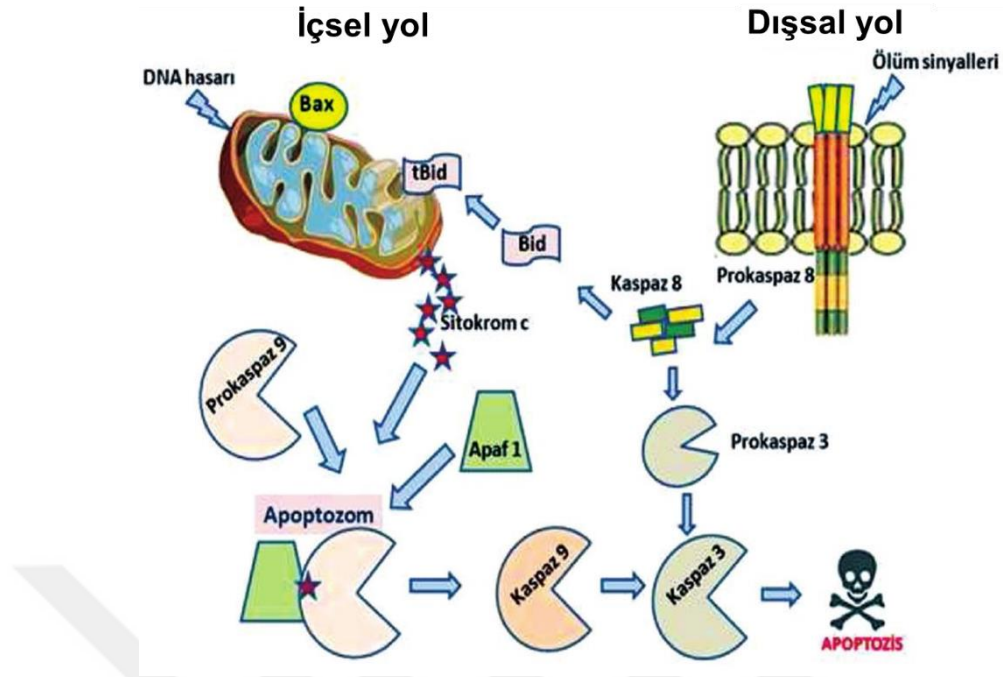
ÜNМК hücre hattında apoptozisin başlatılması için mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yollarına ihtiyaç duyulduğu gösterilmiştir. MAPK yolağı, hücre büyümesi, bölünmesi ve apoptoz gibi süreçleri düzenleyen bir dizi protein kinazdan oluşur. ÜNМК hücre hattında MAPK yolağının inhibe edildiği durumlarda, apoptozisin başlatılması ve hücrenin ölümü artar. (59). Bcl-2 ailesi proteinleri, p53 geni ve kaspazlar da apoptoz düzenlenmesinde rol alır. Bcl-2 ailesi proteinleri, mitokondriyal membran potansiyelinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayarak apoptozu düzenler. P53 geni,

DNA hasarına yanıt olarak apoptozu düzenler ve hücrenin hasarlı DNA'yı tamir etmeden önce ölmesini sağlar. Kaspaz ailesi ise hücrel apoptozun temel enzimatik bileşenleri olarak bilinirler. Bu enzimler, programlı hücre ölümünü yönlendirir ve apoptoz sürecini başlatır (60).

Üçlü negatif meme kanseri hücre hattı, hücre ölümünü sağlayan apoptoz mekanizmalarını etkisizleştirerek kanser hücrelerinin yaşamını sürdürmesine olanak tanır. Bu hücre hattındaki apoptoz engelleyici mekanizmalar, Bcl-2 ailesi proteinlerinin aşırı üretimi, apoptozu baskılayan sinyal yolu bozuklukları ve DNA hasarı onarımındaki eksiklikleri içerir. Ek olarak, ÜNМК hücreleri immün hücre ataklarına rağmen, immün sistem tarafından yönlendirilen apoptozu etkisiz hale getiren çeşitli stratejilerle bu hücre ölümünü önleyebilirler. ÜNМК hücre hattındaki apoptozu artırmak için farklı tedavi yaklaşımları araştırılmaktadır. Bu bağlamda, Bcl-2 ailesi proteinlerini hedef alan ilaçlar veya apoptoz sinyal yollarını uyarıcı ilaçlar gibi tedaviler geliştirme çabaları bulunmaktadır (37).

2.2.4.2. ÜNМК hücre hattında apoptoza direnç mekanizmaları:

Apoptozun gerçekleşmesi için, Şekil 2.2'de gösterildiği gibi, iki temel yol bulunmaktadır. İçsel yolda, hücre içindeki stres veya DNA hasar sinyalleri gibi içsel faktörlerle apoptozu başlatır. Dışsal yolda ise hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanan dışsal sinyal molekülleri apoptozu başlatır. ÜNМК hücre hattında apoptoz mekanizmalarını düzenleyen faktörlerin birçoğu hücre içi reseptör-sinyal yollarıyla bağlantılıdır (61). ÜNМК hücre hattındaki reseptör-sinyal yolağı bozuklukları, p53 mutasyonları, kaspaz anlatımının azalması ve BCL-2 ailesindeki protein anlatımları görülmektedir. Bir çalışmada, ÜNМК hücre hattında EGFR sinyal yolağının aşırı aktive olduğu ve EGFR inhibitörlerinin apoptozu artırdığı gösterilmiştir (62). Başka bir çalışmada ise ÜNМК hücre hattında p53 geninin sık mutasyona uğradığı ve bu mutasyonların hücre hattın apoptozu önlemesine neden olduğu gösterilmiştir (63). Ayrıca, ÜNМК hücre hattında kaspaz-3,6 ve 9 anlatımının azaldığı ve bunun da hücre hattın apoptozu önlemesine neden olduğu gösterilmiştir (64). BCL-2 protein ailesinde, anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler bulunur. Anti-apoptotik proteinler hücrenin ölümünü engellerken, pro-apoptotik proteinler apoptozu tetikler.



Şekil 2.2: Apoptoz mekanizması (61)'den alınarak düzenlenmiştir.

BCL-2 ve BCL-XL gibi anti-apoptotik proteinler, hücrenin ölümünü engelleyerek tümör büyümesini destekler. Ancak, BAX ve BAK gibi pro-apoptotik proteinler ÜNМК hücre hattında apoptozu başlatarak tümör büyümesini engeller. Özellikle BAX proteininin artırılmış ifadesinin ÜNМК hücre hattında apoptozu artırdığı ve tümör büyümesini azalttığı gösterilmiştir (65). BCL-2 ailesi proteinlerinin fazla üretilmesi ise apoptozun engellenmesine yol açar. Başka bir çalışmada ise MCL-1 ve BCL-XL gibi BCL-2 ailesi proteinlerinin fazla üretildiğinin, ÜNМК hücrelerinin apoptozu engellenmesine neden olduğu gösterilmiştir (66).

2.2.4.3. ÜNМК hücre hattında nekroz mekanizması:

Nekroz, hücrenin zararlı bir uyarı veya olumsuz bir çevre koşulu ile karşılaşması sonucu hücre zarının bozulması ve hücre içindeki yapıların dağılmasıyla karakterize edilen bir ölüm şeklidir. Bu ölüm şekli, inflamatuvar cevaplara ve dokusal hasara neden olabilir. ÜNМК hücre hattında, nekrozun çeşitli patolojik koşullarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (67). Bazı araştırmalar, ÜNМК hücre hattındaki nekroza, oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi, mitokondriyal işlev bozukluğu ve DNA hasarı gibi çeşitli mekanizmaların neden olduğunu göstermektedir (68,69).

2.2.4.4. ÜNМК hücre hattında otofaji mekanizması: ÜNМК hücre hattı, hücre ölüm mekanizması olarak otofajiyi kullanma yeteneğine sahiptir. Otofaji, hücrenin hasarlı proteinleri, bozulmuş organelleri ve diğer hücre malzemeleri hedef alarak onları parçalayarak ortadan kaldırdığı bir süreçtir. ÜNМК hücre hattında otofaji, farklı mekanizmalar aracılığıyla düzenlenir. Genelde hücre gereksinimlerine göre ayarlanan otofaji, özellikle besin eksikliği veya stresli koşullar altında artarak devreye girer (70). ÜNМК hücre hattında otofajinin artırılması, kanser hücrelerinin ölümünü teşvik edebilir ve tedaviye katkı sağlayabilir. Bu bağlamda, otofaji üzerindeki etkilerin anlaşılması, ÜNМК'nin tedavisinde potansiyel bir strateji olarak değerlendirilebilir. Yapılan çalışmalarda, ÜNМК hücre hattında otofajinin PI3K/Akt/mTOR yoluyla aracılığıyla inhibe edildiğini ve bazı hücre sinyal yolları aracılığıyla düzenlendiğini göstermektedir. Bu sinyal yolları arasında PI3K/Akt/mTOR yolu, MAPK sinyal yolu ve JNK sinyal yolu yer almaktadır. Bu sinyal yolları, ÜNМК hücre hattında otofaji sürecini kontrol eden mekanizmalardır (54,71).

2.2.5. ÜNМК ve Hücre Döngüsü İlişkisi

Hücre döngüsü, hücrelerin büyümesi, bölünmesi ve yenilenmesini düzenleyen karmaşık bir süreçtir. Bu süreç, sıkı bir şekilde kontrol edilen aşamalardan oluşur. Hücre döngüsü kontrol noktaları, hücrenin geçişini denetleyen ve hatalı ya da hasarlı hücrelerin bölünmesini engelleyen mekanizmalardır. Bu kontrol noktaları, hücrenin DNA hasarı, replikasyon hataları veya diğer anormallikler gibi durumlarını algılar ve hücrenin bölünme sürecini durdurur veya geciktirir. Kanser, bu kontrol noktalarının bozulması sonucu ortaya çıkabilir. Hatalı kontrol noktaları, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesine ve kanser hücrelerinin oluşumuna yol açabilir (72). Bu nedenle, hücre döngüsü kontrol noktalarının kanserdeki rolünün anlaşılması, kanser mekanizmalarını anlamak ve tedavi stratejileri geliştirmek açısından hayati öneme sahiptir.

Hücre döngüsü, genellikle siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (CDK'ler) olarak adlandırılan protein kompleksleri tarafından düzenlenir (73). ÜNМК hücre hattında ise, hücre döngüsü düzenlemesi bozularak kanser hücre hattının çoğalmasını teşvik etmektedir. CDK4/6 ve CDK2 gibi belirli CDK'ler, hücre döngüsü ilerlemesi için gereklidir ve ÜNМК hücre hattında bu CDK'lerin aktivasyonu artmaktadır (74). Bu durum ÜNМК hücre hattının hızlı bölünmesine ve çoğalmasına yol açar (75). CDK'leri hedefleyen ilaçlar gibi hücre döngüsü düzenleyici ilaçlar kullanılarak ÜNМК hücre

çoğalması engellenmeye çalışılabilir. Bu ilaçlar, hücre döngüsüne müdahale ederek hücrelerin bölünmesini durdurur ve kanser hücre hattının büyümesini engeller (76).

2.3. DOĞAL BİLEŞİKLERİN ANTI-KANSER ÖZELLİKLERİ

Geleneksel kanser tedavileri, kanser hücreleri kadar sağlıklı hücrelere de zarar vermekte ve ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle, doğal bileşikler kanser tedavisinde daha sık tercih edilir hale gelmektedir (77). Doğal bileşikler, bitkiler, meyveler, sebzeler ve bazı mantarlar gibi doğal kaynaklardan elde edilen organik bileşiklerdir (78). Doğal bileşiklerin kanser tedavisinde tercih edilmesinin birkaç farklı nedeni vardır. Öncelikle, doğal bileşiklerin, kanser hücre hattının büyümesini durdurmak veya öldürmek için etkili olabilecek bir dizi biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Örneğin, bazı bitkisel bileşikler antioksidan, anti-enflamatuar ve anti-kanser etkilere sahiptir (79,80). İkinci olarak, doğal bileşiklerin yan etkileri, geleneksel kanser tedavilerine göre daha azdır (77). Bu nedenle, doğal bileşikler kanser tedavisi için daha az riskli bir seçenek olarak kabul edilirler. Son olarak, doğal bileşikler daha ucuz ve daha kolay erişilebilir oldukları için tercih edilmektedir. Geleneksel kanser tedavileri, maliyetli olmasının yanı sıra ulaşım açısından zorlu süreçler gerektirmektedir (81).

2.3.1. ÜNМК Üzerinde Doğal Bileşiklerin Temel Moleküler Hedefleri

ÜNМК üzerinde doğal bileşiklerin etkileri ve moleküler hedefleri üzerine yapılan çalışmalar oldukça yeni olmakla birlikte, bazı moleküler hedefler ve etkileri belirlenmiştir. Bunlardan bazıları aşağıda verilmiştir. Örneğin, bazı doğal bileşikler, özellikle flavonoidler, CDK aktivitesini inhibe ederek hücre çoğalmasını durdurabilir ve ÜNМК hücre hattında apoptozu tetikleyebilir (82). NF-κB, hücrelerdeki enflamatuar yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve kanser gelişiminde de rol aldığı düşünülmektedir. Bazı doğal bileşikler, NF-κB sinyal yolunu inhibe ederek ÜNМК hücre hattında apoptozu tetiklemektedir (83). Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α,) hücre ölümü sinyallemesinde önemli bir role sahiptir. Hücreler arasında iletişim sağlayan bir protein olan sitokin olarak da bilinir. Bazı doğal bileşikler, TNF-α salınımını artırarak ve TNF-α reseptörlerini hedefleyerek ÜNМК hücre hattında apoptozu tetiklemektedir (84).

2.3.2. Anti-Kanser Özelliikli Doğal Bileşikler

Paklitaksel, bitki kaynaklı doğal ürünler arasında öne çıkan etkili bir bileşiktir ve Pasifik kızılçam ağacının kabuğundan elde edilir. Özellikle meme kanseri, over kanseri ve akciğer kanseri gibi kanser türlerinin tedavisinde kullanılan bir ajandır. *Paklitaksel*, kanser hücrelerinin bölünme süreçlerini etkileyerek büyümelerini engelleyen bir mekanizma üzerinden etki gösterir. Bu özelliği nedeniyle kanser tedavilerinde kullanımı yaygınlaşmıştır ve klinik uygulamada etkili sonuçlar elde edilmesini sağlar (85).

Vinblastin, çobançantası bitkisinden elde edilen bir alkaloiddir ve lenfoma, beyin kanseri ve akciğer kanseri tedavisinde kullanılır (86). *Vincristin*, Madagaskar gülü bitkisinden elde edilen bir alkaloiddir ve lenfoma, beyin kanseri ve çocukluk çağı kanserleri tedavisinde kullanılır (87). Çin tıbbında kullanılan Çin'e özgü bir ağaç olan "*Camptothecin*" ağacının kabuğundan elde edilen bir bileşik olup kolorektal kanser, akciğer kanseri, meme kanseri ve over kanseri tedavisinde kullanılmaktadır (88).

Biberiye, "*Rosmarinus officinalis*" adlı bitkinin yapraklarından elde edilen Akdeniz bölgesinde yetişen ve yaygın kullanılan bitkisel bir baharattır. Yemeklerde tatlandırıcı olarak kullanılmasının yanı sıra tıbbi amaçlar için de kullanılmaktadır (89). Hafıza arttırıcı, antioksidan ve anti-enflamatuar özellikleri, bağışıklık sistemi üzerinde olumlu etkileri, kan dolaşımını arttırıcı etkileri ve sindirim sistemini destekleyici etkileri bulunmaktadır (90). Ayrıca, biberiye yağı, saç ve cilt bakımı ürünlerinde de kullanılır (91).

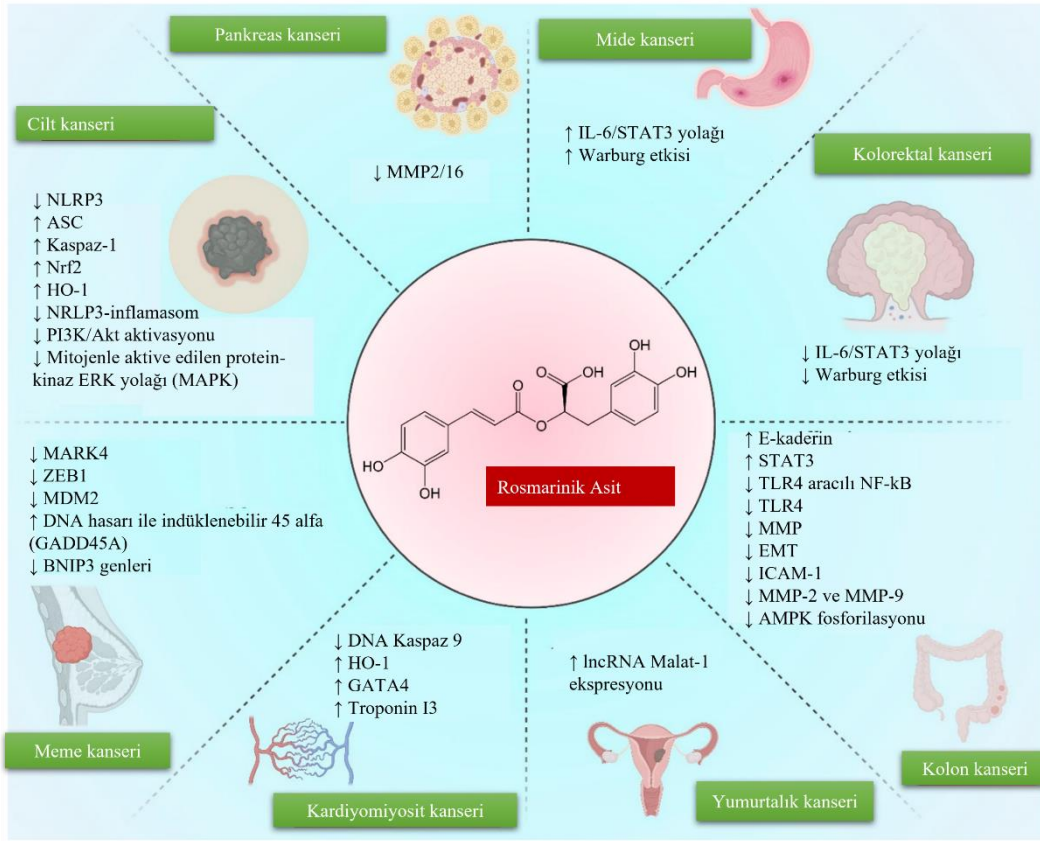
2.3.3. Rosmarinik Asit

Fenolik bileşikler, hidroksil gruplarının aromatik benzen halkasına bağlı olduğu kimyasal bileşiklerdir. Bu yapıları sayesinde vücuda alındıklarında aktif bileşiklere dönüşebilirler ve hücre içinde enzimler ve diğer biyomoleküllerle etkileşime girebilme potansiyeline sahiptirler (92). Hidroksisinamik asit (HSA) türevleri, sebze, meyve, çekirdekler ve tahıllarda doğal olarak bulunan bu fenolik bileşiklere bir örnektir. Fenilalanin (Phe) ve tirozin (Tyr), HSA sentez yolunun başlangıç molekülleri olarak kullanılır. Bu sentez yolundan elde edilen ferulik asit, kafeik asit, RA ve kurkumin gibi moleküller, öncü molekül olarak kullanılarak ileri metabolik yollarda çeşitli flavonoidler ve antosiyaninlere dönüştürülebilir. HSA türevleri, suda çözünebilir moleküller oldukları için ağız yoluyla alındıklarında biyoyararlanımları oldukça etkili ve

hızlıdır (92). Bitki kaynaklı HSA türevi bileşikler, sınırlı veya ihmal edilebilir yan etkileri olmalarının yanı sıra kanser hücrelerine karşı etkili oldukları bilinmektedir. Bu nedenle, son zamanlarda geleneksel tedavilere alternatif veya tamamlayıcı olarak kullanılmak üzere aktif olarak araştırılmaktadır (92).

Hidroksisinamik asit türevleri arasında, hücre içine yüksek oranda alınabilen moleküller arasında yer alan RA, Lamiaceae familyasına ait bitkilerden elde edilebilir. Bu bitkilerin uçucu yağlarından faydalanılan ve özellikle biberiye (*Rosmarinus officinalis*) bitkisinden izole edildiği için "rosmarinik asit" olarak adlandırılmaktadır. RA, moleküler alım oranı yüksek olan bir bileşik olarak öne çıkar. Nane, adaçayı, kekik ve biberiye gibi bazı bitkilerde bol miktarda RA bulunur. Kimyasal formülü $C_{18}H_{16}O_8$ 'dir ve fenolik asitlerin bir alt grubudur. RA'nın en önemli kimyasal özellikleri arasında antioksidan, anti-enflamatuar ve antiviral etkileri bulunur (93). Ayrıca, bağışıklık sistemini güçlendirdiği ve beyin fonksiyonlarını artırdığı da gösterilmiştir.

Şekil 2.3'te görüldüğü üzere RA'nın çeşitli kanser türlerinde etkili olabileceği ve moleküler hedefleri vardır. Yukarı ok (↑) sembolü RA'nın bu hedefler üzerinde pozitif etkiler yarattığını ve onları artırdığını gösterir. Bu, genellikle hedef proteinlerin aktivasyonu veya gen ifadesinin artması anlamına gelir. Aşağı ok (↓) sembolü ise RA'nın bu hedefler üzerinde negatif etkiler yarattığını ve onları azalttığını gösterir. Bu durumda, genellikle hedef proteinlerin inhibisyonu veya gen ifadesinin azalması anlamına gelir. Bilgiler doğrultusunda RA farklı kanser türlerindeki etkisini anlamak ve potansiyel tedavi stratejileri geliştirmek için kullanılabilir (95).



Şekil 2.3: Çeşitli kanser türlerinde RA'nın moleküler hedefleri (95)'ten alınarak düzenlenmiştir.

2.3.4. RA'nın ÜNМК Üzerindeki Anti-Kanser Etkileri

RA'nın, ÜNМК hücre hattında çeşitli hücrel sinyal yolağlarını ve gen ifadelerini etkileyerek anti-kanser etki sergilediği bulunmuştur (94). RA, ÜNМК hücre hattında NF-κB sinyal yolağlarını inhibe ederek anti-enflamatuar etki gösterir. Ayrıca, RA, ÜNМК hücre hattında apoptozu artıran kaspaz-3 ve kaspaz-9 genlerinin ifadesini artırır. ÜNМК hücre hattında c-Myc, cyclin D1 ve Bcl-2 gibi bazı onkogenlerin ifadesini azaltırken, tümör baskılayıcı genlerin (*p21*, *p27*, ve *PTEN*) ifadesini arttırmaktadır (95). Gen ifadesi değişiklikleri kanser hücre hattının büyüme ve çoğalmasını engelleyebilir. Bu nedenle, RA'nın ÜNМК üzerindeki hücrel sinyal yolağı ve gen ifadeleri üzerindeki etkileri, ÜNМК'nin tedavisi için umut verici bir strateji olmaktadır (96–98).

2.3.4.1. RA ile yapılan çalışmalar: RA üzerine yapılmış klinik çalışmaların sayısı henüz çok azdır ve çoğunlukla hayvan modelleri üzerinde çalışılmıştır (99). RA ile ilgili yapılan klinik çalışmaların büyük bir kısmı, bitkisel bileşiklerin RA tedavisindeki potansiyelini incelemek üzere insanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bir örnek olarak, kekik ve adaçayı özütleri içeren bir çalışmada, diyabetik hastalarda kan şekeri seviyelerini düşürmede etkili oldukları görülmüştür. Başka bir araştırmada ise bu bitkisel özütlerin Alzheimer hastalarında bilişsel fonksiyonları iyileştirdiği ortaya konmuştur. Ayrıca, RA içeren bitkilerin atopik dermatit gibi bazı cilt hastalıklarında da olumlu etkiler gösterebileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Ancak, bu çalışmaların çoğunluğu, insanlar üzerinde RA'nın etkilerini değil, RA içeren bitkisel bileşiklerin etkilerini incelemeye yöneliktir (99,100).

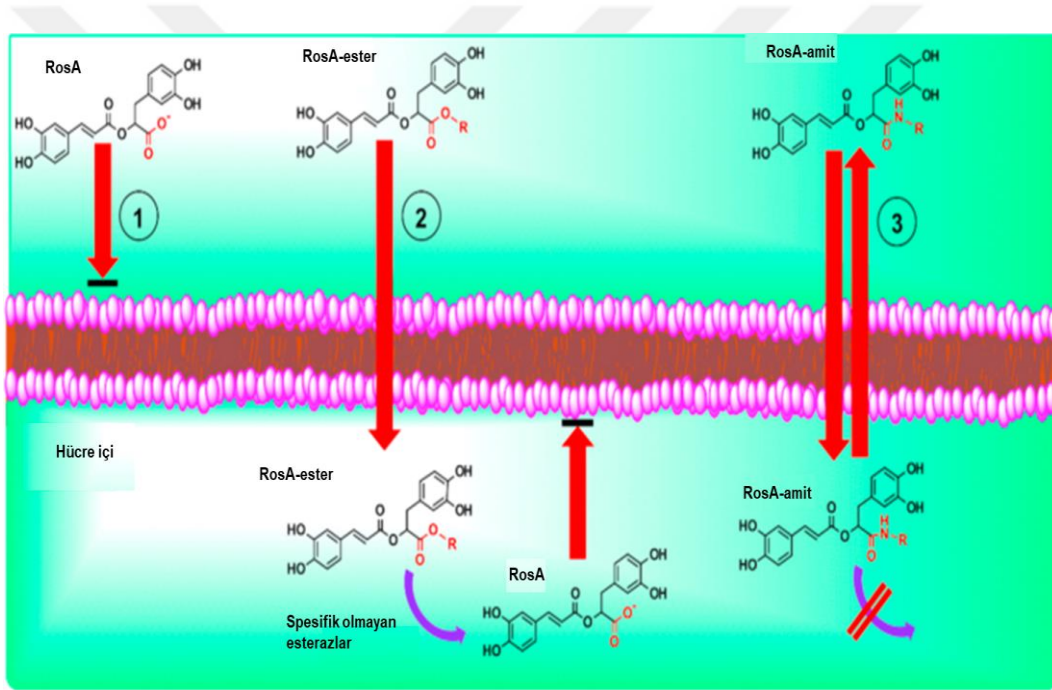
2.3.4.2. RA türevli ilaçlarla yapılan çalışmalar: RA'nın düşük biyoyararlanımı ve kısa yarı ömrü nedeniyle, bu bileşiğin tedavide kullanımı sınırlıdır. Bu nedenle, RA molekülü üzerinde yapılan değişiklikler, biyoyararlanımı artırarak tedavi etkinliğini arttırabilir (98). RA türevleri, hücre içindeki bazı avantajlara sahiptir. Örneğin, lipofilik RA türevleri, hücre içinde daha iyi çözünürlüğe sahip olur ve bu da hücrelere daha kolay girmelerini sağlar. Bir başka çalışmada, özellikle RA türevlerinden propil ve heksil esterlerin anti-bakteriyel aktiviteyi arttırdığı bulunmuştur (101). RA türevleri ile ilgili yapılan bir çalışmada anti-tümör etkisi, bir başka çalışmada ise insan herpes virüsleri üzerinde güçlü antiviral aktiviteleri gösterilmiştir (89,102,103).

Bir çalışmada ise RA metil esterinin, vasküler düz kas hücre (VSMC) proliferasyonunu inhibe etme mekanizmasının açıklandığı belirtilmektedir. CDK2, hücre döngüsünde önemli bir rol oynayan bir enzimdir ve Retinoblastoma (Rb) proteininin fosforilasyonunu etkiler. RAME, CDK2 inhibisyonu yoluyla Rb proteininin fosforilasyonunu azaltarak hücre hattın G₀/G₁ fazında durmasını sağlamıştır. Bu durumda, hücre hattın proliferasyonu durdurularak ve VSMC proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (104).

Kanser araştırmalarında, ÜNМК üzerinde çeşitli moleküler yolları, hücre canlılığını, apoptoz mekanizmalarını ve ilgili etkileri incelemişlerdir. Örneğin, ÜNМК'de yapılan çalışmalar, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aşırı aktivasyonunun tümör gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (105). Ayrıca, ÜNМК hücre hattında PI3K/Akt/mTOR yolağının aşırı aktif olduğu, bu da hücre canlılığını artırdığı ve apoptozu engellediği

belirlenmiştir (106). Buna ek olarak, ÜNМК'de p53 gen mutasyonlarının yaygın olduğu ve p53 eksikliğinin apoptoz mekanizmasını etkilediği saptanmıştır (107).

RA'nın, karboksilik gruptaki negatif yük olması nedeniyle hücre zarından geçmesi engellenir. Ancak, lipofilik RA ester türevleri plazma zarından kolayca içeriye yayılır. Hücre içinde bulduklarında, bu ester türevleri spesifik olmayan esteraz enzimleri tarafından hidrolize edilir. Hidroliz reaksiyonu, ester bağının su molekülleriyle tepkimeye girerek asit ve alkole ayrışmasını sağlar. Şekil 2.4'te görüldüğü gibi, hidroliz sonucunda RA elde edilir ve hücre zarından dışarıya difüzyon yapamaz, hücre içinde birikir. Bu sebepten dolayı RA türevleri ile çalışılmaktadır (108).



Şekil 2.4: RA ve esterlerin hücre içine alımı (109)'dan alınarak düzenlenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Tez çalışması boyunca deneylerde kullanılan kimyasalların bilgileri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan kimyasalların listesi

Kimyasal adı	Marka	Katalog numarası
RPMI Medium 1640 (1x)	Gibco	21875-091
Mammary Epithelial Growth Basal Medium (Megm)	Lonza	Cc-3151
Fetal Bovine Serum	Diagnovum	D154-100ml
Dulbecco's PBS (1X)	Capricorn	PBS-1A
Penisilin-Streptomisin	Sigma Aldrich	P4333-100ml
Trypsin- Edta Solution	Sigma Aldrich	T4049-100ml
Dimethyl Sulfoxide	Honeywell	41640-11
Ethanol Absolute	Isolab	920.026.2500-2.5
Metanol	Honeywell	24229-2.5L
Kristal Viyole	Biobasic	Cb0331
Rosmarinik Asit	BiosynthCarbosynth	Fr02310
Triton X-100	Biobasic	9002-93-1
İzopropil Alkol	Zag Kimya	Zs.100280.1000
Sybr Green Real Time PCR Master Mix (2x)	Nepenthe	NP041010210 - 1 mL
Onescript® Plus cDNA Synthesis Kit	Abm	G236

Tablo 3.1 (devam)

Resazurin	RD Systems	AR002
Rnase A	Sigma	10109142001
Propidyum İyodür		
Annexin V-FITC/PI	Elabscience	E-CK-A211
Sodium Chloride	Isolab- 1kg	7647-14-5
Ambion Nuclease Free Water	Invitrogen	Am9938
Cell Basement Membran	Atcc	Acs-3035
Sodium Azide	Biobasic	S2002
Copper (I) Sulfate Pentahydrate	Biobasic	Cdb0063

3.2. SARF MALZEMELER VE KULLANILAN CİHAZLAR

Çalışmada kullanılan sarf malzemelerin marka ve katalog numaraları Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2: Kullanılan sarf malzemelerin listesi

Sarf Malzemeler	Marka	Katalog numarası
Pipet uçları (10 µL)	Eppendorf	20221216
Pipet uçları (200 µL)	NEST	302106
Pipet uçları (1000 µL)	KIRGEN	KG1313
Serolojik pipet (5 mL)	Greiner bio-one	606180/5 mL
Serolojik pipet (10 mL)	Greiner bio-one	607180/10 mL
Serolojik pipet (25 mL)	Greiner bio-one	760180/25 mL

Tablo 3.2 (devam)

Kriyotüp (2 mL)	Greiner Bio-One	
Thoma Lamı		
6 Kuyucuklu Steril Plate	Greiner Bio-One	657160
96 Kuyucuklu Steril Plate	Nest	
Transwell Plate	Costar	3422
PCR Microplate	Labselect	Mp-96-Hs-0200
PCR Plate Sealing Film	Nest	410001
Santrifüj Tüpleri (1,5-2-5 mL)	Isolab	
Şırınga		
Şırınga Filtresi		
25cm ² ve 75cm ² Flasklar	Greiner Bio-One	Ct-002-50a
Parafilm	Isolab	Pm-996

Deney süreci boyunca kullanılan cihazların marka ve model isimleri Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3: Kullanılan cihazların listesi

Hassas Tartı	Ohaus	H15221-H15222
--------------	-------	---------------

Invert Mikroskop	Motic	AX-224
Mikrodalga Fırın	Samsung	AE2000
Allegra X-30R Centrifuge	Beckman Coulter	ME87M
Santrifüj	HERMLE	Allegra X-30R

Tablo 3.3 (devam)

Otoklav	Hirayama	MTC-100
Mikropipet Seti (10, 100, 1000 µL)	Brand	HV50-L
Invert Microscopy	Carl Zeiss	Transferpette-S
The Personal Automated Lab Assistan (Paula)	Leica Microsystems	
Saf Su Cihazı	MES	H-IMS-50
Biyogüvenlik Kabini	Bioair	MP Minipure
Orbital Çalkalayıcı	Heidolph	Safe Mate EZ 1.2
Buzdolabı	Vestel	Unimax 1010
Çok Kanallı Pipet	Rainin	
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Heidolph	MR Hei-Tec

3.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ

MDA-MB-231 (ATCC: HTB-26) hücre hattı, 51 yaşındaki bir kadından elde edilen metastatik meme adenokarsinomunu temsil eder. Bu hücre hattı yapışkan ve epitelyal yapıya sahiptir ve ER, PR ve HER2 içermediği için oldukça agresif ve invaziv bir özellik sergiler. RPMI-1640 bazal besiyerine %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin ilavesiyle MDA-MB-231 hücre hattının besiyeri hazırlandı. Hücreler, 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatör ortamında kültürlenerek çoğaltıldı.

Hücre kültürü işlemleri, steril bir kabin içinde gerçekleştirildi ve kabinde kullanılan tüm malzemeler %70'lik etanol ile sterilize edildi.

MCF-10A (ATCC: CRL-10317), 1984 yılında 36 yaşındaki beyaz bir kadının meme dokusundan elde edilen bir epitel hücre hattıdır. Bu hücre hattı, Michigan Kanser Vakfı tarafından muhafaza edilmektedir. MCF-10A normal meme epitel hücre hattı, %1 penisilin-streptomisin, %2 fetal sığır serumu (FBS), 5 ng/ml epitel büyüme faktörü (EGF), 0,5 µg/mL hidrokortizon, 5 µg/mL insulin, 50 µg/mL sığır hipofiz ekstremini içeren Mammary Epithelial Growth Basal Medium (MEGM) besiyeri içerisinde 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂ ortamında kültürlenmektedir.

3.3.1. Hücre Çözdürme

Kriyotüp içinde DMSO ile dondurulmuş hücreler hızlı bir şekilde çözülmesi için 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda birkaç dakika bekletildi. Çözülen hücreler, içinde 4 mL RPMI-1640 besiyeri bulunan falkon tüpüne aktarıldı. Santrifüj, 1300 rpm hızında ve 4 dakika süreyle uygulandı. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant kısmı atıldı. Elde kalan hücre pelleti, 1 mL besiyeri içinde çözüldü. Ardından, 4 mL besiyeri içeren T-25 hücre kültürü flaska içine hücreler aktarıldı. Bu hücreler, 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren inkübatör ortamında kültürlenerek çoğaltıldı.

3.3.2. Hücre Besiyeri Değişimi ve Pasajlama

Hücreler, mikroskop altında yoğunluklarına bağlı olarak incelendi ve besiyeri değişimi veya pasaj işlemleri uygulandı. Besiyeri değişimi için, besiyeri ısıtılarak 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda ısıtıldı. Flask içerisindeki eski besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra yeni besiyeri eklenerek işlem gerçekleştirildi. Hücre hattının yoğunluğu %70-80 seviyesine ulaştığında pasaj işlemleri gerçekleştirildi. Bu işlemler için besiyer, PBS ve tripsin, sıcak su banyosunda ısıtıldı. Flask içerisindeki besiyeri uzaklandırdıktan sonra, içerisinde kalsiyum ve magnezyum bulunmayan 2 mL PBS ile yıkama yapıldı. T-25 flask için 500 µL Tripsin-EDTA eklenerek 3-4 dakika boyunca inkübatörde bekletildi. Hücre hattının flask yüzeyinden kalkıp kalkmadığı, mikroskop ile kontrol edildi. Tripsin işlemi sonrası, kullanılan Tripsin-EDTA miktarının 3 katı kadar RPMI-1640 besiyeri eklenerek tripsin inaktive edildi. Flaskların üzerine hücre hattının adı, tarih ve pasaj numarası yazıldı. Hücreler uygun koşullarda büyümeleri için inkübatöre konuldu. Aynı işlemler MCF-10A hücre hattı için de MEBM besiyeri ortamında gerçekleştirildi.

3.3.3. Hücre Dondurma

Stoklanacak MDA-MB-231 hücreleri, 2 mL'lik kriyotüplerde, serumlu besiyerine eklenmiş %10 DMSO ortamında donduruldu. MCF-10A hücre hattı ise %7.5 DMSO ortamında donduruldu. Kriyotüpler, hücre dondurma işlemi sırasında her dakika -1°C'ye soğutulması amacıyla "Corning CoolCell" içerisinde -80°C'ye yerleştirildi. Bu yöntemle, hücreler aşamalı ve kontrollü bir şekilde donduruldu.

3.3.4. Hücre Sayımı

Hücre ekimi aşamasını içeren çalışmalarda, her bir kuyucuğa eşit miktarda hücre hattının dağıtılması amacıyla hücre sayımı gerçekleştirildi. Hücre sayımı için, tripsinizasyon işleminden sonra 10 µL hücre Thoma lamına damlatılarak ters mikroskop altında sayım yapıldı. Hücre sayımı hesaplaması, Denklem 3.1'e göre yapıldı.

$$\text{Konsantrasyon (hücre/mL)} = (\text{Hücre sayısı}) / 4 \times \text{Dilüsyon faktörü} \times 10^4 \quad (3.1)$$

3.4. HÜCRE ÇOĞALMASI ANALİZİ

Hücre canlılığı/sitotoksosite deneyleri Resazurin kullanılarak yapıldı. Resazurin (%10) besiyeri içerisinde seyreltildi. Hücreler ilk önce 96 kuyucuklu plakalara 5×10^4 hücre/kuyucuk olarak ekildi. Hücreler bir gün bekletilerek 0- 200 µM doz aralığında RA, RAME, RAEE, RABE ve RAPE ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edildi. 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna Resazurin çözeltisi eklendikten sonra, hücreler 37°C'de %5 CO₂ ortamlı inkübatörde 90 dakika inkübe edildi. Canlı hücrelerin metabolik aktivitesi sonucu açığa çıkan renk değişimi floresan ve plaka okuyucuda 560 ve 590 nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak okutuldu. IC₅₀ hesaplamaları için çevrimiçi bir araç kullanılarak hesaplandı (127).

Terapötik endeks hesaplamaları sağlıklı hücre olarak MCF-10A ve kanserli hücre olan MDA-MB-231 hücresinin IC₅₀ değerleriyle denklem 3.2'deki formüle göre hesaplandı (109).

$$\text{Terapötik indeks} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ sağlıklı hücre}}{\text{IC}_{50} \text{ kanserli hücre}} \quad (3.2)$$

3.5. KOLONİ OLUŞTURMA

ÜNMK hücre hattı olan MDA-MB-231, 5×10^2 hücre içeren bir kuyucuk plakasına 6 kuyucuk şeklinde ekildi. Ertesi gün, hücrelere RA, RAME ve RAEE esterleri $90 \mu\text{M}$ konsantrasyonunda uygulandı. Hücreler, 12 gün süresince 37°C sıcaklıkta ve %5 CO_2 içeren inkübatör koşullarında tutuldu. İnkübasyon sonrasında besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile yıkama adımı yapıldı. Daha sonra fiksasyon işlemi için, her bir kuyucuğa soğuk %100 metanol ($500 \mu\text{L}$) eklenerek, $+4^\circ\text{C}$ 'de 20 dakika boyunca bekletildi. 20 dakika sonunda metanol uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine %0.1 kristal viyole boyası ($500 \mu\text{L}$) eklendi. Hücreler, oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edildi. Süre sonunda, kuyular PBS ile yıkandı ve fazla boyadan uzaklaştırıldı. Oluşan koloniler, invert mikroskop altında görüntülendi.

3.6. ÇİZİK YARA İYİLEŞME DENEYİ

MCF-10A ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde RA ve RAME, RAEE esterlerinin hücre göçü üzerine etkileri ilk olarak yara iyileşme analizi ile karşılaştırıldı. Hücreler ilk önce 6 kuyucuklu plakalara 2×10^5 hücre/kuyucuk olarak ekildi ve plaka yüzeyinde %90 doluluk oranına geldikleri zaman $10 \mu\text{L}$ 'lik pipet ucu ile kuyucuğun ortasına bir çizgi atıldı. Besiyeri uzaklaştırılıp PBS ile yıkama yapıldıktan sonra RA, RAME ve RAEE esterlerinin belirlenen IC_{50} değerine göre $90 \mu\text{M}$ dozları ile muamele yapıldı. Hücreler 37°C 'de %5'lik CO_2 ayarlı inkübatörde bekletilerek 0, 6, ve 12. saatler içerisindeki yara kapanma görüntüleri otomatik görüntü alma cihazı (PAULA, Leica) ile kaydedildi. Ardından, cihazda otomatik olarak hesaplanan "yara kapanma hızı" değerleri kaydedildi.

3.7. HÜCRE GÖÇÜ VE İSTİLASI DENEYİ

Hücre göçü ve istila deneyleri için 24 kuyulu Transwell plakaları ve içerdikleri $8 \mu\text{m}$ gözenek boyutlu polikarbonat zar içeren insertler kullanıldı. Matrijel bir gün öncesinden $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletildi. Mikropipet uçları ve eppendorf tüpleri önceden soğutuldu ve kullanıldı. Deneyin aşamaları şu şekilde gerçekleştirildi. İlk olarak, insertlerin içine 1 mg/mL Matrijel çözeltisi $100 \mu\text{L}$ olarak eklendi. Transwell plaka, 37°C 'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda Matrijel, pipet yardımıyla çekildi ve uzaklaştırıldı. Insertlerin alt kısmına, FBS içeren besiyeri ve $90 \mu\text{M}$ konsantrasyonlu RA, RAME ve RAEE esterleri eklenerek ($500 \mu\text{L}$) dolduruldu. . Insertlerin üst kısmına,

FBS içermeyen besiyeri ortamında MDA-MB-231 hücre hattından 5×10^4 yoğunlukta hücre (100 μ L) ekildi. Örnekler, 48 saat boyunca 37°C 'de inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda insertler çıkarıldı ve alt kısımdaki kuyucuklar yavaşça PBS ile yıkandı.

Yıkama işleminden sonra her kuyucuğa soğuk %100 metanol (500 μ L) eklendi. Bu işlem, hücre hattın fiksasyonu için $+4^\circ\text{C}$ 'de 20 dakika boyunca bekletildi. 20 dakika sonunda metanol uzaklaştırıldı ve hücre hattın üzerine %0.1 kristal viyole boyası (500 μ L) eklendi. Hücreler, oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edildi. Süre sonunda kuyular PBS ile yıkanarak fazla boyadan uzaklaştırıldı. Matrijel üzerinden göç eden hücreler invert mikroskop ile bakılarak kaydedildi.

3.8. HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZİ

MDA-MB-231 hücre hattı 6 kuyucuklu plakalara 2×10^5 hücre/kuyucuk ekildi. Hücreler bir gün bekletilerek RA, RAME ve RAEE ile 90 μ M doz aralığında uygulama yapıldı. 48 saat inkübasyon sonrası tripsin ile hücreler kaldırıldı. Ardından hücreler vorteks üzerinde buz soğukluğunda %70 etanol damlatılarak fikse edildi ve -20°C 'de saklandı. Analiz için, fikse edilen hücreler 4°C sıcaklıkta, $300 \times g$ ve 5 dakika santrifüj edildi. PBS ile yıkama aşamalarının ardından %0,1 Triton X-100 (500 μ L) eklendi. Daha sonra iki kez yıkama adımı yapıldı ve örnekler 100 μ L propidyum iyodür (PI) (50 μ g/mL) ve 400 μ L RNase A (100 μ g/mL) eklendi. Örnekler oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra FL3 filtresi ile 10.000 hücre üzerinden hücre akış sitometri cihazında analiz yapıldı.

3.9. APOPTOZ/NEKROZ ANALİZİ

Hücrelerde meydana gelen apoptotik ve nekrotik olayların belirlenmesi amacıyla, Annexin V-FITC/PI Apoptosis kit kullanıldı. İlk önce MDA-MB-231 hücre hattı 6 kuyucuklu plakalara 2×10^5 hücre /kuyucuk ekildi. Hücreler bir gün bekletilerek RA ester türevleri ile belirlenen doz aralıklarında uygulama yapıldı. 48 saat inkübasyon sonrası tripsin ile hücreler kaldırıldıktan sonra hücreler 4°C sıcaklıkta, $300 \times g$ ve 5 dakika santrifüj edildi. PBS ile yıkama adımı yapıldıktan sonra hücre süspansiyonu için her biri 5×10^5 hücre olacak şekilde 1,5 mL'lik tüplere ayrıldı. Hücreler 4°C sıcaklıkta, $300 \times g$ ve 5 dakika tekrar santrifüj edildi.

PBS ile yıkama adımı yapıldıktan sonra 500 μ L $1 \times$ Annexin V-FITC bağlanma tamponu eklendi. Her tüpe 2.5 μ L Annexin V-FITC ve PI eklendikten sonra kısa bir

vorteks yapılarak karanlık ortamda 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücre akış sitometri cihazında FL1 ve FL4 filtreleri kullanılarak 10.000 hücre üzerinden apoptotik ve nekrotik hücre hattın yüzdesi belirlendi.

3.10. FLORESAN MİKROSKOPU İLE HÜCRE ALIMI ANALİZİ

MDA-MB-231 hücre hattı 6 kuyucuklu plakalara 2×10^5 hücre/kuyucuk ekildi. Hücreler bir gün bekletilerek RA, RAME ve RAEE ile 90 μ M doz aralığında uygulama yapıldı. 48 saat inkübasyon sonrasında floresan mikroskobu ile görüntü alındı. Örnekler Leica Application Suite X programı ile FITC kanalında 450-490 dalga boyunda uyarılma ve 500-550 dalga boyunda emisyon ile ölçüm yapıldı.

3.11. KANTİTATİF GEN ANLATIM ANALİZİ

ÜNМК hücreleri RA, RAME ve RAEE ile muamele edildiğinde apoptoz ve EMT yolağı ile ilişkili genlerin (N-kaderin, Kaspaz 3, BCL-2, Slug) transkript düzeylerini ölçmek için gerçek-zamanlı PCR analizi yapıldı. Çalışmada kontrol ve test grubu olmak üzere 2 farklı grup kullanıldı. Test grubuna, MDA-MB-231 hücre hattı ile RA, RAME ve RAEE esterlerinin 90 μ M konsantrasyon doz uygulanırken, kontrol grubuna sadece besiyeri eklenerek aynı işlemler yapıldı.

3.11.1. Total RNA İzolasyonu

MDA-MB-231 hücre hatları, 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 2×10^5 hücre/kuyu olarak 2 mL hacimde ekildi. MDA-MB-231 hücreleri ekildikten bir gün sonra, RA, RAME ve RAEE ile 90 μ M konsantrasyoda 48 saat muamele edildi. İnkübasyon sonrası tripsin ile hücreler kaldırıldı. Santrifüj edilen hücrelerin süpernatantı üzerine 250 μ L PEG-Gold Trizol eklenip 50 μ L kloroform eklenerek pipetaj yapıldı. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyondan sonra, 4°C sıcaklıkta 12.000 \times g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstteki RNA fazı yeni bir eppendorf tüpe alınarak 250 μ L izopropanol alkol (soğuk) ile yıkama yapılarak. santrifüj edildi. Pellet %75 etanol (500 μ L) yıkanıp santrifüj işlemi tekrar edildi. Kurutulan pellet miktarına bağlı olarak 20-25 μ L RNaz içermeyen su eklendi. Örnekler kısa süreli saklama için -20°C'de (1-2 gün) uzun süreli saklama için de -80°C'de (1-2 yıl) muhafaza edildi.

3.11.2. RNA Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi

Nükleik asitlerin 260-280 nm dalga boyunda UV absorbansları alınarak konsantrasyon ve saflık değerleri ölçüldü. MDA-MB-231 hücre hatlarından izole edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları BioSpec-nano cihazı ile ölçüldü.

3.11.3. RNA Örneklerinden cDNA Sentezi

Trizol ile elde edilen RNA'lerden cDNA sentezi, OneScript Plus cDNA kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. cDNA sentezi için 250 µg RNA, 4 µl 5x RT buffer, 1 µl dNTP, 1 µl random primer ve 1 µl OneScript Plus RTase kullanıldı. 55°C'de 15 dakika inkübasyondan sonra cDNA'lar elde edildi. İnkübasyon sonrasında edilen cDNA'lar qPCR analizlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

3.11.4. Gerçek Zamanlı PCR

Hücrelerin N-kaderin, Slug, Bcl-2, Kaspaz 3 genlerinin kantitatif anlatımı üzerine etkileri belirlenmesi için gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanıldı. Gerçek-zamanlı PCR reaksiyon karışımına; cDNA (250 ng), her bir primerden 0.25 µM, 2x SYBR Green karışımından 5 µL (1 X) eklenerek nükleaz içermeyen su ile toplam hacim 10 µL'ye tamamlandı. 2X SYBR Green Real Time PCR Master Mix protokolü takip edildi. Kullanılan primerlerden 5' *ACATTAGAAGCTCACATGGGGAA* 3' ileri primer ve 5' *TGATCTGTCTGCAAAAGCCCT* 3' geri primer sekanslı Slug primeridir. N-kaderin primerinin 5' *TCAGGCGTCTGTAGAGGCTT* 3' ileri primer ve 5' *ATGCACATCCTTCGATAAGACTG* 3' geri sekansıdır. BCL-2 primerinin ise 5' *AGAGCAACCCAATGCCCGC* 3' ileri primer ve 5' *CAACGAGGGGCTGAGAGG* 3' geri primer sekansıdır. Kaspaz3 primerinin 5' *GGGAGCAAGTCAGTGGACTC* 3' ileri primeri ve 5' *CCGTACCAGAGCGAGATGAC* 3' geri sekansıdır. "Housekeeping" geni olarak kullanılan QuantiTect Primer Assays 18SRNA (Hs_RRN18S_1_SG) referans gen olarak kullanıldı.

PCR reaksiyonu ilk önce denatürasyon adımı için 94° C'de 10 dakikalık 1 döngü başlatıldı. Primerlerin ilgili bölgelere bağlanabilmesi için 95° C'de 15 saniye, 53-59° C'de 30 saniye ve 72° C'de 30 saniye olarak 35 döngü devam ettirildi. Her primerin farklı bağlanma sıcaklıkları olduğu için bu değerler çalışılan primere göre değiştirildi. En son adım olan soğutma aşamasında 72° C'de 5 dakika reaksiyon gerçekleştirildi. PCR

reaksiyonu sonrasında ısı 60° C'ye düşürölüp tekrar kademeli olarak 95° C'ye arttırılarak erime eğrisi analizi gerçekleştirildi. Gen ifade düzeyleri eşik döngüsü değerleri üzerinden hesaplandı. Sonuçlar 18SRNA 'housekeeping' genini anlatımına göre normalize edildi. Hedef genlerin bağıl ekspresyon seviyeleri delta delta CT ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

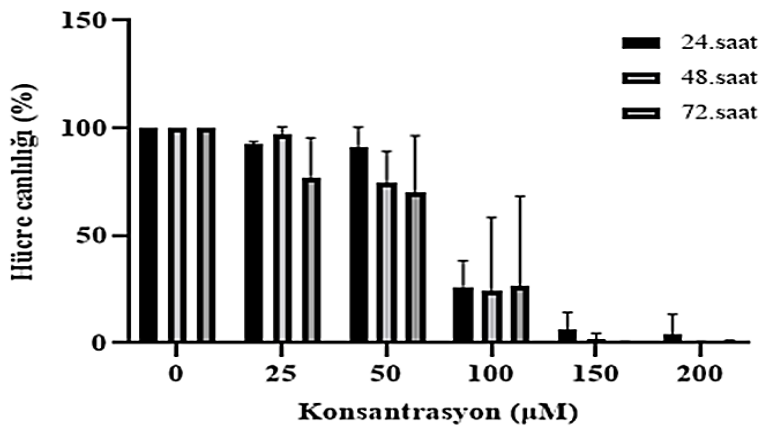


4. BULGULAR

4.1. HÜCRE CANLILIK DENEYİ SONUÇLARI

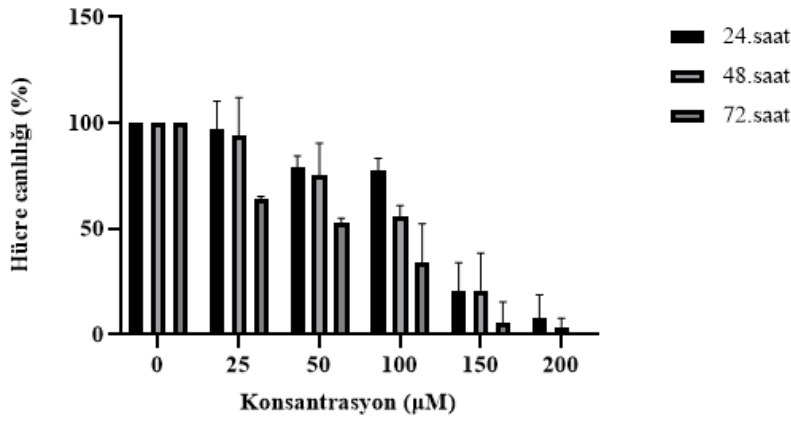
MCF-10A ve MDA-MB-231 hücre hattının 24, 48 ve 72 saat süresince 0, 25, 50, 100, 150 ve 200 μM artan dozlarda RA ve esterleriyle muamele edilmelerinin ardından, hücre canlılığı yüzdesindeki değişikliklerin incelenmesi ve IC_{50} değerlerinin hesaplanması amacıyla resazurin deneyi yapıldı. Hiç doz uygulaması yapılmamış olan hücreler kontrol grubu olarak %100 canlı kabul edilmiş ve farklı dozların uygulanması sonucu yüzde canlılık, kontrol grubu ile kıyaslanarak hesaplanmıştır. Resazurin analizi ile ortaya çıkan sonuçlardan çevrimiçi bir web sitesi kullanılarak IC_{50} hesaplanmıştır (127).

Şekil 4.1’de görüldüğü üzere MDA-MB-231 hücre hattında 25, 50, 100, 150 ve 200 μM artan konsantrasyonlarda 24 saat boyunca RA ile muamele edildiğinde kontrol grubuna göre sırasıyla yaklaşık %8, %9, %74, %94 ve %96 oranında hücre canlılığında azalma gözlemlendi. 48 saat boyunca RA ile muamele edildiğinde ise sırasıyla %3, %26, %76, %98 ve %99 oranında hücre canlılığında azalma olmuştur. 72 saat sonunda sonuçlar sırasıyla %23, %30, %74, %100 ve %100 oranında hücre canlılığında azalma görüldü.



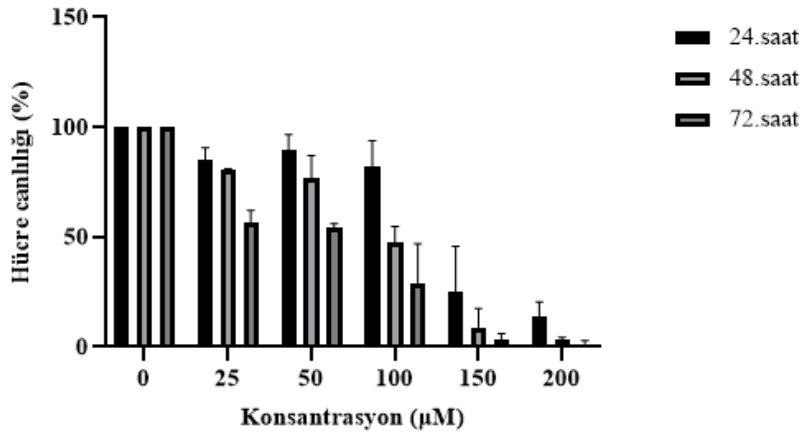
Şekil 4.1: MDA-MB-231 hücre hattında RA'nın hücre canlılığına etkisi

Şekil 4.2’de görüldüğü üzere MDA-MB-231 hücre hattı 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M ve 200 μ M 24 saat boyunca RAME ile muamele edildiğinde kontrol grubuna göre yaklaşık olarak %3, %21, %22, %80, %92 oranında hücre canlılığında azalma gözlemlendi. RAME ile 48 saat muamele sonrasında sırasıyla %6, %25, %44, %79 ve %97 oranında hücre canlılığında azalma olmuştur. 72 saat sonunda ise %36, %47, %66, %94 ve %100 oranında hücre canlılığında azalma görüldü.



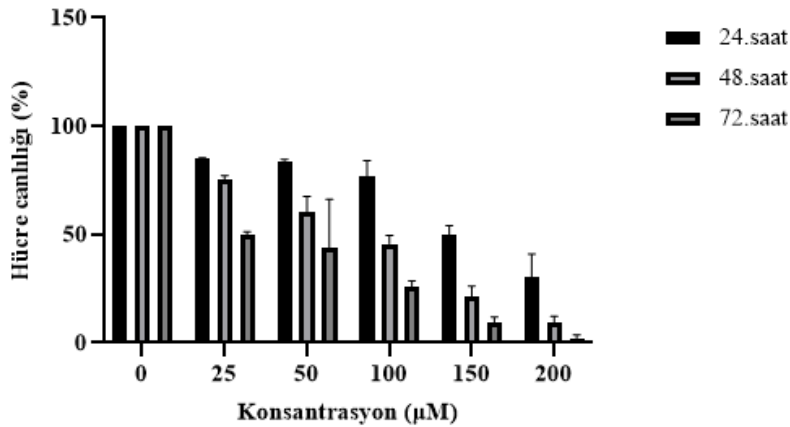
Şekil 4.2: MDA-MB-231 hücre hattında RAME'nin hücre canlılığına etkisi

Şekil 4.3'te görüldüğü üzere MDA-MB-231 hücre hattında 25, 50, 100, 150 ve 200 μ M artan konsantrasyonlarda 24 saat boyunca RAEE ile muamele edildiğinde kontrol grubuna göre sırasıyla yaklaşık %15, %10, %18, %75 ve %86 oranında hücre canlılığında azalma gözlemlendi. 48 saat boyunca RAEE ile muamele edildiğinde ise sırasıyla %19, %23, %52, %91 ve %97 oranında hücre canlılığında azalma olmuştur. 72 saat sonunda ise %44, %46, %71, %97 ve %99 oranında hücre canlılığında azalma görüldü.



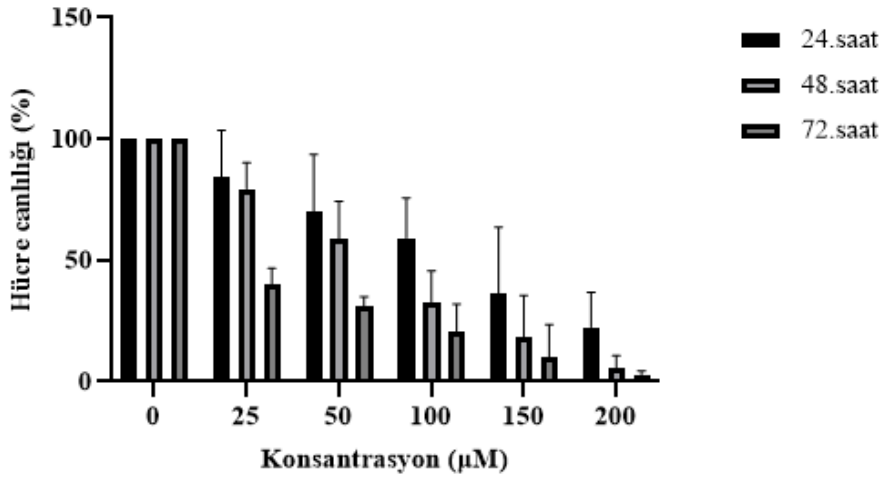
Şekil 4.3: MDA-MB-231 hücre hattında RAEE'nin hücre canlılığına etkisi

Şekil 4.4'te görüldüğü üzere MDA-MB-231 hücre hattı 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM ve 200 µM 24 saat boyunca RAPE ile muamele edildiğinde kontrol grubuna göre yaklaşık olarak %15, %16, %23, %50 ve %70 oranında hücre canlılığında azalma gözlemlendi. RAPE ile 48 saat muamele sonrasında sırasıyla %24, %39, %54, %79 ve %91 oranında hücre canlılığında azalma olmuştur. 72 saat sonunda ise %50, %56, %74, %91 ve %98 oranında hücre canlılığında azalma görüldü.



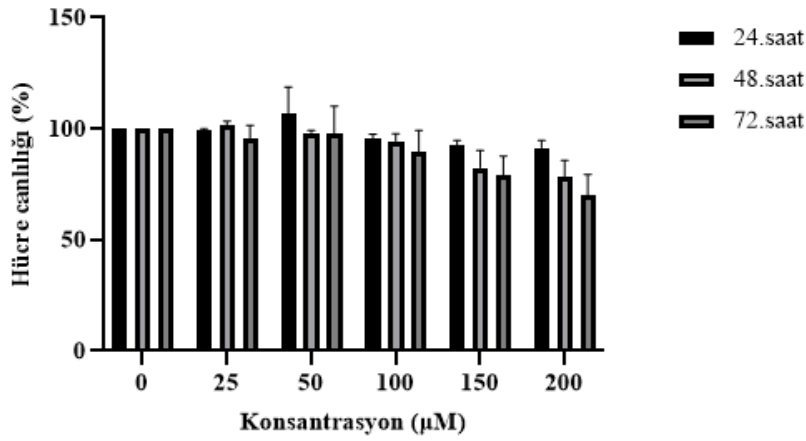
Şekil 4.4: MDA-MB-231 hücre hattında RAPE'nin hücre canlılığına etkisi

Şekil 4.5'te görüldüğü üzere MDA-MB-231 hücre hattı 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M ve 200 μ M 24 saat boyunca RABE ile muamele edildiğinde kontrol grubuna göre yaklaşık olarak %16, %30, %41, %64 ve %78 oranında hücre canlılığında azalma gözlemlendi. RABE ile 48 saat muamele sonrasında sırasıyla %21, %41, %67, %82 ve %94 oranında hücre canlılığında azalma olmuştur. 72 saat sonunda ise %60, %69, %79, %90 ve %97 oranında hücre canlılığında azalma görüldü.



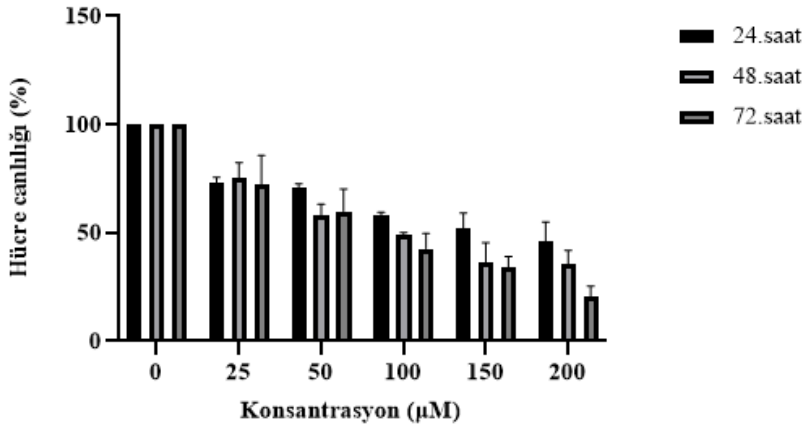
Şekil 4.5: MDA-MB-231 hücre hattında RABE'nin hücre canlılığına etkisi

Şekil 4.6'da görüldüğü üzere MCF-10A hücre hattı 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M ve 200 μ M 24 saat boyunca RA ile muamele edildiğinde kontrol grubuna göre yaklaşık olarak %1, %1, %4, %7 ve %9 oranında hücre canlılığında azalma gözlemlendi. RA ile 48 saat muamele sonrasında sırasıyla %1, %2, %6, %18 ve %22 oranında hücre canlılığında azalma olmuştur. 72 saat sonunda ise %5, %2, %10, %21 ve %30 oranında hücre canlılığında azalma görüldü.



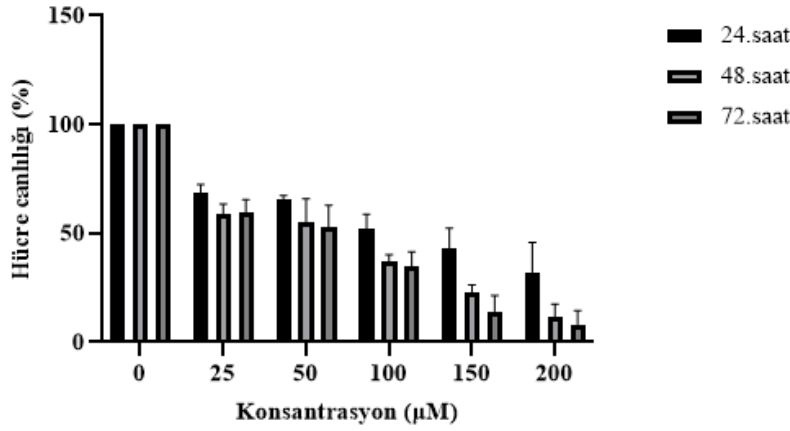
Şekil 4.6: MCF-10A hücre hattında RA'nın hücre canlılığına etkisi

Şekil 4.7'de görüldüğü üzere MCF-10A hücre hattı 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM ve 200 µM 24 saat boyunca RAME ile muamele edildiğinde kontrol grubuna göre yaklaşık olarak %27, %29, %42, %48 ve %54 oranında hücre canlılığında azalma gözlemlendi. RAME ile 48 saat muamele sonrasında sırasıyla %25, %42, %51, %64 ve %64 oranında hücre canlılığında azalma olmuştur. 72 saat sonunda ise %28, %40, %57, %66 ve %79 oranında hücre canlılığında azalma görüldü.



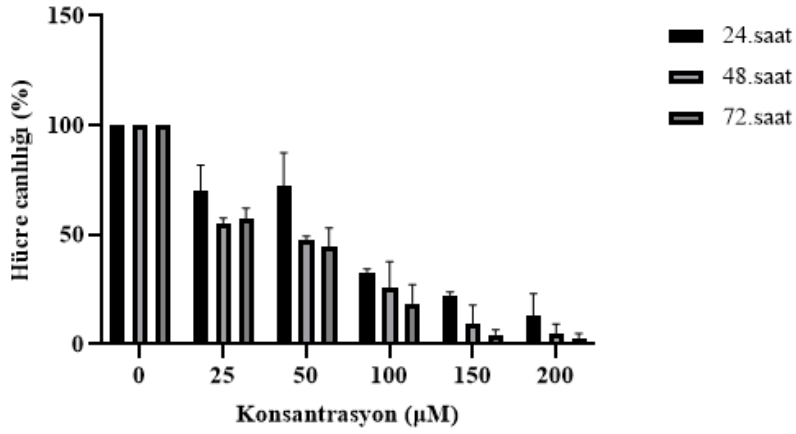
Şekil 4.7: MCF-10A hücre hattında RAME'nin hücre canlılığına etkisi

Şekil 4.8’de görüldüğü üzere MCF-10A hücre hattı 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM ve 200 µM 24 saat boyunca RAEE ile muamele edildiğinde kontrol grubuna göre yaklaşık olarak %31, %34, %48, %57 ve %68 oranında hücre canlılığında azalma gözlemlendi. RAEE ile 48 saat muamele sonrasında sırasıyla %41, %45, %63, %77 ve %88 oranında hücre canlılığında azalma olmuştur. 72 saat sonunda ise %41, %47, %65, %86 ve %92 oranında hücre canlılığında azalma görüldü.



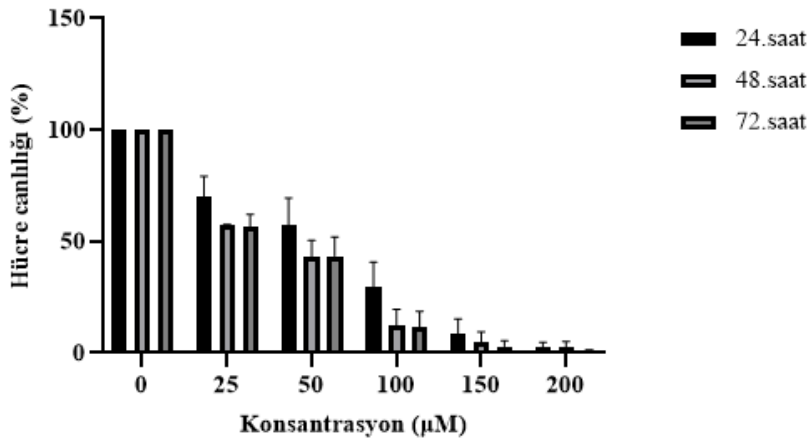
Şekil 4.8: MCF-10A hücre hattında RAEE’nin hücre canlılığına etkisi

Şekil 4.9’da görüldüğü üzere MCF-10A hücre hattı 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM ve 200 µM 24 saat boyunca RAPE ile muamele edildiğinde kontrol grubuna göre yaklaşık olarak %30, %28, %67, %78 ve %87 oranında hücre canlılığında azalma gözlemlendi. RAPE ile 48 saat muamele sonrasında sırasıyla %45, %52, %74, %91 ve %95 oranında hücre canlılığında azalma olmuştur. 72 saat sonunda ise %43, %56, %81, %96 ve %97 oranında hücre canlılığında azalma görüldü.



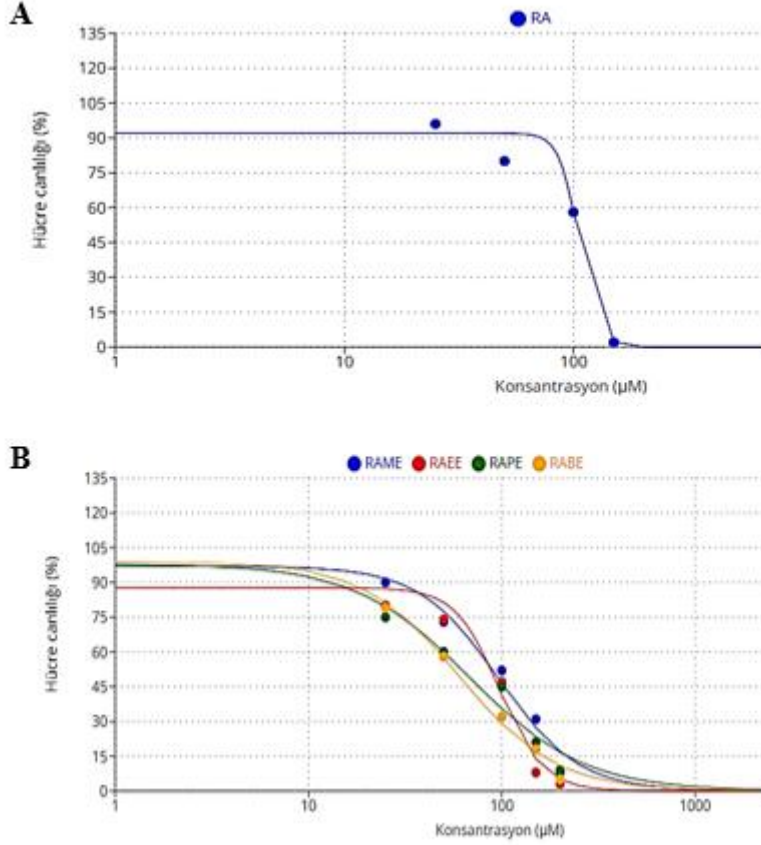
Şekil 4.9: MCF-10A hücre hattında RAPE'nin hücre canlılığına etkisi

Şekil 4.10'da görüldüğü üzere MCF-10A hücre hattı 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM ve 200 µM 24 saat boyunca RABE ile muamele edildiğinde kontrol grubuna göre yaklaşık olarak %30, %42, %70, %91 ve %98 oranında hücre canlılığında azalma gözlemlendi. RABE ile 48 saat muamele sonrasında sırasıyla %43, %57, %88, %95 ve %99 oranında hücre canlılığında azalma olmuştur. 72 saat sonunda ise %44, %57, %88, %97 ve %99 oranında hücre canlılığında azalma görüldü.



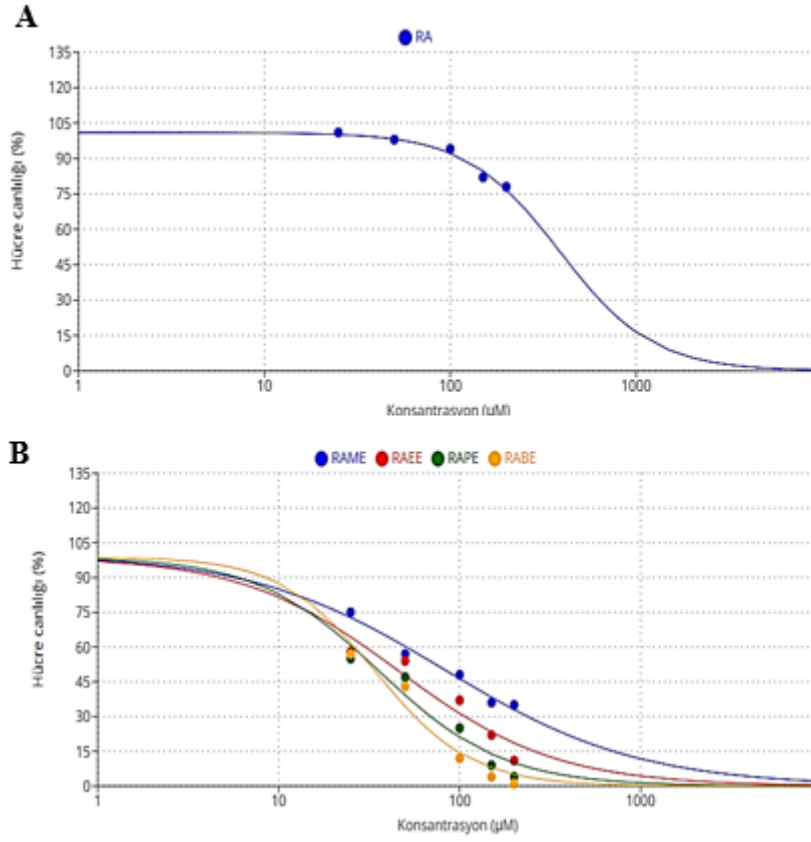
Şekil 4.10: MCF-10A hücre hattında RABE'nin hücre canlılığına etkisi

Şekil 4.11’de MDA-MB-231 hücre hattında (a) RA, (b) RAME, RAEE, RAPE, RABE 25, 50, 100, 150 ve 200 μM doz ile muamele sonrasındaki IC_{50} değerleri sırasıyla 105,3, 96,1, 96,9, 68 ve 60,2 μM ’dır.



Şekil 4.11: MDA-MB-231 hücre hattında RA ve esterlerin IC_{50} değerleri

Şekil 4.12’de görüldüğü üzere MCF-10A hücre hattında (a) RA, (b) RAME, RAEE, RAPE, RABE 25, 50, 100, 150 ve 200 μM doz ile muamele sonrasındaki IC_{50} değerleri sırasıyla 389; 82,8; 46,3; 36 ve 34 μM ’dır.



Şekil 4.12: MCF-10A hücre hattında RA ve esterleri IC₅₀ değerleri

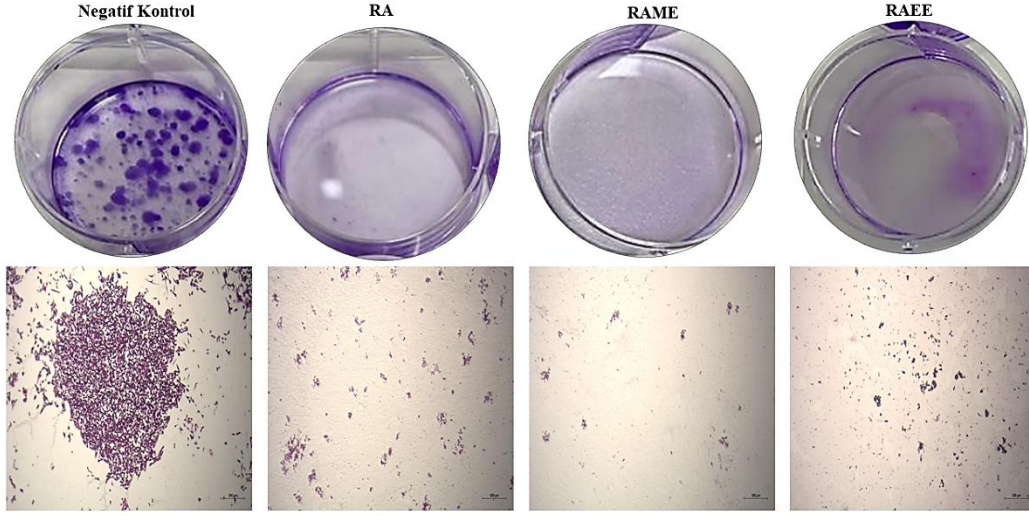
“Gereç ve Yöntem” kısmında Denklem 3.2’de belirtildiği üzere terapötik endeks sağlıklı meme hücresinin IC₅₀ değeri ile meme kanser hücresinin IC₅₀ değerine oranlayarak bulunmuştur. RA ve ester türevleri olan RAME, RAEE, RAPE ve RABE’nin Tablo 4.1’deki terapötik endeks hesaplamaları ışığında en yüksek terapötik endekse RA (3,7) ve RAME’nin (0,9) sahip olduğu belirlenmiştir. İlerleyen deneylerde, en üstün terapötik endekse sahip RA esteri olarak RAME belirlenmiş ve alkil zincirinin uzunluğunun artmasının etkilerini incelemek amacıyla RAEE seçilmiştir. Bu doğrultuda, çalışmalara RA, RAME ve RAEE bileşikleriyle devam edilmiştir. IC₅₀ değerlerinde RA, RAME ve RAEE değerlerinde ortak bir değer olan 90 µM konsantrasyonu kullanılmıştır.

Tablo 4.1: MCF-10A ve MDA-MB-231 hücre hattında IC₅₀ ve terapötik endeksleri

IC ₅₀ (µM)	MCF-10A	MDA-MB-231	Terapötik endeks
RA	389	105,3	3,7
RAME	82,8	96,1	0,9
RAEE	46,3	96,9	0,5
RAPE	36	68	0,5
RABE	34	60,2	0,6

4.2. MDA-MB-231 HÜCRE HATTINDA KOLONİ OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ

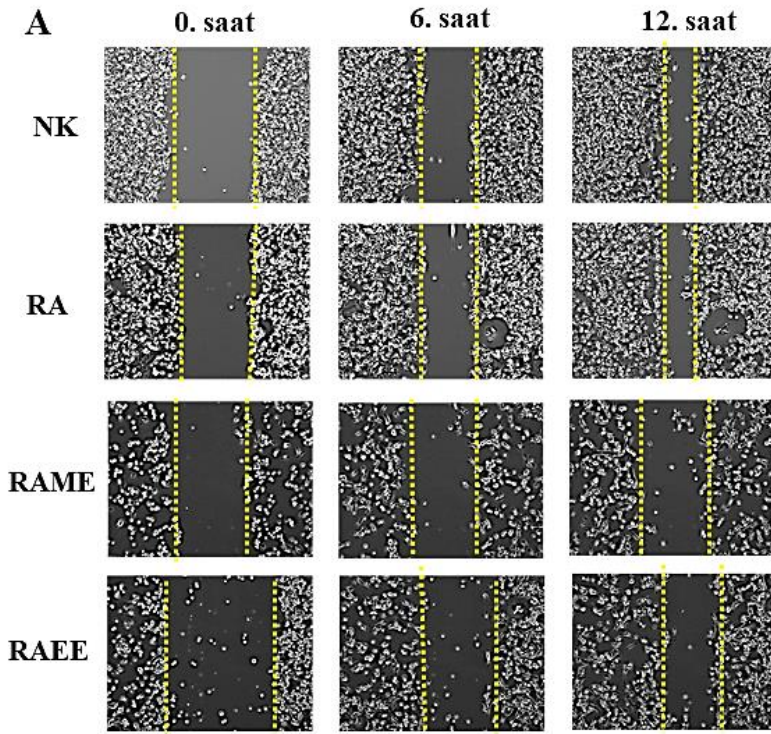
Negatif kontrol (NK), RA, RAME ve RAEE maddelerinin 90 µM konsantrasyon dozundan sonra MDA-MB-231 hücre hattındaki koloni oluşturma potansiyeline etkisini belirlemek amacı ile koloni formasyon deneyi gerçekleştirildi. Şekil 4.13'te görüldüğü üzere negatif kontrolde koloni oluşumu görülürken RA, RAME ve RAEE örneklerinde koloni oluşumu gerçekleşmemiştir. Kontrol grubuna göre RA ve türevlerinin MDA-MB-231 hücre hattında koloni oluşumunu baskılayıcı etkileri olduğu gözlemlendi.



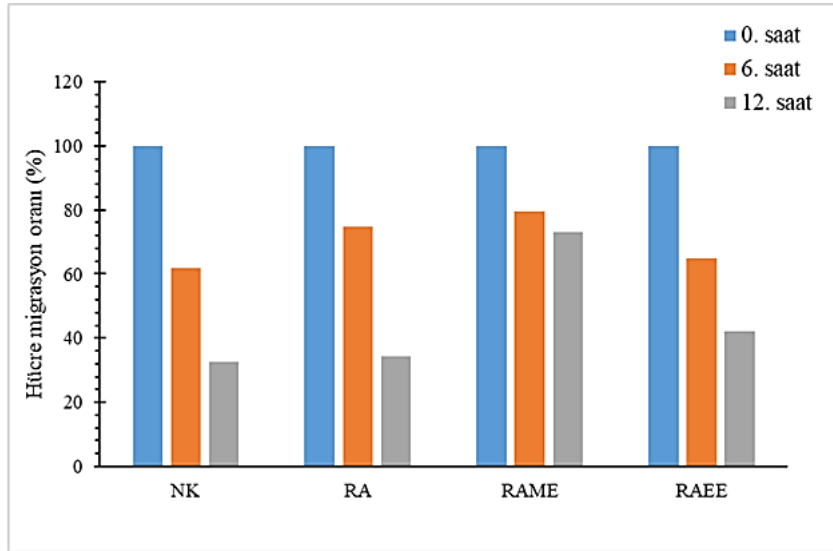
Şekil 4.13: Kolonilerin mikroskop görüntüleri

4.3. MDA-MB-231 HÜCRE HATTINDA YARA İYİLEŞMESİNE ETKİSİ

Tez kapsamında, MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde RA, RAME ve RAEE esterlerinin etkilerini incelemek amacıyla yara iyileşme deneyleri gerçekleştirildi. Şekil 4.14'te görüldüğü üzere sonuçlara göre 6. saatin sonunda yara kapanma yüzdeleri NK, RA, RAME ve RAEE'de sırasıyla %62, %75, %79 ve %65 bulundu. Yara kapanma yüzdeleri 12.saatin sonunda ise NK, RA, RAME ve RAEE örneklerinde sırasıyla %33, %34, %73, %42'dir. Yara kapanma alanları, "ImageJ" programında "wound healing tool" kullanılarak hesaplandı.



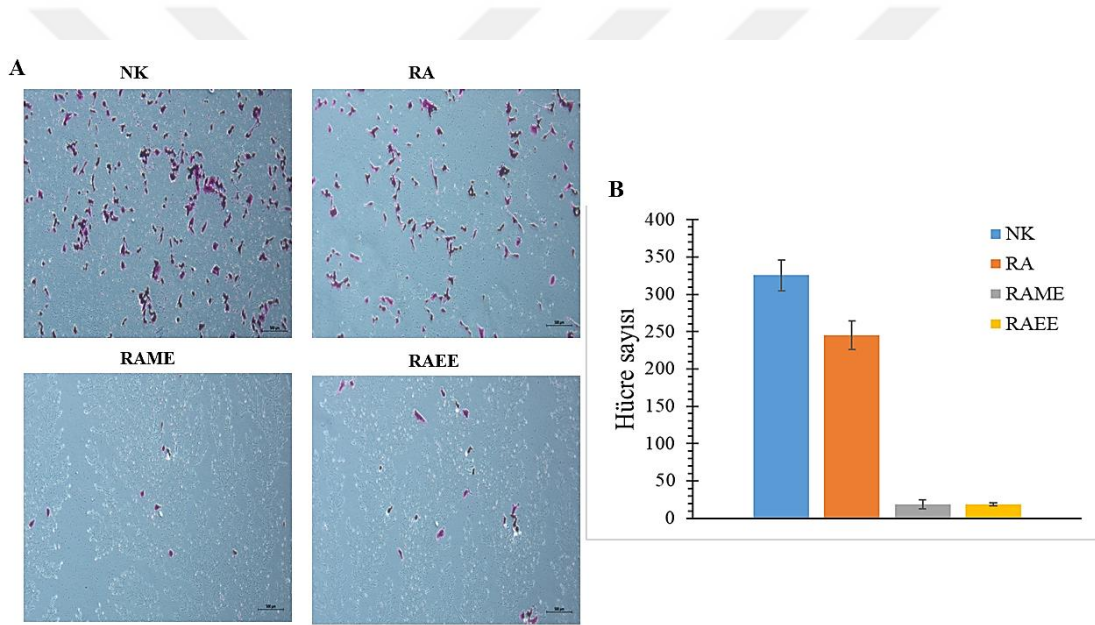
B



Şekil 4.14: MDA-MB-231 hücrelerin yara kapanma görüntüleri (A) ve grafiği (B)

4.4 MDA-MB-231 HÜCRE HATTINDA MİGRASYON YETENEKLERİ

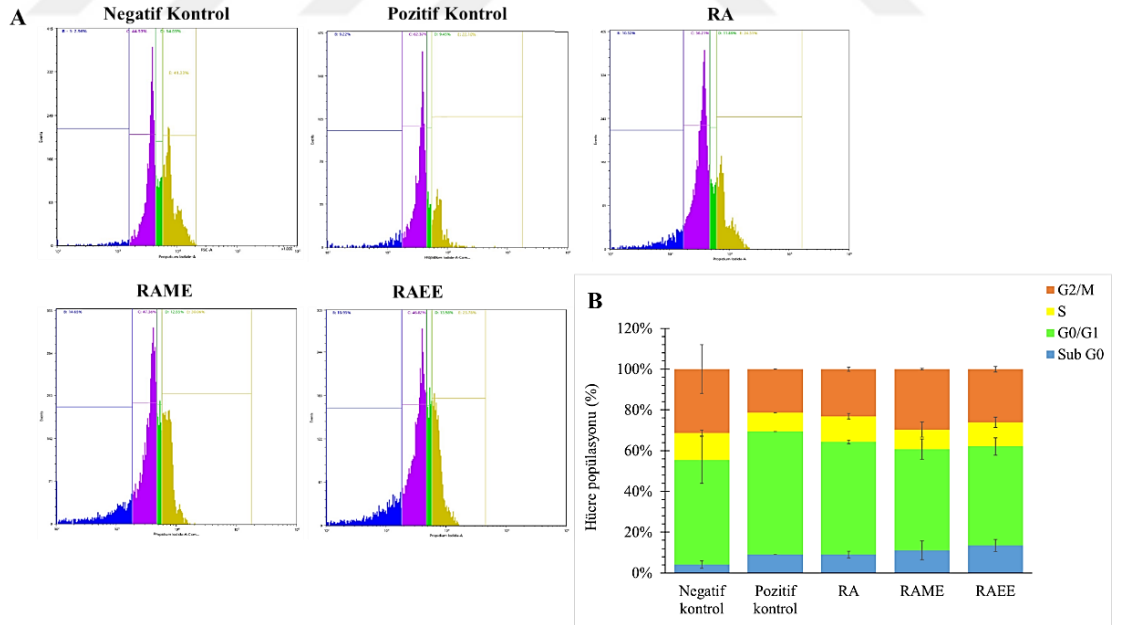
İstila deneyinin sonuçlarına göre, NK ve RA örneklerinde matrijelden geçmiş ve yoğun hücre migrasyonunun gözlemlendiği tespit edildi. Şekil 4.15'e göre hücre sayısı NK, RA, RAME ve RAEE örneklerinde sırasıyla sırasıyla 325 ±20,42, 245 ±19,15, 19 ± 6,02 ve 19 ± 1,52 hücre bulundu. Sonuçlar kontrol grubuna göre karşılaştırılınca yüzdelik olarak sırasıyla %100, %75, %6 ve %6 hücre invazyon oranı hesaplandı. Böylelikle matrijel-invazyon testi ile RA, RAME ve RAEE'nin MDA-MB-231 hücre hattında invazyonu azalttığı belirlenmiştir. Matrijelden geçen hücreler, "ImageJ" programı kullanılarak analiz edildi.



Şekil 4.15: Hücrelerin görüntüleri (A) ve toplam hücre sayısı grafiği (B)

4.5 MDA-MB-231 HÜCRE HATTINDA HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE ETKİSİ

RA, RAME ve RAEE esterlerinin MDA-MB-231 hücre hattındaki hücre döngüsü üzerine etkisi Propidyum iyodür (PI) boyama sonrası hücre akış sitometrisi ile incelenmiştir. NK olarak PI ile boyanan doz muamelesi yapılmayan hücreler kullanıldı. Pozitif kontrol (PK) olarak DMSO (%10) kullanıldı. Şekil 4.16'daki sonuçlara göre NK'de Sub-G₀ fazında %4,29 ± 1,88, G₀/G₁ fazında %53,35 ± 11,9, S fazında %13,85 ± 1,42 ve G₂/M fazında %32,51 ± 12,47 hücre bulundu. Pozitif kontrol grubunda döngü fazlarında sırasıyla %9,22, %62,37, %9,45 ve %22,10 oranında hücre gözlemlendi. RA örneğinde Sub-G₀ fazında %9,33 ± 1,68, G₀/G₁ fazında 56,86 ± 0,91, S fazında 12,86 ± 1,36 ve G₂/M fazında %23,79 ± 1,01 hücre bulundu. RAME örneğinde sırasıyla %11,31 ± 4,73, %50,97 ± 5,09, %9,89 ± 3,76 ve %30,38 ± 0,45 hücre görüldü. RAEE esterinde ise Sub-G₀ fazında %13,83 ± 2,99, G₀/G₁ fazında 49,94 ± 4,41, S fazında 12,17 ± 2,56 ve G₂/M fazında %26,78 ± 1,40 hücre gözlemlendi.

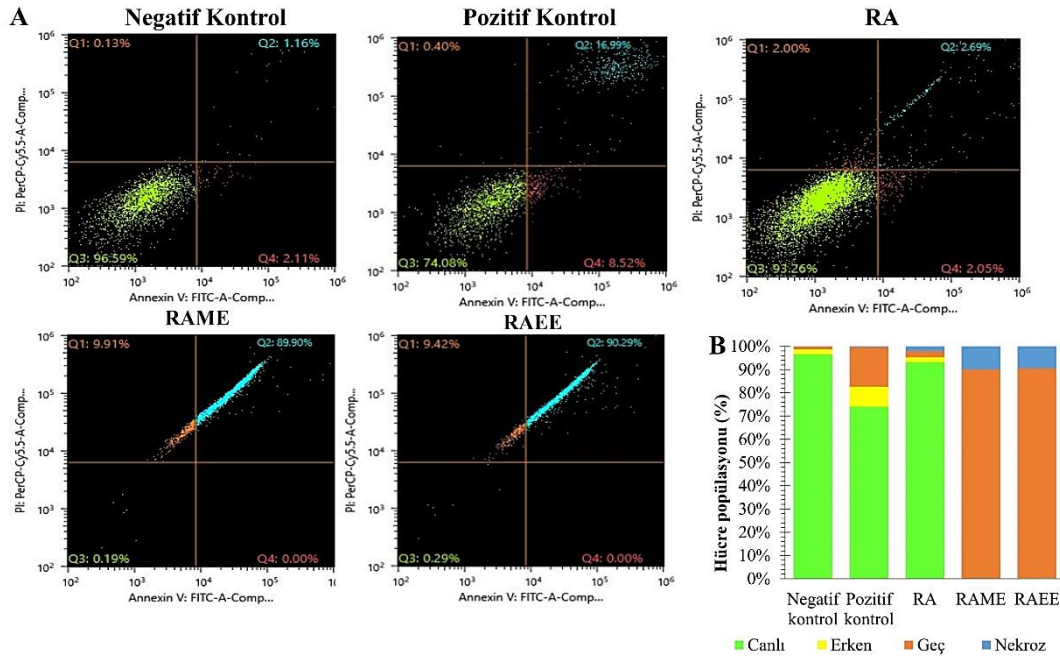


Şekil 4.16: MDA-MB-231 hücre hattında hücre döngüsü şekil (A) ve grafikleri (B)

4.6 MDA-MB-231 HÜCRE HATTINDA HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNE ETKİSİ

MDA-MB-231 hücre hattının akış sitometrisi sonuçlarına göre NK örneğinde canlı hücre %96,59, erken apoptoz hücre %2,11, geç apoptoz hücre %1,16 ve nekroza giden hücre %0,13 olarak elde edildi. Pozitif kontrolde (DMSO), canlı hücre %74,08, erken apoptoz %8,52, geç apoptoz %16,99 ve nekroz %0,40 oranında görüldü. Hücre hattın RA ile 48 saat muamele sonrasında ise canlı hücre %93,26, erken apoptoz %2,05, geç apoptoz %2,69 ve nekroz %0,40 oranında görüldü. RAME ile muamele sonrasında canlı hücre %0,19, erken apoptoz 0, geç apoptoz 89,90 ve nekroz %9,91 oranında elde edildi.

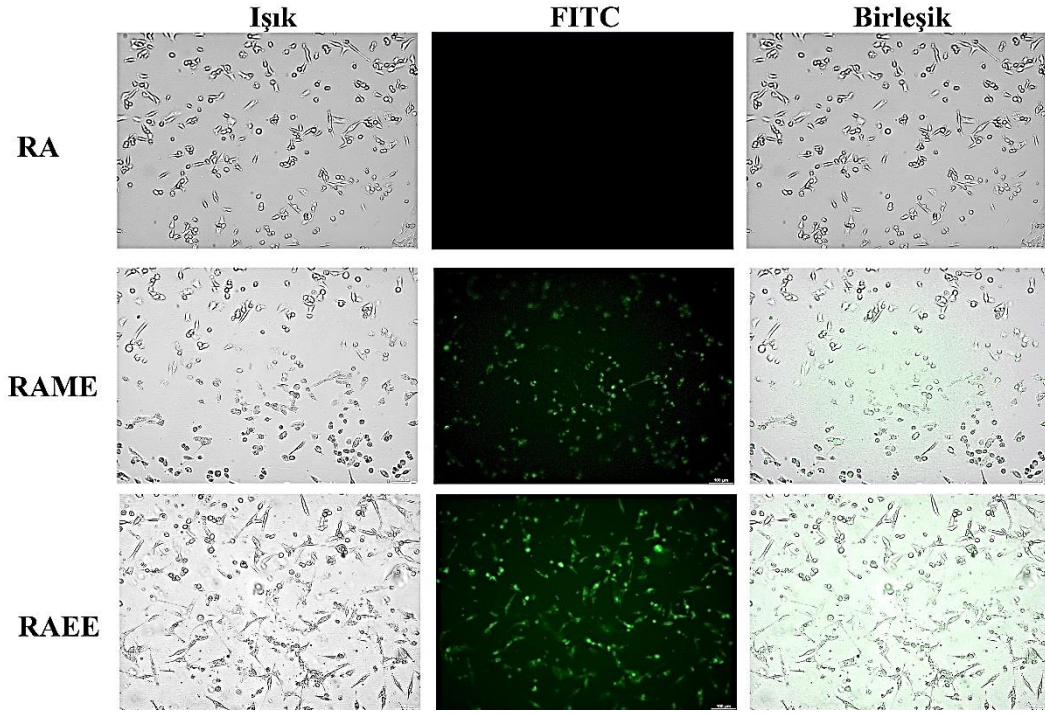
RAEE esterinde ise canlı hücre %0,29, erken apoptoz %0, geç apoptoz %90,29 ve nekroz %9,42 oranında gözlemlendi (Şekil 4.17). RAME ve RAEE ile muamele edilmiş MDA-MB-231 hücre hattında apoptotik hücre ölümü oranlarında sadece yüksek oranda geç apoptoz gözlemlendi. RA türevlerinde otofloresan ışımaya olasılığını değerlendirmek amacıyla floresan mikroskopta incelenme yapıldı.



Şekil 4.17: Hücre hattın apoptoz deney görüntüleri (A) ve grafikleri (B)

4.7 FLORESAN MİKROSKOBU İLE HÜCRE İÇİNE ALIM SONUÇLARI

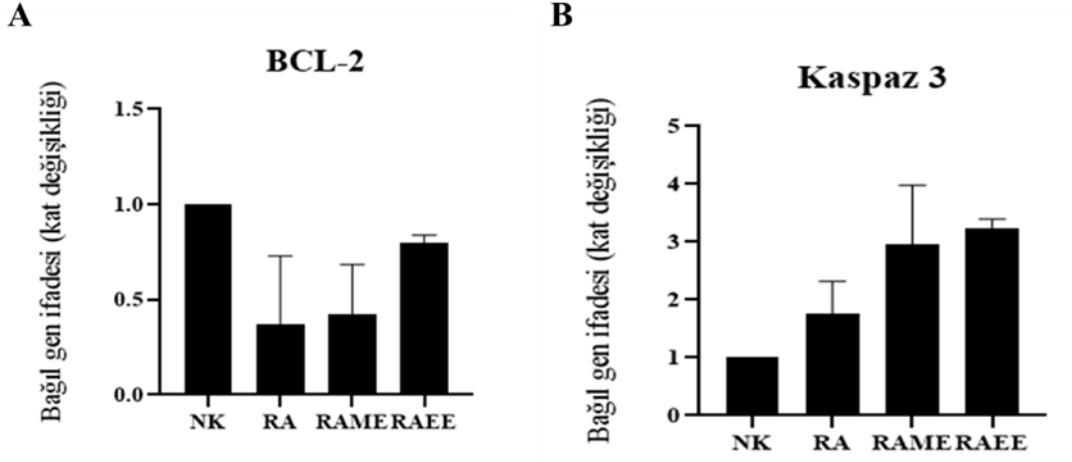
Floresan mikroskopu kullanılarak MDA-MB-231 hücre hattının incelenmesi sonucunda, RA ile muamele edildikten sonra FITC kanalında herhangi bir floresan ışımalarının gözlenmediği belirlendi. RAME ve RAEE örneklerinde ise FITC kanalında ışımaya görüntülendi (Şekil 4.18).



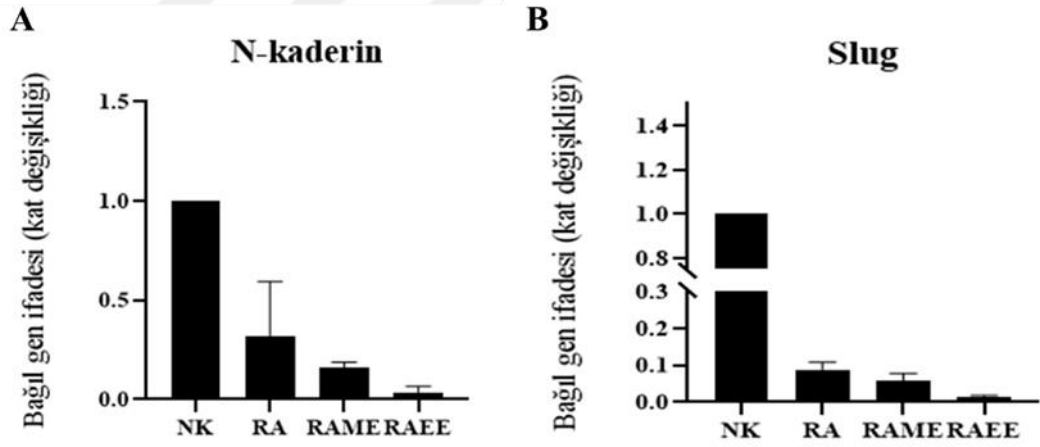
Şekil 4.18: MDA-MB-231 hücre hattının floresan mikroskopundaki görüntüleri

4.8. MDA-MB-231 HÜCRE HATTINDA APOPTOTİK GENLERDEKİ ETKİSİ

MDA-MB-231 hücre hattında, RA, RAME ve RAEE bileşikleriyle muamele sonrasında hem apoptoz hem de EMT yolağında etkili olan genlerin ifadeleri, qRT-PCR yöntemi kullanılarak detaylı bir şekilde incelenmiştir. BCL-2 geninin anlatım seviyesinde NK'ye göre RA, RAME, RAEE örneklerinde sırasıyla 0,37, 0,42 ve 0,80 kat azalma görülmüştür. MDA-MB-231 hücre hattında RA, RAME ve RAEE ile muamele sonrasında Kaspaz 3 geninin anlatım seviyesinde NK'ye göre RA, RAME, RAEE örneklerinde 1,75, 2,96 ve 3,25 kat artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19: MDA-MB-231 hücre hattında BCL-2 (A) ve Kaspaz 3 (B) gen anlatımı EMT yolağındaki belirteçlere bakıldığında ise N-kaderin geninde RA, RAME ve RAEE gruplarında sırasıyla 0,32, 0,16 ve 0,03 kat, Slug gen ifadesinde ise 0,09, 0,06 ve 0,01 kat azalma görülmüştür (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: MDA-MB-231 hücre hattında N-kaderin (A) ve Slug (B) gen anlatımı

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türüdür (110). Türkiye'de, her 100.000 vakada meme kanseri insidansı kadınlar arasında yaklaşık %40 oranındadır ve diğer kanser türlerinden daha yüksektir (111,112). Kemoterapi, meme kanseri tedavisinde sıkça kullanılan bir yöntemdir, ancak kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelere de zarar verebilir, bu nedenle tedavinin uygulanmasını sınırlayan önemli bir faktördür. Günümüzde, etkili meme kanseri tedavilerine rağmen, ilaca karşı direnç sıklıkla tedavinin ilk yılında ortaya çıkabilmektedir. Meme kanseri, diğer kanser türleri gibi heterojen bir hastalıktır, yani farklı alt tipleri vardır. Meme kanserinin moleküler sınıflandırması genellikle dört alt tipe gösterilir (113). Meme kanserinin bir alt tip olan ÜNMK, son derece agresif ve metastatik özellik gösterir. Yapılan bir çalışmaya (114) göre, ÜNMK vakalarının birçoğunda kemoterapiden sonra kötü bir sonuç gözlemlendi. ÜNMK'nin tedavi seçenekleri, ER, PR ve HER2 reseptörünün eksikliği nedeniyle sınırlıdır. ÜNMK'nin bu olumsuz özellikleri nedeniyle, yenilikçi tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan çalışmalarda, ÜNMK'nin taksan veya antrasiklin bazlı birincil kemoterapötik ajanlara iyi yanıt verebildiği, ancak yüksek bir nüks riski taşıdığı görülmüştür (114).

Çalışmamızda, meme kanserine karşı potansiyel tedavi seçeneklerini araştırmak amacıyla MCF-10A ve MDA-MB-231 hücre hatlarında RA ve türevlerinin anti-kanser etkilerini inceledik. Meme kanseri hücre hattının önemli bir alt tipi olan üçlü negatif meme kanseri üzerinde etkilerini değerlendirdik. Bu alt tip, reseptörlerin eksikliğinden kaynaklanan bir durum olduğu için tedavi edilmesi zorluğuyla bilinmektedir.

Fenolik bileşikler, yapıları sayesinde vücuda alındıklarında aktif bileşiklere dönüşebilirler ve hücre içinde enzimler ve diğer biyomoleküllerle etkileşime girebilme potansiyeline sahiptirler (92). Hidroksisinamik asit (HSA) türevleri, sebze, meyve, çekirdekler ve tahıllarda doğal olarak bulunan bu fenolik bileşiklere bir örnektir. HSA türevleri, suda çözünebilir moleküller oldukları için ağız yoluyla alındıklarında biyoyararlanımları oldukça etkili ve hızlıdır. Bitki kaynaklı HSA türevi bileşikler, sınırlı veya ihmal edilebilir yan etkileri olmalarının yanı sıra kanser hücrelerine karşı etkili oldukları gözlemlendi (92).

Hidroksisinamik asit türevleri arasında, hücre içine yüksek oranda alınabilen moleküller arasında yer alan RA, Lamiaceae familyasına ait bitkilerden elde edilebilir. RA, moleküler alım oranı yüksek olan bir bileşik olarak öne çıkar.

Hücre canlılık deneyleri sonucunda seçilen RA, RAME ve RAEE'nin MDA-MB-231 hücre hattının invazyon ve migrasyon yeteneklerini etkileyebileceği bulunmuştur. RA'nın, ÜNMK hücre hattında sitotoksik ve antiproliferatif etkiler gösterdiği literatüre göre de uyumlu bir sonuçtur (122). Yara iyileşme ve matrijel deneyleri, bu maddelerin hücrelerin hareketlilik ve invazyon yeteneklerini azaltabileceğini göstermiştir. Matrijel deneyinde, hücrelerin metastatik özelliklerini taklit eden bir ortamda davranışlarını incelememizi olanak sağlamıştır. NK grubunda, hücreler matrijel üzerinde kolaylıkla hareket ederken, RAME ve RAEE örneklerindeki hücrelerin matrijel içerisinde ilerleyemedikleri gözlenmiştir. Bu sonuçlar, RAME ve RAEE'nin potansiyel olarak meme kanseri tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmektedir.

MDA-MB-231 hücre hattında RAME ve RAEE esterlerinin 90 µM konsantrasyonunda uygulandığında, geç apoptoza giden hücre hattın yoğun olduğu gözlemlendi. Hücre hattın RA ile 48 saat muamele sonrasında ise en fazla canlı hücre yüzdeliği görülürken RAME ve RAEE ile muamele sonrası çoğunlukla geç apoptoz gözlemlendi.

Annexin V deneyinde de hücreler hem Annexin V hem de PI boyası ile boyanır. Annexin V, hücre zarında bulunan fosfatidilserinin apoptotik hücrelerdeki artan miktarını ölçmek için kullanılırken, PI boyası apoptotik hücrelerdeki DNA hasarını tespit etmek için kullanılır (125). Ancak, PI boyası aynı zamanda canlı hücrelerde de DNA'ya bağlanabilir ve bu da yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir. Bu nedenle, PI boyası ile boyanmış hücrelerdeki floresans sinyali, kompanzasyon yoluyla düzenlenir. Kompanzasyon yapmak için, öncelikle tekli boyalı kontrol örnekleri hazırlandı. Bu örneklerde, hücreler yalnızca Annexin V veya yalnızca PI boyası ile boyandı. Bu örneklerde, boyaların verdiği floresans sinyalleri ayarlanarak, her boyanın hangi dalga boylarında sinyal verdiği belirlendi. RA örneğinde canlı hücreler yoğunlukta iken RAME ve RAEE örneklerinde hücreler çapraz bir şekilde yukarıya yönde yani geç apoptoz yönüne kaydılar. Deney tekrarlandığında yine aynı sonuç elde edildi. Daha sonra RAME ve RAEE esterlerinin deneyde kullanılan boyalar ile bir etkileşime girip girmediği merak edildi. Bunun için floresan mikroskopunda hücreler boyalı bir şekilde olmadan

bakıldığında esterlerin FITC kanalında ışığa yaptıkları görüldü. RA ile aynı işlemler yapıldığında bir ışığa saptanmadı. Buradan sonuç olarak RA esterlerinin (RAME, RAEE) hücre içine girdiklerinde metabolize edilerek ortama ışığa yaydıkları düşünüldü. Yapılan bir çalışmada RA'nın hücre içine giremediğini ve RA esterlerinin lipofilik özellikte olduğundan kolayca hücre içine alımından bahsedilmektedir (108). Başka bir çalışmada ise RA alkil zincirinin uzatılması ile elde edilen esterlerin antioksidan aktivesini değiştirdiği ve hücre membranından geçme yetenekleri ile bir ilişkisi olduğu bulunmuştur (126).

Benzer şekilde, RA'nın hücre proliferasyonunu engelleme, hücre döngüsünü durdurma ve çeşitli kanser hücrelerinde kaspaz bağımsız apoptoz indüklenme yeteneğini içeren birçok *in vitro* çalışma bulunmaktadır (115,116). Yapılan bir çalışmada MDA-MB-468 hücrelerinde RA'nın hücre döngüsünü S evresinde durdurduğunu, apoptozu indüklediğini ve proliferasyonu azalttığı fakat MDA-MB-231 hücrelerinde bileşiğin temel olarak G₀/G₁ hücre döngüsü durdurması indüklendi ve MDA-MB-468 hücrelerine kıyasla daha zayıf bir apoptotik etkisi gözlemlendi bulunmuştur (96). Bunun üzerine yaptığımız çalışmamızda Sub-G₀ fazında RA, RAME ve RAEE örneklerinde sırasıyla 3,5, 5 ve 5,3 kat artış gözlenmiştir. Sub-G₀ deki artış apoptozu tetikleyebildiğini ifade edilir (117). G₀ sonuçlarına bakıldığında RA ve türevlerinin ÜNMK hücre hattında RA türevi ile muamele edilmemiş hücreler ile karşılaştırıldığında artış gözlemlenmiş olması apoptozu tetikleyebildiğini ifade eder. Ayrıca RA, RAME ve RAEE örneklerinde NK grubuna kıyaslandığında hücre döngüsünün G₂/M fazında düşüş gözlemlenmiştir.

Gen seviyesindeki değişiklikleri anlamak için yapılan gerçek-zamanlı PCR deneylerinde, EMT ve apoptoz süreçlerindeki gen düzenlemeleri incelenmiştir. EMT, kanser hücrelerinin normal özelliklerinden uzaklaşarak daha invaziv ve hareket yetenekleri artmış mezenkimal hücrelere dönüşmesi anlamına gelir. Bu, kanser hücrelerinin metastaz yeteneklerini artırabilir, bağışıklık sisteminden kaçmasına ve tedaviye direnç geliştirmesine yol açabilir. EMT'nin temel mekanizmaları hücreler arası sinyal yolları aracılığıyla düzenlenir ve kanser hücrelerinin yapısını, davranışını ve işlevlerini değiştirir. Bu süreç, kanser araştırmalarında önemli bir konudur, çünkü metastaz ve tedaviye direnç gibi kritik kanser özelliklerini etkileyebilir (118).

RA'nın tümör oluşumunu ve gelişimini etkili bir şekilde baskıladığı bildirilmiştir. Bir çalışmada, kolorektal kanser hücre hattında RA, EMT yolağını düzenleyerek ve

Matris Metaloproteinaz-2 (MMP2) ve MMP9'un ifadesini durdurarak metastazı engellemiştir (71). RA tedavisi, BAX, BCL-2, Kaspaz-3 ve poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP1) gen ifadesini düzenleyerek hücre hayatta kalmasını durdurmuş ve prostat kanseri hücre hatlarının apoptozunu tetiklemiştir (119). Yaptığımız çalışmanın sonuçlarında da apoptoz yolağında BCL-2 gen anlatım seviyesi azalırken, Kaspaz 3 seviyesi artmıştır. EMT yolağında ise N-kaderin ve Slug genlerinde azalma gözlenmiştir.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, doğal kaynaklı olması ve toksik olmayan yapısı nedeniyle RA, umut vaat eden bir ilaç adayı potansiyeline sahiptir. RA'nın ester türevlerini oluşturarak hücre içi etki mekanizmasını daha da geliştirmek mümkündür. Çalışma, kanser hücre hattındaki EMT mekanizmalarını ve hücre ölümü üzerindeki etkilerini moleküler düzeyde anlamak için önemli veriler sunmaktadır. Hücre göçü ve istilasının incelenmesi, apoptotik yolların gen düzeyinde değerlendirilmesi ve epitelyal-mezenkimal geçişin gen düzeyinde belirlenmesi, bu süreçlerin kapsamlı bir şekilde aydınlatılmasını amaçlamaktadır. Böylece, ÜNМК tedavisinde umut vaat eden en az bir RA türevi adayının *in vitro* çalışmalarda ortaya çıkmış olması, ileri aşama çalışmalarda patentlenebilir bir ilaç molekülü olarak kullanılmasının önünü açmaktadır. Bu bulgular doğrultusunda, RA türevlerinin ÜNМК tedavisi için potansiyel terapötik uygulamalarını araştırmak için ileri düzeyde araştırma ve geliştirmeye devam edilmesi önerilir. Hayvan modelleri ve klinik çalışmaları içeren ilave *in vivo* çalışmalar, bu bileşiklerin etkinliğini ve güvenilirliğini doğrulamak amacıyla yapılmalıdır. RA türevlerinde görülen ışına sebebiyle, hücresel apoptoz durumunu belirlemek için annexin-V yerine TUNEL yöntemi ve kaspaz 3/7 aktivasyonu gibi diğer apoptoz tespit yöntemleri kullanılabilir. RA türevlerinin ÜNМК tedavisinde kullanılabilecek ilaç molekülü olarak hedefe yönelik şekilde tasarlanabilir. Hayvan modelleri ve klinik çalışmalarıyla desteklenen *in vivo* çalışmalar, bu türevlerin etkinlik ve güvenilirliklerini doğrulamak için yapılabilir. ÜNМК hücre hattında moleküler mekanizmaları, apoptoz ve EMT ile ilişkili gen ifadeleri üzerinden daha detaylı bir şekilde incelenebilir. RA türevleri ile ÜNМК hücre hattında ilaç direnci üzerine çalışılabilir.

KAYNAKLAR

1. Karpozilos, A., & Pavlidis, N. (2004). The treatment of cancer in Greek antiquity. *European Journal of Cancer*, 40(14). <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.04.036>
2. Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Vinals, F., & Capella, G. (2009). Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*, 16(1). <https://doi.org/10.2174/138161210789941847>
3. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer Review Douglas. *Cell*, 100(7).
4. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
5. All cancers. (2020). <https://gco.iarc.fr/today>
6. Turkey. (n.d.).
7. Murray, C. J. L., & Lopez, A. D. (1997). Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 349(9061). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)07493-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)07493-4)
8. Breast cancer. (n.d.). Retrieved April 30, 2023, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
9. ÖZEN EROĞLU, G., YAYLIM, İ., GEZER, U., & KURUCA, S. (2023). Meme Kanserinde PD-1/PD-L1 Hedefli Tedaviler. *Istanbul Yeni Yuzyil Universitesi, Yeni Yuzyil Journal of Medical Sciences*. <https://doi.org/10.46629/JMS.2023.117>
10. KARAALİ, C., ESİN, H., PALA, E. E., & İLHAN, E. (2023). Okult Meme Kanserinde Neoadjuvan Kemoterapi: Bir Olgu Sunumu. *İzmir Tıp Fakültesi Dergisi*. <https://doi.org/10.57221/izmirtip.1212817>
11. Yalcintas Arslan, U., & Oksuzoglu, B. (2019). Current Treatment Options and New Developments in Metastatic Breast Cancer. *Acta Oncologica Turcica*, 52(2), 336–347. <https://doi.org/10.5505/aot.2019.99266>
12. İnan, U., & Çeliksöz, A. H. (2019). Meme kanseri kemik metastazlarının tanı ve tedavisi. *TOTBID Dergisi*, 18(6). <https://doi.org/10.14292/totbid.dergisi.2019.73>
13. Hammond, M. E. H., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S., Fitzgibbons, P. L., Francis, G., Goldstein, N. S., Hayes, M., Hicks, D. G., Lester, S., Love, R., Mangu, P. B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C. K., Paik, S., Perlmutter, J., ... Wolff, A. C. (2010). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(16), 2784–2795. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.6529>
14. Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., & McGuire, W. L. (1987). Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/ neu Oncogene. *Science*, 235(4785), 177–182. <https://doi.org/10.1126/science.3798106>
15. JORDAN, V. C., COLLINS, M. M., ROWSBY, L., & PRESTWICH, G. (1977). A MONOHYDROXYLATED METABOLITE OF TAMOXIFEN WITH POTENT ANTIOESTROGENIC ACTIVITY. *Journal of Endocrinology*, 75(2), 305–316. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0750305>
16. Allison, K. H., Hammond, M. E. H., Dowsett, M., McKernin, S. E., Carey, L. A., Fitzgibbons, P. L., Hayes, D. F., Lakhani, S. R., Chavez-MacGregor, M., Perlmutter, J., Perou, C. M., Regan, M. M., Rimm, D. L., Symmans, W. F., Torlakovic, E. E., Varella, L., Viale, G., Weisberg, T. F., McShane, L. M., & Wolff, A. C. (2020). Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Update. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 144(5), 545–563. <https://doi.org/10.5858/arpa.2019-0904-SA>
17. Van Asten, K., Slembrouck, L., Olbrecht, S., Jongen, L., Brouckaert, O., Wildiers, H., Floris, G., Van Limbergen, E., Weltens, C., Smeets, A., Paridaens, R., Giobbie-Hurder, A., Regan, M. M., Viale, G., Thürlimann, B., Vergote, I., Christodoulou, E., Van Calster, B., & Neven, P. (2019). Prognostic Value of the Progesterone Receptor by Subtype in Patients with Estrogen Receptor-Positive, HER-2 Negative Breast Cancer. *The Oncologist*, 24(2), 165–171. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0176>

18. Chen, J.-Q., & Russo, J. (2009). ER α -negative and triple negative breast cancer: Molecular features and potential therapeutic approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1796(2), 162–175. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.06.003>
19. DOKCU, Ş., ÇAPARLAR, M. A., ÇETİNDAG, Ö., HAKSEVEN, M., & EROĞLU, A. (2022). Menopoz durumunun moleküler meme kanseri alt tipleri ile ilişkisi. *Phoenix Medical Journal*. <https://doi.org/10.38175/phnx.1059347>
20. Carey, L. A. (2010). Through a Glass Darkly: Advances in Understanding Breast Cancer Biology, 2000–2010. *Clinical Breast Cancer*, 10(3), 188–195. <https://doi.org/10.3816/CBC.2010.n.026>
21. Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M. A., Tse, C. K., Edmiston, S., Deming, S. L., Geradts, J., Cheang, M. C. U., Nielsen, T. O., Moorman, P. G., Earp, H. S., & Millikan, R. C. (2006). Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 295(21), 2492. <https://doi.org/10.1001/jama.295.21.2492>
22. Goldhirsch, A., Wood, W. C., Coates, A. S., Gelber, R. D., Thürlimann, B., & Senn, H.-J. (2011). Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology*, 22(8), 1736–1747. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr304>
23. Prat, A., & Perou, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*, 5(1), 5–23. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.11.003>
24. Sotiriou, C., & Pusztai, L. (2009). Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 360(8), 790–800. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0801289>
25. Swain, S. M., Shastry, M., & Hamilton, E. (2023). Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 22, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00579-0>
26. Yarden, Y. (2001). Biology of HER2 and Its Importance in Breast Cancer. *Oncology*, 61(Suppl. 2), 1–13. <https://doi.org/10.1159/000055396>
27. Badve, S., Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Baehner, F. L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S. R., Palacios, J., Rakha, E. A., Richardson, A. L., Schmitt, F. C., Tan, P.-H., Tse, G. M., Weigelt, B., Ellis, I. O., & Reis-Filho, J. S. (2011). Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology*, 24(2), 157–167. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.200>
28. Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslén, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
29. Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A.-L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19), 10869–10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>
30. Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2750–2767. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>
31. Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., & Ellis, I. O. (2008). Basal-Like Breast Cancer: A Critical Review. *Journal of Clinical Oncology*, 26(15), 2568–2581. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.1748>
32. Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., & Narod, S. A. (2007). Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13(15), 4429–4434. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
33. Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(20), 1938–1948. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>

34. Neven, P., Brouckaert, Wildiers, & Floris. (2012). Update on triple-negative breast cancer: prognosis and management strategies. *International Journal of Women's Health*, 511. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S18541>
35. Gluz, O., Liedtke, C., Gottschalk, N., Pusztai, L., Nitz, U., & Harbeck, N. (2009). Triple-negative breast cancer—current status and future directions. *Annals of Oncology*, 20(12), 1913–1927. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp492>
36. Sharma, P. (2016). Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist*, 21(9), 1050–1062. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0067>
37. Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., & Narod, S. A. (2007). Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13(15), 4429–4434. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
38. Isakoff, S. J., Mayer, E. L., He, L., Traina, T. A., Carey, L. A., Krag, K. J., Rugo, H. S., Liu, M. C., Stearns, V., Come, S. E., Timms, K. M., Hartman, A.-R., Borger, D. R., Finkelstein, D. M., Garber, J. E., Ryan, P. D., Winer, E. P., Goss, P. E., & Ellisen, L. W. (2015). TBCRC009: A Multicenter Phase II Clinical Trial of Platinum Monotherapy With Biomarker Assessment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33(17), 1902–1909. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.6660>
39. Jafarian, A. H., Kooshki forooshani, M., Farzad, F., & Mohamadian Roshan, N. (2019). The Relationship Between Fibroblastic Growth Factor Receptor-1 (FGFR1) Gene Amplification in Triple Negative Breast Carcinomas and Clinicopathological Prognostic Factors. *Iranian Journal of Pathology*, 14(4), 299–304. <https://doi.org/10.30699/IJP.2019.96713.1952>
40. Loi, S., Haibe-Kains, B., Majjaj, S., Lallemand, F., Durbecq, V., Larsimont, D., Gonzalez-Angulo, A. M., Pusztai, L., Symmans, W. F., Bardelli, A., Ellis, P., Tutt, A. N. J., Gillett, C. E., Hennessy, B. T., Mills, G. B., Phillips, W. A., Piccart, M. J., Speed, T. P., McArthur, G. A., & Sotiriou, C. (2010). PIK3CA mutations associated with gene signature of low mTORC1 signaling and better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(22), 10208–10213. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907011107>
41. Gucalp, A., Traina, T. A., Eisner, J. R., Parker, J. S., Selitsky, S. R., Park, B. H., Elias, A. D., Baskin-Bey, E. S., & Cardoso, F. (2019). Male breast cancer: a disease distinct from female breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 173(1), 37–48. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4921-9>
42. Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A., & Weinberg, R. A. (2018). EMT in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(2), 128–134. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.118>
43. Guo, F., Parker Kerrigan, B. C., Yang, D., Hu, L., Shmulevich, I., Sood, A. K., Xue, F., & Zhang, W. (2014). Post-transcriptional regulatory network of epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions. *Journal of Hematology & Oncology*, 7(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-7-19>
44. Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
45. Wheelock, M. J., & Johnson, K. R. (2003). Cadherins as Modulators of Cellular Phenotype. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19(1), 207–235. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.011102.111135>
46. Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Developmental Cell*, 14(6), 818–829. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.05.009>
47. Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(2), 69–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
48. Książkiewicz, M., Markiewicz, A., & Żaczek, A. J. (2012). Epithelial-Mesenchymal Transition: A Hallmark in Metastasis Formation Linking Circulating Tumor Cells and Cancer Stem Cells. *Pathobiology*, 79(4), 195–208. <https://doi.org/10.1159/000337106>
49. Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>

50. Buyuk, B., Jin, S., & Ye, K. (2022). Epithelial-to-Mesenchymal Transition Signaling Pathways Responsible for Breast Cancer Metastasis. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s12195-021-00694-9>
51. Rocchetti, M. T., Bellanti, F., Zadorozhna, M., Fiocco, D., & Mangieri, D. (2023). Multi-Faceted Role of Luteolin in Cancer Metastasis: EMT, Angiogenesis, ECM Degradation and Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8824. <https://doi.org/10.3390/ijms24108824>
52. Huang, R. Y.-J., Wong, M. K., Tan, T. Z., Kuay, K. T., Ng, A. H. C., Chung, V. Y., Chu, Y.-S., Matsumura, N., Lai, H.-C., Lee, Y. F., Sim, W.-J., Chai, C., Pietschmann, E., Mori, S., Low, J. J. H., Choolani, M., & Thiery, J. P. (2013). An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell Death & Disease*, 4(11), e915–e915. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.442>
53. Vasilaki, D., Bakopoulou, A., Tsouknidas, A., Johnstone, E., & Michalakis, K. (2021). Biophysical interactions between components of the tumor microenvironment promote metastasis. *Biophysical Reviews*, 13(3), 339–357. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00811-y>
54. Dewi, C., Fristiohady, A., Amalia, R., Khairul Ikram, N. K., Ibrahim, S., & Muchtaridi, M. (2022). Signaling Pathways and Natural Compounds in Triple-Negative Breast Cancer Cell Line. *Molecules*, 27(12), 3661. <https://doi.org/10.3390/molecules27123661>
55. Shashni, B., Nishikawa, Y., & Nagasaki, Y. (2021). Management of tumor growth and angiogenesis in triple-negative breast cancer by using redox nanoparticles. *Biomaterials*, 269. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120645>
56. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
57. Scatena, R. (2012). Mitochondria and cancer: A growing role in apoptosis, Cancer cell metabolism and dedifferentiation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 942. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_13
58. Xia, Y., Shen, S., & Verma, I. M. (2014). NF- κ B, an Active Player in Human Cancers. *Cancer Immunology Research*, 2(9), 823–830. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0112>
59. Jiang, W., Wang, X., Zhang, C., Xue, L., & Yang, L. (2020). Expression and clinical significance of MAPK and EGFR in triple-negative breast cancer. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11274>
60. Lee, K.-L., Kuo, Y.-C., Ho, Y.-S., & Huang, Y.-H. (2019). Triple-Negative Breast Cancer: Current Understanding and Future Therapeutic Breakthrough Targeting Cancer Stemness. *Cancers*, 11(9), 1334. <https://doi.org/10.3390/cancers11091334>
61. BİLDİK, A., & BAYAR, İ. (2018). Inhibition of Apoptotic Pathways in Cancer. *Turkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 9(2), 42–51. <https://doi.org/10.5336/vetsci.2018-62141>
62. Sporikova, Z., Koudelakova, V., Trojanec, R., & Hajduch, M. (2018). Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, 18(5), e841–e850. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.07.023>
63. Olivier, M., Langerød, A., Carrieri, P., Bergh, J., Klaar, S., Eyfjord, J., Theillet, C., Rodriguez, C., Lidereau, R., Bièche, I., Varley, J., Bignon, Y., Uhrhammer, N., Winqvist, R., Jukkola-Vuorinen, A., Niederacher, D., Kato, S., Ishioka, C., Hainaut, P., & Bjørresen-Dale, A.-L. (2006). The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 12(4), 1157–1167. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1029>
64. Nolan, J., Nedosekin, D. A., Galanzha, E. I., & Zharov, V. P. (2019). Detection of Apoptotic Circulating Tumor Cells Using in vivo Fluorescence Flow Cytometry. *Cytometry Part A*, 95(6), 664–671. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23642>
65. Alexandrou, S., George, S., Ormandy, C., Lim, E., Oakes, S., & Caldon, C. (2019). The Proliferative and Apoptotic Landscape of Basal-like Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 667. <https://doi.org/10.3390/ijms20030667>
66. Martínez-Arribas, F., Alvarez, T., Del Val, G., Martín-Garabato, E., Núñez-Villar, M.-J., Lucas, R., Sánchez, J., Tejerina, A., & Schneider, J. (2007). Bcl-2 expression in breast cancer: a comparative study at the mRNA and protein level. *Anticancer Research*, 27(1A), 219–222.

- 67.** Abdelhafez, A. H., Musall, B. C., Adrada, B. E., Hess, Kenneth R., Son, J. B., Hwang, K.-P., Candelaria, R. P., Santiago, L., Whitman, G. J., Le-Petross, H. T., Moseley, T. W., Arribas, E., Lane, D. L., Scoggins, M. E., Leung, J. W. T., Mahmoud, H. S., White, J. B., Ravenberg, E. E., Litton, J. K., ... Rauch, G. M. (2021). Tumor necrosis by pretreatment breast MRI: association with neoadjuvant systemic therapy (NAST) response in triple-negative breast cancer (TNBC). *Breast Cancer Research and Treatment*, 185(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05917-7>
- 68.** Tan, D. S. P., Marchió, C., Jones, R. L., Savage, K., Smith, I. E., Dowsett, M., & Reis-Filho, J. S. (2008). Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 111(1), 27–44. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9756-8>
- 69.** Pu, S., Zhou, Y., Xie, P., Gao, X., Liu, Y., Ren, Y., He, J., & Hao, N. (2022). Identification of necroptosis-related subtypes and prognosis model in triple negative breast cancer. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.964118>
- 70.** Ryter, S. W., Cloonan, S. M., & Choi, A. M. K. (2013). Autophagy: A critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Molecules and Cells*, 36(1), 7–16. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0140-8>
- 71.** Han, Y.-H., Kee, J.-Y., & Hong, S.-H. (2018). Rosmarinic Acid Activates AMPK to Inhibit Metastasis of Colorectal Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00068>
- 72.** Barnum, K. J., & O'Connell, M. J. (2014). Cell Cycle Regulation by Checkpoints (pp. 29–40). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2
- 73.** Harvey, L., Arnold, B., S Lawrence, Z., Pau, I M., David, B., & James, D. (2000). Molecular Cell Biology. 4th edition. In *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.08.001>
- 74.** Fassel, A., Geng, Y., & Sicinski, P. (2022). CDK4 and CDK6 kinases: From basic science to cancer therapy. *Science*, 375(6577). <https://doi.org/10.1126/science.abc1495>
- 75.** Diehl, J. A. (2002). Cycling to cancer with cyclin D1. In *Cancer Biology and Therapy* (Vol. 1, Issue 3). <https://doi.org/10.4161/cbt.72>
- 76.** Finn, R. S., Dering, J., Conklin, D., Kalous, O., Cohen, D. J., Desai, A. J., Ginther, C., Atefi, M., Chen, I., Fowst, C., Los, G., & Slamon, D. J. (2009). PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Research*, 11(5), R77. <https://doi.org/10.1186/bcr2419>
- 77.** Lin, S., Chang, C., Hsu, C., Tsai, M., Cheng, H., Leong, M. K., Sung, P., Chen, J., & Weng, C. (2020). Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. *British Journal of Pharmacology*, 177(6), 1409–1423. <https://doi.org/10.1111/bph.14816>
- 78.** Balunas, M. J., & Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78(5), 431–441. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.012>
- 79.** Ranjan, A., Ramachandran, S., Gupta, N., Kaushik, I., Wright, S., Srivastava, S., Das, H., Srivastava, S., Prasad, S., & Srivastava, S. K. (2019). Role of Phytochemicals in Cancer Prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 4981. <https://doi.org/10.3390/ijms20204981>
- 80.** Huang, X., Yang, Z., Xie, Q., Zhang, Z., Zhang, H., & Ma, J. (2019). Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 117, 109142. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109142>
- 81.** Prasad, S., & Tyagi, A. K. (2015). Ginger and Its Constituents: Role in Prevention and Treatment of Gastrointestinal Cancer. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/142979>
- 82.** Baena Ruiz, R., & Salinas Hernández, P. (2016). Cancer chemoprevention by dietary phytochemicals: Epidemiological evidence. *Maturitas*, 94, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.08.004>
- 83.** Batra, P., & Sharma, A. K. (2013). Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech*, 3(6), 439–459. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0117-5>
- 84.** Surh, Y.-J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 768–780. <https://doi.org/10.1038/nrc1189>
- 85.** Rowinsky, E. K., & Donehower, R. C. (1995). Paclitaxel (Taxol). *New England Journal of Medicine*, 332(15), 1004–1014. <https://doi.org/10.1056/NEJM199504133321507>

- 86.** Saltz, L. B., Cox, J. V., Blanke, C., Rosen, L. S., Fehrenbacher, L., Moore, M. J., Maroun, J. A., Ackland, S. P., Locker, P. K., Pirotta, N., Elfring, G. L., & Miller, L. L. (2000). Irinotecan plus Fluorouracil and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 343(13), 905–914. <https://doi.org/10.1056/NEJM200009283431302>
- 87.** Knight, C. B., Elwood, P. C., & Chabner, B. A. (1989). Future directions for antifolate drug development. *Advances in Enzyme Regulation*, 29, 3–12. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(89\)90090-3](https://doi.org/10.1016/0065-2571(89)90090-3)
- 88.** KLUZA, J., ARIMONDO, P. B., DAVID-CORDONNIER, M.-H., & BAILLY, C. (2008). Camptothecins for drug design, cancer cell death and gene targeting. In *Cancer Drug Design and Discovery* (pp. 173–197). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012369448-5.50011-2>
- 89.** Andrade, J. M., Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, C. P., & Rijo, P. (2018). *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Science OA*, 4(4), FSO283. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0124>
- 90.** Perry, N. S. L., Houghton, P. J., Sampson, J., Theobald, A. E., Hart, S., Lis-Balchin, M., Hoult, J. R. S., Evans, P., Jenner, P., Milligan, S., & Perry, E. K. (2010). In-vitro activity of *S. lavandulaefolia* (Spanish sage) relevant to treatment of Alzheimer’s disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(10), 1347–1356. <https://doi.org/10.1211/0022357011777846>
- 91.** Sayorwan, W., Siripornpanich, V., Piriyaapunyaporn, T., Hongratanaworakit, T., Kotchabhakdi, N., & Ruangrunsi, N. (2012). The effects of lavender oil inhalation on emotional states, autonomic nervous system, and brain electrical activity. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet Thangphaet*, 95(4), 598–606.
- 92.** Alam, M. A., Subhan, N., Hossain, H., Hossain, M., Reza, H. M., Rahman, M. M., & Ullah, M. O. (2016). Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutrition & Metabolism*, 13(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0080-3>
- 93.** Noor, S., Mohammad, T., Rub, M. A., Raza, A., Azum, N., Yadav, D. K., Hassan, M. I., & Asiri, A. M. (2022). Biomedical features and therapeutic potential of rosmarinic acid. *Archives of Pharmacal Research*, 45(4), 205–228. <https://doi.org/10.1007/s12272-022-01378-2>
- 94.** Messeha, S. S., Zarmouh, N. O., Asiri, A., & Soliman, K. F. A. (2020). Rosmarinic acid-induced apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 885, 173419. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173419>
- 95.** Shen, L., O’Shea, J. M., Kaadige, M. R., Cunha, S., Wilde, B. R., Cohen, A. L., Welm, A. L., & Ayer, D. E. (2015). Metabolic reprogramming in triple-negative breast cancer through Myc suppression of TXNIP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(17), 5425–5430. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501555112>
- 96.** Messeha, S. S., Zarmouh, N. O., Asiri, A., & Soliman, K. F. A. (2020). Rosmarinic acid-induced apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 885, 173419. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173419>
- 97.** Allegra, A., Tonacci, A., Pioggia, G., Musolino, C., & Gangemi, S. (2020). Anticancer Activity of *Rosmarinus officinalis* L.: Mechanisms of Action and Therapeutic Potentials. *Nutrients*, 12(6), 1739. <https://doi.org/10.3390/nu12061739>
- 98.** Ijaz, S., Iqbal, J., Abbasi, B. A., Ullah, Z., Yaseen, T., Kanwal, S., Mahmood, T., Sydykbayeva, S., Ydyrys, A., Almarhoon, Z. M., Sharifi-Rad, J., Hano, C., Calina, D., & Cho, W. C. (2023). Rosmarinic acid and its derivatives: Current insights on anticancer potential and other biomedical applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 162, 114687. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114687>
- 99.** Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Farag, M. R., Gopi, M., Karthik, K., Malik, Y. S., & Dhama, K. (2017). Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits. *Animal Health Research Reviews*, 18(2), 167–176. <https://doi.org/10.1017/S1466252317000081>
- 100.** Marchev, A. S., Vasileva, L. V., Amirova, K. M., Savova, M. S., Koycheva, I. K., Balcheva-Sivenova, Z. P., Vasileva, S. M., & Georgiev, M. I. (2021). Rosmarinic acid - From bench to valuable applications in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 117, 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.015>
- 101.** Zhu, F., Wang, J., Takano, H., Xu, Z., Nishiwaki, H., Yonekura, L., Yang, R., & Tamura, H. (2019). Rosmarinic acid and its ester derivatives for enhancing antibacterial, α -glucosidase inhibitory, and lipid accumulation suppression activities. *Journal of Food Biochemistry*, 43(2), e12719. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12719>

- 102.** Samy, C. R. A., Karunanithi, K., Sheshadhri, J., Rengarajan, M., Srinivasan, P., & Cherian, P. (2023). (R)-(+)-Rosmarinic Acid as an Inhibitor of Herpes and Dengue Virus Replication: an In Silico Assessment. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 33(3), 543–550. <https://doi.org/10.1007/s43450-023-00381-y>
- 103.** Ngo, Y. L., Lau, C. H., & Chua, L. S. (2018). Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 687–700. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.064>
- 104.** Liu, R., Heiss, E. H., Waltenberger, B., Blažević, T., Schachner, D., Jiang, B., Krystof, V., Liu, W., Schwaiger, S., Peña-Rodríguez, L. M., Breuss, J. M., Stuppner, H., Dirsch, V. M., & Atanasov, A. G. (2018). Constituents of Mediterranean Spices Counteracting Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation: Identification and Characterization of Rosmarinic Acid Methyl Ester as a Novel Inhibitor. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(7), 1700860. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700860>
- 105.** Pohl, S.-G., Brook, N., Agostino, M., Arfuso, F., Kumar, A. P., & Dharmarajan, A. (2017). Wnt signaling in triple-negative breast cancer. *Oncogenesis*, 6(4), e310–e310. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.14>
- 106.** Zhu, K., Wu, Y., He, P., Fan, Y., Zhong, X., Zheng, H., & Luo, T. (2022). PI3K/AKT/mTOR-Targeted Therapy for Breast Cancer. *Cells*, 11(16), 2508. <https://doi.org/10.3390/cells11162508>
- 107.** Li, J., Zhang, X., Zhang, Z., Zheng, L., Jindal, S., & Liu, Y. (2019). Association of p53 expression with poor prognosis in patients with triple-negative breast invasive ductal carcinoma. *Medicine*, 98(18), e15449. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000015449>
- 108.** Gerogianni, P. S., Chatziathanasiadou, M. V., Diamantis, D. A., Tzakos, A. G., & Galaris, D. (2018). Lipophilic ester and amide derivatives of rosmarinic acid protect cells against H₂O₂-induced DNA damage and apoptosis: The potential role of intracellular accumulation and labile iron chelation. *Redox Biology*, 15, 548–556. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.014>
- 109.** Cha, M. C., Lin, A., & Meckling, K. A. (2005). Low dose docosahexaenoic acid protects normal colonic epithelial cells from araC toxicity. *BMC Pharmacology*, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-5-7>
- 110.** Bray, M.-A., Singh, S., Han, H., Davis, C. T., Borgeson, B., Hartland, C., Kost-Alimova, M., Gustafsdottir, S. M., Gibson, C. C., & Carpenter, A. E. (2016). Cell Painting, a high-content image-based assay for morphological profiling using multiplexed fluorescent dyes. *Nature Protocols*, 11(9), 1757–1774. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.105>
- 111.** Secginli, S., Nahcivan, N. O., Gunes, G., & Fernandez, R. (2017). Interventions Promoting Breast Cancer Screening Among Turkish Women With Global Implications: A Systematic Review. *Worldviews on Evidence-Based Nursing*, 14(4), 316–323. <https://doi.org/10.1111/wvn.12245>
- 112.** Tari Selçuk, K., Avcı, D., Yılmaz Dünder, G., & Mercan, Y. (2020). Breast Cancer Screening Behaviors in Women Aged 40 Years and Over in a Semi-Urban Region in Turkey: Relationships with Health Beliefs. *Healthcare*, 8(2), 171. <https://doi.org/10.3390/healthcare8020171>
- 113.** Brenton, J. D., Carey, L. A., Ahmed, A. A., & Caldas, C. (2005). Molecular Classification and Molecular Forecasting of Breast Cancer: Ready for Clinical Application? *Journal of Clinical Oncology*, 23(29), 7350–7360. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.3845>
- 114.** Anders, C. K., & Carey, L. A. (2009). Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, 9, S73–S81. <https://doi.org/10.3816/CBC.2009.s.008>
- 115.** Li, H., Zhuang, H. L., Lin, J. J., Zhang, Y. F., Huang, H., Luo, T., Yu, W. T., & Ni, F. (2018). Effect of rosmarinic acid from *Sarcandra glabra* in inhibiting proliferation and migration and inducing apoptosis of MDA-MB-231 cells via regulation of expressions of Bcl-2 and Bax. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 43(16).
- 116.** Jang, Y.-G., Hwang, K.-A., & Choi, K.-C. (2018). Rosmarinic Acid, a Component of Rosemary Tea, Induced the Cell Cycle Arrest and Apoptosis through Modulation of HDAC2 Expression in Prostate Cancer Cell Lines. *Nutrients*, 10(11), 1784. <https://doi.org/10.3390/nu10111784>
- 117.** Drogosz-Stachowicz, J., Długosz-Pokorska, A., Gach-Janczak, K., Jaskulska, A., Janecki, T., & Janecka, A. (2020). Molecular mechanisms of apoptosis induced by a novel synthetic quinolinone derivative in HL-60 human leukemia cells. *Chemico-Biological Interactions*, 320, 109005. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109005>

- 118.** Roche, J. (2018). The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancers*, 10(2), 52. <https://doi.org/10.3390/cancers10020052>
- 119.** Jang, A.-H., Kim, T.-H., Kim, G.-D., Kim, J. E., Kim, H. J., Kim, S. S., Jin, Y.-H., Park, Y. S., & Park, C.-S. (2011). Rosmarinic acid attenuates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *International Immunopharmacology*, 11(9), 1271–1277. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.04.007>



