



Bu sayfa, Yüksek Bilim Kurulu'nun Web Sitesinde bulunan dosya olarak indirilmiştir.
Bu belge, sadece birtakım beyanlar için örnek olarak aynı şekilde uygun olarak kullanılabilir.
Bu belge, anadokümanına ait bilgileri korumak için CEKEMER İÇİNDEKİLERİ, KİMLİK ve İZİNLERİyle "CEKEMER" ve "CEKEMER" dosyasında "CEKEMER" kaldırmıştır.
Bu belge, CEKEMER kurumu tarafından kılde olarak CEKEMER olacaktır.

**MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
LİRAGLUTİD'İN APOPTOZ ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Naile Nisa ERGÜVEN

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. İbrahim TEKEDERELİ**

Yüksek Lisans Tezi – 2023

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

**MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA LİRAGLUTİD'İN,
APOPTOZ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Naile Nisa ERGÜVEN

**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. İbrahim TEKEDERELİ**

Bu araştırma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL2021-2684 no'lu Yüksek Lisans Projesi ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2023**

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak Prof. Dr. İbrahim TEKEDERELİ danışmanlığında hazırlayıp sunduğum Meme Kanseri Hücre Hatlarında Liraglutid'in Apoptoz Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

21/08/2023

Öğrencinin; Naile Nisa ERGÜVEN

İmza



Canım Annem'e

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi.....	4
2.3. Meme Kanseri Etiyolojisi.....	4
2.4. Meme Kanserinde Kullanılan İlaçlar.....	6
2.4.1. Endokrin Tedavisi.....	7
2.4.2. Cerrahi Tedavi.....	8
2.4.3. İmmünoterapi.....	8
2.4.4. Hedefe Yönelik Tedavi.....	9
2.4.5. Radyoterapi.....	9
2.5. Kanser ve Diyabet.....	10
2.5.1. Meme Kanseri ve Diyabet.....	12
2.5.2. Diyabette Kullanılan İlaçların Meme Kanseriyle İlişkisi.....	13
2.6. Glukagon benzeri peptid-1	14
2.6.1. Liraglutid	15
2.7.Hipotez	17
3. MATERYAL VE METOT	18
3.1. Materyaller	18
3.1.1. Cihazlar	18
3.2.Metotlar	19

3.2.1. Hücre Kültürü	19
3.2.2. Hücrelerin Çözülmesi	20
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması	20
3.2.4. Hücrelerin Dondurulması	21
3.2.5. Hücrelerin Sayılması	21
3.2.6. Hücre Lizatı Elde Edilmesi	22
3.2.8. Western Blot Analizi	23
3.2.9. Annexin V Boyaması ile Apoptozun Belirlenmesi	24
3.2.10. Hücre Proliferasyon Testi- MTS	24
3.2.11. Yazılım ve Veritabanları	25
3.2.12. İstatistiksel Analiz	25
4. BULGULAR	26
5. TARTIŞMA... ..	32
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR	37
EKLER	44
EK.1. ÖZGEÇMİŞ	44
EK.2. ETİK KURUL GEREKLİ OLMADIĞINA DAİR BELGE.....	45

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana verdiği destek, yönlendirmeler ve aldığım eğitimlerle beni akademik hayata hazırlayan, çalışma hayatıma adımımı attığımda da yanımda olan sevgili hocam Prof. Dr. İbrahim TEKEDERELİ'ye,

Eğitimimde katkı gösteren Prof. Dr. Elif Yeşilada, Prof. Dr. Şengül Yüksel başta olmak üzere tüm İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı hocalarına,

Birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım Alev POLAT başta olmak üzere Genetik Laboratuvarı personelleri ve bana hep destek olan Berna ÖZDEM ve Huriye DÜNDAR'a,

Tüm hayatım boyunca desteklerini her zaman arkamda hissettiğim ve beni koşulsuz seven canım ailem, annem Gülsen ERGÜVEN, babam Bülent ERGÜVEN, kardeşim M. Seyit ERGÜVEN'e,

Her koşulda yanımda olup bana destek olan nişanlım Miraç TOPCU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL2021-2684 no'lu Y.Lisans Projesi ile desteklenmiştir.

ÖZET

Meme Kanseri Hücre Hatlarında Liraglutid'in Apoptoz Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Yüksek kan şekeri seviyeleri, meme kanseri hücrelerinin büyümesi için uygun ortam sağlamak ve diyabetli hastalarda meme kanseri riskini artırmaktadır. Diyabet tedavisinin meme kanseri hücrelerinin tedavisinde de etkili olabileceği ileri sürülmektedir. Bu çalışmada diyabet tedavisinde kullanılan GLP-1 agonisti liraglutidin meme kanseri tedavisinde kullanılabilirliğini araştırmak ve liraglutidin meme kanseri hücrelerinde apoptoz miktarını tespit etmek amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Bu çalışmada, MDA-MB-231, MCF-7 meme kanseri hücreleri kullanılmıştır. Uygulanan liraglutid tedavisiyle hücre proliferasyonundaki değişimler MTS testi ile analiz edilmiştir. Hücre ölümündeki rolünün aydınlatılması için western blotting yöntemi ve annexin PI boyama testi kullanılmıştır.

Bulgular: MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri, sırasıyla 3400 nM ve 4800 nM liraglutid ile 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Liraglutid uygulanan gruplarda ki apoptoz miktarı tedavisiz gruba göre MDA-MB-231 hücresinde 8 kat, MCF-7 hücresinde 47 kat artmıştır. Tüm sonuçlar t-testi kullanılarak analiz edilmiş ve $p < 0.05$ olarak bulunmuştur.

Sonuç: Liraglutidin MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azaltıcı ve bu hücrelerde apoptozu uyarıcı etkisinin olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, liraglutidin meme kanseri tedavisinde yeni bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilmesi umudunu artırmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Liraglutid, Meme Kanseri

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Liraglutide on Apoptosis in Breast Cancer Cell Lines

Aim: High blood sugar levels provide a suitable environment for the growth of breast cancer cells and increase the risk of breast cancer in patients with diabetes. It is suggested that diabetes treatment may also be effective in the treatment of breast cancer cells. In this study, it was aimed to investigate the use of the GLP-1 agonist liraglutide, which is used in the treatment of diabetes, in the treatment of breast cancer and to determine the amount of apoptosis of liraglutide in breast cancer cells.

Material and Method: In this study, MDA-MB-231, MCF-7 breast cancer cells were used. Cell proliferation of this treatment in cells with applied liraglutide treatment was tested with MTS. Western blotting method and annexin PI staining test were used to elucidate its role in cell death.

Results: MDA-MB-231 and MCF-7 cells were incubated for 72 hours with different concentrations of liraglutide 3400 nM and 4800 nM, respectively. The amount of apoptosis in the liraglutide treated groups increased 8 times in MDA-MB-231 cells and 47 times in MCF-7 cells compared to the untreated group. All results were analyzed using the t-test and found $p < 0.05$.

Conclusion: Liraglutide has been found to reduce proliferation of MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells and stimulate apoptosis in these cells. These results raise the hope that liraglutide can be used as a new treatment option in the treatment of breast cancer.

Keywords: Apoptosis, Liraglutide, Breast Cancer

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATTC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BRCA1	: Meme Kanseri Yatkınlık Geni 1
BRCA2	: Meme Kanseri Yatkınlık Geni 2
BSA	: Bovin Serum Albumin
DDP-4	: Dipeptidipeptidaz-4
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medyum
GLP-1	: Glukagon benzeri peptid-1
GLUT	: Glukoz taşıyıcı
FBS	: Fetal Bovine Serum
kDa	: Kilo dalton
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NAF	: Sodyum Florür
NA₃VO₄	: Sodyum Ortovanadat
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline)
PI	: Propidyum İyodit
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
ER	: Östrojen Reseptörü
ER	: Östrojen Reseptörü
PR	: Progesteron Reseptörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (Word Health Organization)

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2. 1. Beslenme alışkanlıkları, aile meme kanseri öyküsü, menstrüel ve üreme hikayesi ve diğer faktörlerin meme kanseri üzerine etkileri.....	5
Şekil 2. 2. Meme kanserini tedavi etmek için kullanılan mevcut tedavi seçenekleri	7
Şekil 2. 3. Bağışıklık sisteminden yararlanmak ve onu meme kanserini yok etmek için kullanılan çeşitli stratejiler.....	9
Şekil 2. 4. Hiperglisemi/diyabet tarafından indüklenen kanser hücrelerinin çoğalması, yukarıdaki süreçlere aracılık ederek dolaylı olarak gerçekleşir.....	10
Şekil 2. 5. Yüksek glukozun enerji metabolizmasına ve hücre içi sinyal yollarına etkisi.....	11
Şekil 2. 6. GLP-1 in doğrudan ve ya dolaylı olarak metabolizma üzerine etkileri(51).	15
Şekil 3. 1. Neubauer Lam.....	21
Şekil 4. 1. MTS analizi sonrası MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hattı plakalarının görüntüleri.....	26
Şekil 4. 2. MDA-MB-231 hücre hattının liraglutid konsantrasyonları sonrası hücre canlılığı grafiği.....	27
Şekil 4. 3. MCF-7 hücre hattının liraglutid konsantrasyonları sonrası hücre canlılığı grafiği.....	27
Şekil 4. 4. MDA-MB-231 hücre hatlarında tedavisiz ve IC ₅₀ 3400 nM liraglutid uygulaması sonucu oluşan apoptoz yüzdeleri.....	28
Şekil 4. 5. MCF-7 hücre hatlarında tedavisiz (a) ve IC ₅₀ 4800 nM liraglutid (b) uygulaması sonucu oluşan apoptoz yüzdeleri.....	29
Şekil 4. 6. MDA-MB-231 hücre hattında beclin-1 ifadesinin artışının görüntüsü (a) ve grafiği (b) (p<0.05)	30
Şekil 4. 7. MDA-MB-231 hücre hattında p53 ifadesinin artışının görüntüsü (a) ve grafiği (b) (p<0.05)	30
Şekil 4. 8. MCF-7 hücre hattında p53 ifadesinin azalışının görüntüsü (a) ve grafiği (b) (p<0.05).....	31

Şekil 4. 9. MCF-7 hücre hattında becn-1 ifadesinin artışının görüntüsü (a) ve grafiği (b) ($p<0.05$)	31
Şekil 5. 1. p53, beclin-1 ve apoptoz ilişkisi	34



TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3. 1. Kullanılan Hücreler ve Özellikleri.....	19
Tablo 3. 2. Western Blot İçin Kullanılacak Karışımların Oranları	23
Tablo 3. 3. Anneksin V Boyaması İçin Karışım Oranları	24



1.GİRİŞ

Kanser, ülkemizde olduğu gibi dünya genelinde de önemli sağlık sorunlarından biridir. Meme kanseri 2020 yılında, 2.26 milyon yeni vaka ile küresel olarak kadınlarda en yaygın görülen kanser olarak tespit edilmiştir(1). Bu artış ve meydana gelen 685.000 ölüm sonrası yapılan tahminler, 2020 yılından 2040 yılına kadar her yıl 3 milyondan fazla yeni vaka ve 1 milyondan fazla kayıp yaşanacağını göstermektedir(2).

Meme kanseri vakalarının büyük bir bölümü hamilelikle ilişkili faktörler, hormonal tedavi, yaşam tarzı (örn. Sigara, alkol kullanımı) ile ilişkilidir. Tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %10'u kalıtsal olan gen mutasyonları ve yaş ile ilgilidir. Bu mutasyonlardan en sık görüleni BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarıdır(3).

Kanser biyolojisi her geçen gün gelişmesine rağmen meme kanseri tedavisi zorlu bir konu olmaya devam etmiştir. Türüne bakılmaksızın tüm hücrelerin hayatta kalabilmesi için çeşitli sinyal yolları tarafından kontrol edilmesi gerekir. Hücreler bu sinyal yolları aracılığıyla birbirleriyle ve hatta çevreleriyle iletişim kurabilirler. Ve sinyal yollarının çoğu farklı şartlara ve hücrelere müdahale eder(4).

Kanser hücreleri genetik ve epigenetik değişikliklere uğrar. Bu değişiklik tümör hücrelerindeki anormal mutasyonlarla bazı sinyal yollarının yüksek oranda aktive olmasına neden olabilir. Bu mutasyonlar, sinyal yollarını kontrol ederek tümör hücrelerinin normal hücrelerden farklı bir şekilde çoğalmasını, hayatta kalmasını ve diğer dokulara göç etmesini sağlarlar (4).

Diyabet ve meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi araştırmak için yapılan bir meta-analizde diyabetli kadınlar arasında meme kanserine yakalanma riskinde artış bulunmuştur(5).

Son yıllarda kanser tedavisi cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel yaklaşımlardan immünoterapi gibi yeni tedavi seçeneklerine doğru gelişme göstermiştir. Bu yeni tedavi seçenekleri klinik olarak test edilmeye başlanmıştır. Yeni tedavi seçeneği olarak Tip 2 diyabetli hastalarda oldukça sık kullanılan metformin denenmiştir. Araştırmacılar Tip 2 diyabetli hastalarda kanser riskinin azaldığını bulmuş ve metforminin alternatif işlevlerini ve olası faydalarını incelemeye başlamışlardır(6).

Tip 2 diyabetli hastaların tedavisinde kullanılan bir ilaç sınıfı da glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) agonistleridir. Bu ilaç grubunun bir örneği olan eksendin-4 ve ya eksenatid, meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edicisi olarak bildirilmiştir.

Meme kanseri hücre hatlarında ve fare modelinde meme kanseri riskinin azaldığı görülmüştür(7).

Yapılan bir çalışmada, tip 2 diyabetli yetişkinlerin kilo yönetimi için onaylanmış bir insan glukagon benzeri peptid-1 reseptör agonisti olan Liraglutid'i kullanarak kadınlar arasında liraglutid ile meme kanseri insidansı arasındaki ilişkiyi ölçmeyi amaçlamışlardır. Meme kanseri tanısına sahip olan kadınlarda Liraglutid'in kullanımına ilişkin analizlerle, meme kanseri riskinde artış olmadığı gösterilmiştir(8).

Liraglutid'in bazı biyokimyasal olaylarda önemli rol oynayarak kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasına engel olduğu bildirilmiştir. Ancak literatürde, Liraglutid'in, meme kanseri hücrelerinde apoptozu artırdığına dair bazı yayınlar olsa dahi bunu hangi yolak üzerinden yaptığına dair bilgi bulunmamaktadır. Çalışmamızda, Liraglutid'in meme kanseri hücre hatları olan MDA- MB 231, MCF-7 üzerindeki potansiyel etkileri ve apoptoz üzerine etkisi araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ile ortaya çıkmaktadır. Kontrolsüz bölünen hücreler çoğalır ve ardından birikmeye başlar. Etkisini tek bir bölge de gösterebildiği gibi yayılarakta gösterebilir. Şu ana kadar bilinen kanser türü 100 den fazladır. Çevresel faktörler ve genetik koşulların etkisinde olan karmaşık bir hastalık olmasına rağmen aynı zamanda kişiseldir(9). Sağlıksız beslenme, stres, teknolojik aletlere maruziyet gibi sebeplerle son yıllarda görülme sıklığı artmış ve en yaygın hastalıklar arasında yerini almıştır(10). Batı toplumlarında her üç kişiden biri kansere yakalanmakta, bu kişilerin beşte biri hayatını kaybetmektedir(11).

Hücre bölünmesi ve kontrolü genlerle denetim altında olduğu için kanser temel olarak genlerle ilgili olan bir hastalıktır. DNA tamir mekanizmaları meydana gelen hasarı düzeltmeye çalışsa da başarılı olamadıkları zamanlar olmaktadır. Bu da genlerin ürünü olan proteinlerin hatalı ya da eksik üretilmesine sebep olur. Ve hücresel işlemlerde bozulma gerçekleşir(9). Bu bozulma proteinleri kodlayan proto-onkogenlerin ve hücre büyümesini inhibe edici sinyalleri üreten ve ya apoptozu uyaran proteinleri kodlayan tümör baskılayıcı genlerin hasarı ya da mutasyonundan kaynaklanmaktadır. Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler, tümör gelişimine neden olan değişikliklerin kaynağıdır ve bu değişiklikler, DNA hasarının kontrolünde rol oynayan bir protein ailesini kodlayan tümöre yatkınlık genleri tarafından desteklenir(12, 13).

Tümör oluşumunu başlatan mutasyonlar, anormal ve kontrolsüz hücre bölünmesine, aşırı hücre büyümesinin inhibisyonunun olmamasına, bağışıklık sisteminden kaçınmaya, hücre ölümünün engellenmesine sebep olur.

Cerrahi ve radyoterapi, kanserin ilk evrelerinde lokal ve metastatik olmayan kanserlerin tedavisi için en etkili yöntemlerdir. Ancak kanser vücuda yayıldıktan sonra etkisizdir(12, 14). Kemoterapi, hormon tedavisi ve biyolojik tedaviler kan dolaşımı yoluyla vücuttaki her organa ulaşabildikleri için metastatik kanserlerin tedavisinde tercih edilirler. Kemoterapötik ilaçlar, öncelikle kanser hücrelerinin hızlı çoğalmasını engelleyen, ancak saç köklerinin, kemik iliği ve gastrointestinal sistem hücrelerinin bakımı için gereken hızlı büyümeyi de engelleyen ve kanser tedavisinde istenmeyen yan etkilere yol açan toksik bileşiklere dayanmaktadır(14). Etkili bir tedaviye ulaşmanın önünde ki en büyük engel, terapilere direnç göstermesidir(15).

Kombine ve adjuvan kemoterapiler gibi kanser tedavisinde ki önemli ilerlemelere rağmen hücrelerin gelişigüzel yıkımı ve kemoterapötik ajanların toksik yan etkileri, metastatik hastalığın tedavisi için uzun yıllar tek olası yaklaşım olmuştur(14).

1990'ların sonunda, bu spesifik olmayan tedavilerin yerine hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının kontrolünde yer alan ve etkileyen ilaçların tasarlanmasına izin veren hedefe yönelik tedavinin kullanımına kapı açan hücre sinyal yolları keşfedildi(14).

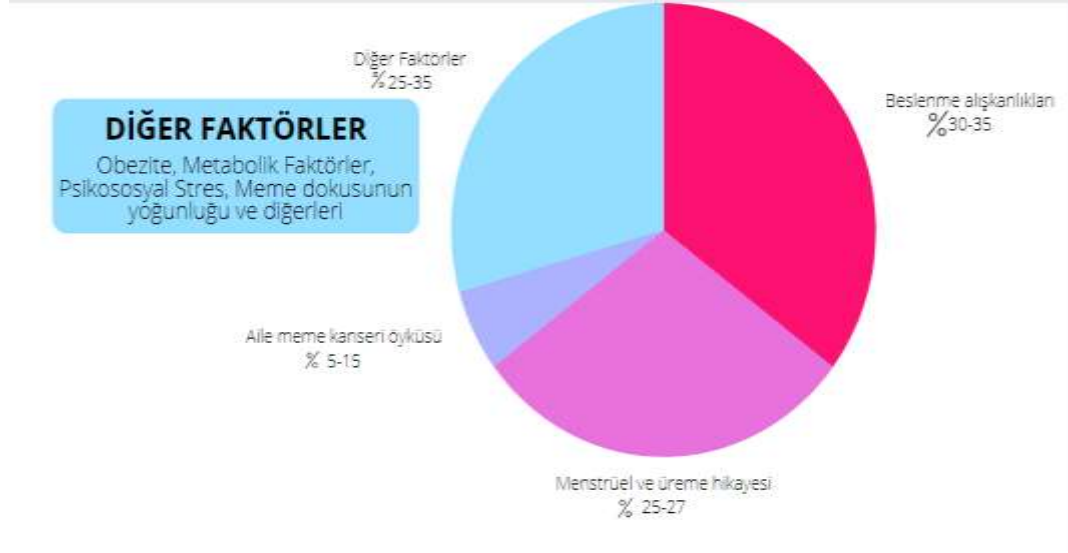
2.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri tüm dünyada daha çok kadınları etkileyen yaygın bir kanser türüdür(15). Yapılan araştırmalara göre 100'den fazla ülkede, kadınlarda kansere bağlı ölümler en yüksek oranda meme kanserinden kaynaklanmaktadır. Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde akciğer kanseri, kanser mortalitesinde istisnai olarak ilk sırada bulunmaktadır. Gelişmiş ülkelerde meme kanseri insidansının yüksek olmasının sebebi, yaşam standartlarının yüksek olması, daha az gebelik, geç gebelik ve doğum, erken menarş yaşının daha sık görülmesi, hormon replasman tedavisi kullanımı, mamografi gibi tekniklerle erken tanı ve etkili kayıt sistemleri gibi faktörlerin bir araya gelmesidir(16).

Meme kanseri risk faktörlerinin yanı sıra daha çok yaş ile alakalı bulunmaktadır. Meme kanseri görülme yaşı, 40-50 yaşlarda yani aktif üreme yaşlarının sonlarına doğru hızlı bir artış göstermektedir. Menopoz sonrası 50 yaş civarı hafif bir düşüş gözlemlenmektedir(16). Kadınların meme kanserine yakalanma riski, erkeklere kıyasla neredeyse 100 kat daha yüksektir ve bu nedenle meme kanseri genellikle kadınlarda görülen bir hastalıktır(17).

2.3. Meme Kanseri Etiyolojisi

Meme kanseri genetik ve çevresel faktörlerin rol aldığı çok çeşitli bir hastalıktır(15). Meme kanserinin genetik faktörleri aile öyküsü ile ilişkili olup vakaların %5-15'inden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Üreme ilişkisi ve menstrüel döngü ile alakalı faktörlerin %25 oranında sorumlu olduğu ve çevresel faktörlerin %60-70 oranında etkili olduğu görülmektedir. Meme kanseri riskini azaltabileceği düşünülen beslenme şeklinin etkisi ise %30-35 civarındadır(17).



Şekil 2. 1. Beslenme alışkanlıkları, aile meme kanseri öyküsü, menstrüel ve üreme hikayesi ve diğer faktörlerin meme kanseri üzerine etkileri(17).

Kadınların hayatları boyunca meme kanserine yakalanma riski erkeklere kıyasla 100 kat daha yüksektir(17). Meme kanseri tanısı kadınlarda daha erken evrelerde koyulabilirken erkeklerde genelde geç evrelerde konulur. Bunun sebebinin erkeklerin belirtileri dikkate almamaları, önemsememeleri ve tarama programlarına gitmemelerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir(18).

Kalıtsal meme kanseri öyküsü olan ailelerin yaklaşık %80'inden BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonlarının sebep olduğu tahmin edilmektedir. Ancak BRCA1 ve BRCA2 genlerinin mutasyonların bulunduğu her ailede meme kanseri oluşumu görülmez. Diğer risk faktörleriyle birlikte görülmesi ile ilişkili bir durumdur(19).

BRCA1 ve BRCA2 yüksek penetrasyonlu genlerin dışında, meme kanseri yakınlığını artıran başka genler de olabilir. Bu genlere örnek olarak proto-onkogenler, östrojen ve metabolik genler, bağışıklığı düzenleyici yolda yer alan genler gösterilebilir. Bu genlerin düşük penetrasyonlu olduğu düşünülse de çevresel faktörler meme kanseri gelişme riskini etkileyebilir(19).

BRCA1 geninde mutasyon ve delesyon olan kadınlar arasında %10 oranında bulunurlar. Erkeklerde ise görülme sıklığı oldukça düşüktür. Genin 17q21 bölgesi incelendi ve farklı lokuslarda mutasyonlar bulundu. Bu gende meme kanseri riskini artırmayan bir çok polimorfizm bulunmaktadır. BRCA1 gen ürünü, normal embriyonik gelişim için önemli olan 1863 amino asitli bir protein olan RNA polimeraz II holoenziminin bir bileşenidir(20). Çalışmalar, BRCA1'in insan kanser hücrelerinde proliferasyonunu, DNA sarmal kırıklarının onarımını, apoptoz indüksiyonunu,

kemosensitiviteyi ve belirli hücrel düzenleyici proteinlerin ekspresyonunu modüle ettiğini ileri sürdü(21).

BRCA2 geni 13q12-q13 bölgesi incelendi. Ve bir cDNA'nın 2329 aminoasitlik bir proteini kodladığı görüldü. Ancak bunun tüm geni temsil etmediği düşünülmektedir. İnsan BRCA2 geni, kabaca 70 kb genomik DNA'ya dağılmış 27 ekzon içerir. Birden fazla tümör tipinde rol oynayabileceği için tümör baskılayıcı gen olarak da görev alabilir. Çoğu BRCA2 mutasyonunu kesik bir protein ürünü ile sonuçlandığı ön görülmektedir. BRCA2 mutasyonları, büyük bir kısmı işlevsiz olan proteinlerin üretilmesine neden olabilir ve bu mutasyonlar çekirdeğe taşınmazlar(20).

BRCA1 ve BRCA2 ile ilgili proteinler, kadınlarda ve erkeklerde normal meme epiteli tarafından üretilirler(22).

2.4. Meme Kanseri Kullanan İlaçlar

Meme kanseri teşhisi konulduktan sonra ki asıl amaç tedavi ile hastalığı kontrol altına alabilmektir. Metastatik olmayan meme kanserlerinde, uzak bölgelere metastazi engellemek ve ya lokal nüks riskini en aza indirmektir. Ve hastanın eski yaşam kalitesine geri dönebilmesi amaçlanmaktadır. Metastatik meme kanserinde ana hedef, semptomları hafifletmek ve yaşam süresinin uzatmaktır(23).

Meme kanserinde kullanılan geleneksel tedavi seçenekleri arasında, vücudun geri kalanını etkilemeden tümörü bölgesel olarak temizlemek için cerrahi tedavi ve yine vücudun tamamını etkilemeyen radyasyon tedavisi yer almaktadır. Ek olarak, hormonal reseptörün durumu, HER2 protein miktarı, menopoz durumu, genel sağlık durumu ve hastalığın evresine göre değerlendirilen hedefe yönelik tedavi, immünoterapi ve neredeyse vücudun tamamını etkileyen ve tüm kanser hücrelerine ulaşabilen kemoterapi gibi sistemik tedaviler de uygulanmaktadır(24).



Şekil 2. 2. Meme kanserini tedavi etmek için kullanılan mevcut tedavi seçenekleri (23).

2.4.1. Endokrin Tedavisi

Meme kanseri, hormon reseptörleri (HR), östrojen veya progesteron varlığında ya da yokluğunda büyüme göstermesi ile tanımlanabilir. Bu reseptörler östrojen reseptörü (ER) progesteron reseptörü pozitif (+) meme kanseri tedavisinin temel dayanağını temsil eden anti-endokrin tedaviler tarafından hedef alınabilir. Endokrin durumuna ilaveten, kötü huylu hücreler de dahil olmak üzere hücrelerin büyümesini destekleyen proteinleri kodlayan insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) geninde bir mutasyonun varlığı ya da yokluğu ile de belirleyici olabilir(25).

Premenopozal kadınlarda, yumurtalıklar östrojen üretiminin temel sebebidir. Postmenopozal kadınlarda, adrenal bezler tarafından salınan androjenler, öncelikle yağ dokusu ve kasta aromataz tarafından östrojene dönüştürülür. Endokrin terapi, östrojenin reseptör seviyesindeki etkisini bloke ederek veya östrojen üretimini inhibe ederek işlevini görmektedir. Bugüne kadar çeşitli endokrin terapi sınıfları geliştirilmiştir ve bunlar arasında seçici östrojen reseptörü modülatörleri, yüksek doz östrojenler ve hedefe yönelik tedaviler, aromataz inhibitörleri (AI'ler), luteinize edici hormon salan agonistler bulunur (25). Birincil meme kanseri için kullanılan çeşitli hormonal ilaç türleri arasında Tamoksifen, Toremifen, Arimidex, Zoladex vb. bulunur(24).

2.4.2. Cerrahi Tedavi

Son yıllarda metastatik olmayan meme kanserinin teşhisi ve tedavisinde cerrahi ilerlemeler hayatta kalma ve iyileşme ile sonuçlanmıştır. Bu gelişmeler meme koruyucu cerrahinin (MKC) mastektomi ile sağ kalım arasındaki ilişkisinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte sosyal yaşam şartları, sağlık sigortası ve sağlık hizmetlerinin varlığı gibi klinik olmayan özelliklerin MKC kullanımını etkilediği düşünülmektedir. Benzer şekilde komorbiditelerin yönetimi dahil olmak üzere cerrahi tedaviye kadar geçen süreyi etkileyen çok sayıda klinik faktör vardır(26).

Meme kanseri hastaları için cerrahi seçenekler iki genel gruba ayrılabilir. Bunlar meme koruyucu cerrahi (onkoplastik cerrahi dahil) ve MAST(mastektomi ve meme yeniden yapılandırılması ile birlikte) şeklindedir. Onkolojik kurallara bağlı olarak hastalar meme yeniden yapılandırılmasıyla ya da yapılandırma olmadan kısmen veya tamamen meme dokusunun çıkarılmasını seçebilirler(27).

2.4.3. İmmünoterapi

Meme kanseri tedavisinde ki son gelişmelerden birisi de kemoterapinin bir parçası olan immünoterapidir. Uzunca bir süre kalıtsal aktarım sebebiyle ortaya çıkan meme kanserine bağışıklık sisteminin yanıt veremeyeceği düşünülüyordu(23).

Yeni gelişen kanser hücreleri ile bağışıklık sistemi arasındaki, bağışıklık düzenleyici olarak da adlandırılan etkileşim, üç aşamadan geçer: eliminasyon, denge ve kaçış(28).



Şekil 2. 3. Bağımsıklık sisteminden yararlanmak ve meme kanserini yok etmek için kullanılan çeşitli stratejiler(28).

2.4.4. Hedefe Yönelik Tedavi

Meme kanseri hastalarında daha etkili ve daha az yıpratıcı bir tedavi olan hedefe yönelik tedavilerden faydalanılabileceği fark edildi(29). Hedefe yönelik tedavi yaygın olarak kemoterapi ile birlikte kullanılmaya başlandı. Bu tedaviler de Transtuzumab veya Lapatinib gibi ilaçlarla meme kanseri hücrelerinin büyümesini uyaran bir proteinin (HER2 gibi) etkisini bloke edebilmektedir. Ve hedefe yönelik tedavilerin kemoterapiye kıyasla daha az ciddi yan etkileri vardır(30, 31).

2.4.5. Radyoterapi

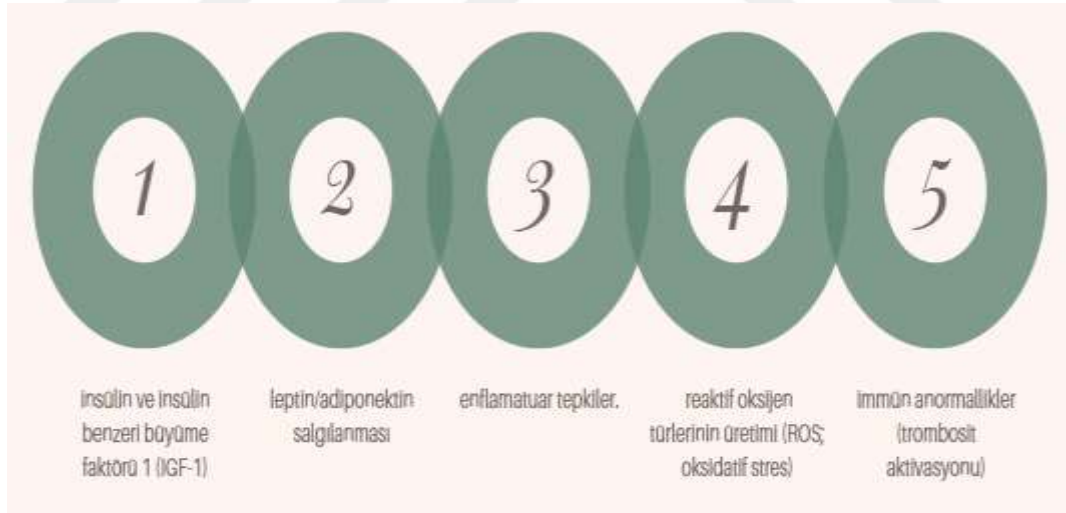
Hızlandırılmış kısmi meme ışınlaması, lumpektomi sonrası meme korunmasının bir parçası olarak radyasyon tedavisinin toksisitesini azaltmak araştırılmıştır. Tüm meme yerine kitlenin alındığı yerin etrafındaki 1-2 cm'lik bir alana radyoterapi verilir. Fraksiyon başına daha yüksek dozların verilmesi, radyasyon tedavisinin 5 veya 6 hafta yerine birkaç gün içinde tamamlanmasını sağlar(32).

Son 20 yılda, akademik çalışmalar oldukça ilerlese de meme kanserine köklü bir çözüm getirilememiştir. İlaç tedavilerinin yeni hedeflerinin belirlenmesi gerekmektedir (33).

2.5. Kanser ve Diyabet

Küresel sağlık üzerinde önemli bir etkiye sahip olan ve oldukça yaygın olan iki hastalık çeşidi bulunmaktadır: Diyabet ve kanser. Hareketsiz yaşam tarzı, aşırı kilo, sigara içme ve ileri yaş gibi çok sayıda ortak sebeple ortaya çıkmaktadırlar. Epidemiyolojik veriler, diyabetli hastaların çok çeşitli kanserlere yakalanma riskinin normal bireylere kıyasla daha yüksek olduğunu göstermektedir(34).

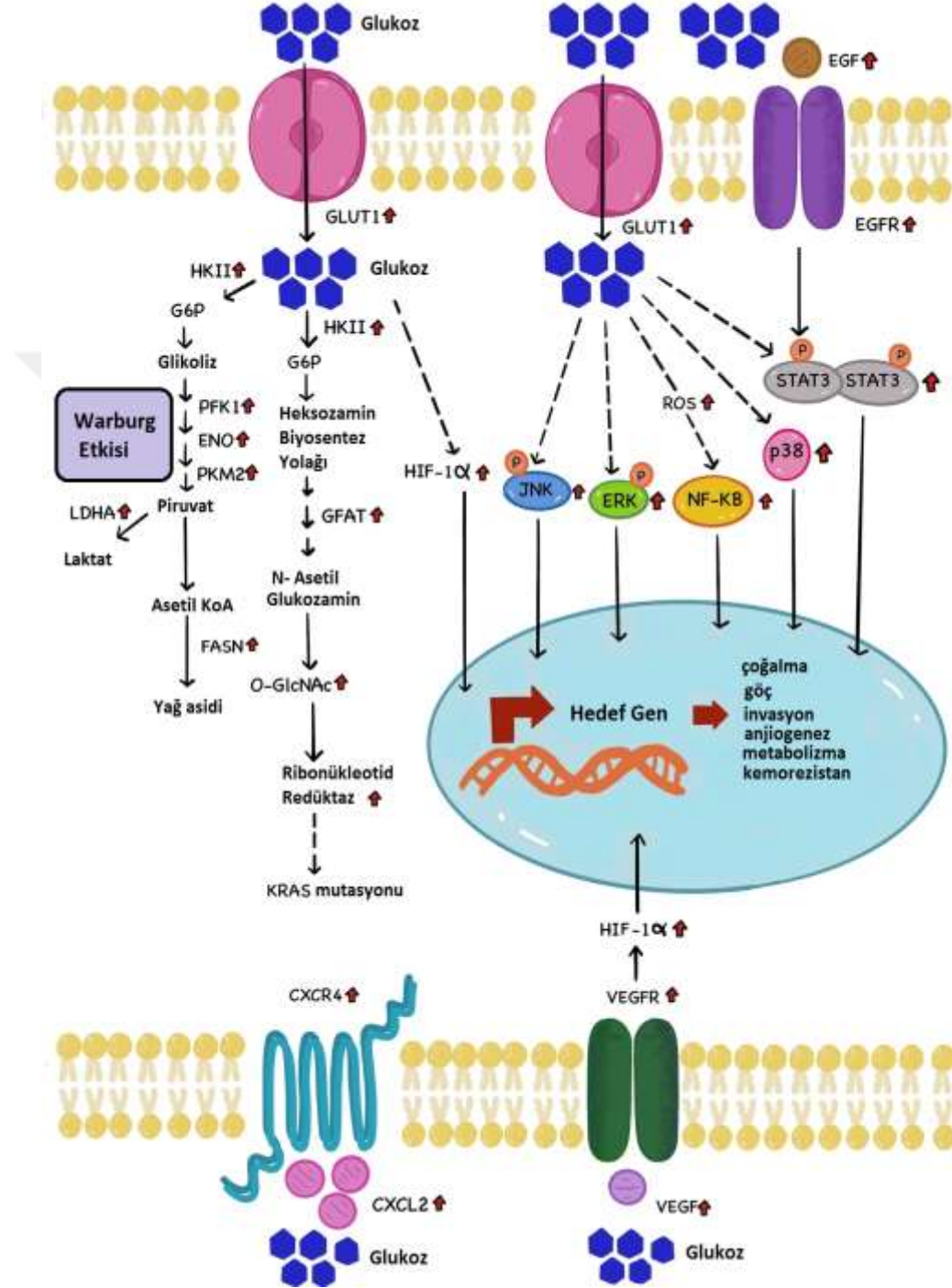
Yüksek kan şekeri düzeyinin kanser hücrelerinin çoğalmasını ve ilerlemesini uyardığı tespit edilmiştir(35). Hiperglisemi, anormal gen ekspresyonu ile sonuçlanan, DNA metilasyonu ve kromatin yeniden şekillendirmesi de dâhil çeşitli mekanizmalarla epigenetik değişikliklere neden olur. Ayrıca kanser hücrelerinin metastazı, çoğalması ve anormal gen ekspresyonunu artırarak tümör büyümesine sebep olmaktadır (36). Yapılan çalışmalar diyabet ile karsinogenez arasında bir ilişkinin olduğunu göstermiş ve en belirgin ilişkinin Tip 2 diyabet (T2DM) ile olduğu bildirilmiştir(37).



Şekil 2. 4. Hiperglisemi/diyabet tarafından indüklenen kanser hücrelerinin çoğalması, yukarıdaki süreçlere aracılık ederek dolaylı olarak gerçekleşir(38).

Diyabetojenik glukoz seviyeleri, farklı kanser tiplerinin ilerlemesini farklı mekanizmalarla desteklemektedir. Aerobik glikolizin bağımlı yollarının artması ve birkaç hücre içi sinyalinin aktive edişi, yüksek glukozla maruz kalan kanser hücrelerinde gösterilmektedir. Glukoz, hücre içerisinde glukoz taşıyıcı-1 in (GLUT1) yardımıyla taşınmaktadır. Ve birkaç metabolik yolu uyarır. Fosfofruktokinaz-I, Heksokinaz-II ve

piruvat kinaz M2 gibi glikolizdeki bir çok kilit enzim, birkaç makromolekülün sentezi için gerekli olan metabolitlerin artmasına neden olmaktadır. Buna benzer olarak glukoz, hücre çoğalması, metastatik yetenek ve kanser hücrelerinin kemorezistan direncini içeren ERK, STAT3, ve NF- κ B gibi bir çok sinyal yolağını aktive edebilir(39).



Şekil 2. 5. Yüksek glukozun enerji metabolizmasına ve hücre içi sinyal yollarına etkisi. Glukoz agresif kanser fenotiplerini uyaran birkaç sinyal yolağını da aktive eder. Glukoz, glikoliz, O-GlcNasilasyon, laktik asit üretimi ve lipid sentezinde artışla sonuçlanan glukoz metabolizmasındaki anahtar enzimleri düzenler. Buna paralel olarak glukoz, agresif kanser türlerini harekete geçiren birkaç sinyal yolağını da aktive eder(39).

2.5.1. Meme Kanseri ve Diyabet

Diyabet ve meme kanseri arasında önemli bir ilişkinin olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, diyabetin meme kanseri riskini artırdığını ve tümör oluşumu gerçekleştikten sonra tümörün gelişimini desteklediğini göstermektedir(40). Yapılan bir çalışmada yüksek glisemik indeksli gıda ve kanserojenlerle beslenen fareler, daha düşük glisemik indeksli gıda ile beslenen farelere göre meme kanserini daha hızlı geliştirmiş ve daha yüksek tümör yüküne sahip bulunmuştur(41).

Yağ asidi sentaz enziminin yüksek ekspresyonu, meme kanseri hücre proliferasyonu için gerekli olduğundan ve yüksek glukoz tarafından regüle edilebildiğinden, meme kanserinde lipid metabolizması önemli bir görev alır(42).

Meme kanseri hücreleri genellikle hormonların ve büyüme faktörlerinin aktivasyonuna ihtiyaç duyar. Bu sebeple aşırı insülin ve insülin benzeri büyüme faktörünün (IGF) meme kanserinin temelinde yatan sebep olduğu düşünülmüştür(43). Buna ek olarak, yüksek glukoz ve insülinin, artan reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi yoluyla meme kanserinin çoğalmasına yardım ettiği gösterilmiştir(44). Bu da IRS`yi (insülin reseptörü substratı) aktive eder. Sonrasında MAPK (Mitojenle aktive olan protein kinaz) yolağını aktifleştirir. Yüksek glukoz, meme kanseri hücrelerinde ROS üretimini uyararak büyümeyi destekler ve apoptoza engel olur. ROS daha sonra PP2Cδ`ı (nükleer tip 2 C protein fosfataz) aktive edebilmek için NF-κB (nükleer faktör κB) yolağını uyarır. Meme kanseri hücrelerinin çoğalması desteklenmiş olur(39).

Hem diyabet hem de meme kanseri olan hastalardan alınan tümör dokusunda PP2Cδ ekspresyonu, kan şekeri normal düzeyde olan hastalardan daha yüksektir. Yüksek glukozun diğer sinyal yolları üzerinde de etkisi olduğu tespit edilmiştir(45).

Meme kanseri olan hastalarla yapılan çalışmada tip 2 diyabete sahip olan kişilerin önemli ölçüde daha fazla lenfatik ve metastaza sahip olduğu bulunmuştur(46). Yapılan başka bir çalışmada ise yüksek glukoz ve insülinin, metastatik bir meme kanseri hücre dizisi olan MDA-MB-231`in yayılımını ROS üretimi yoluyla oldukça artırdığı gösterilmiştir(44). Yine başka bir çalışmada, plazminojenin hücre yüzeyine bağlanmasının bir inhibitörü olan ε-aminokaproik asidin kullanılmasının, yüksek glukoz ve insülin tarafından uyarılan MDA-MB-231`in yayılımını baskıladığı görülmüştür(47).

Yüksek glukozun meme kanserindeki metastatik etkilerinin incelendiği bir çalışmada ROS/ NF-κB`yi aktifleştirerek artan PP2Cδ ekspresyonunun, kanser

hücresinin büyümesini, meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını ve yayılmasını teşvik ettiği bulunmuştur(48). Yüksek glukozla kültürlenmiş meme kanseri hücrelerinde GLUT12 ekspresyonunun arttığı başka bir çalışmada gösterilmiştir. Yine aynı meme kanseri hücrelerinde Zn^{2+} iyon taşıyıcılarının da yüksek glukoz ile arttığı, Zn^{2+} iyonunun meme kanseri hücrelerinin hareketliliği için gerekli olduğu gösterilmiştir(49).

Tip 2 diyabet olan farelere ortotopik tümör nakli yapılmıştır. Meme kanseri taşıyan hiperglisemik farelerin, kontrollü glukoz seviyesine sahip diyabetik farelere veya normal farelere kıyasla akciğer metastazı yapma ihtimali daha yüksek görülmüştür(50).

Bu çalışmalar, tip 2 diyabetli hastalarda insülinin etkisine ek olarak yüksek glukozun meme kanseri metastazı üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır(39).

2.5.2. Diyabette Kullanılan İlaçların Meme Kanseriyle İlişkisi

Tip 2 diyabeti tedavi eden veya önleyen ajanların kanser riskini olumlu yönde etkilemesi beklenilmektedir. Bu oral ajanlar, insülin sağlayan (sekretagoglar, metiglinidler ve inkretin analogları) ve insülin duyarlılaştırıcı (metformin ve tiyazolidindionlar) olarak iki genel kategoriye ayrılır. İnsülin duyarlılaştırıcıları, metformin ve tiyazolidindionlar (TZD'ler), sadece glikoz, insülin ve yağ asidi seviyelerini düşürmekle kalmayıp antikanserojenik özelliklere de sahip olduklarından umut verici kanser terapileridir. Metformin genellikle tip 2 diyabet tedavisi için birinci basamak tedavi olarak kullanılır; hepatik glikoz çıkışını azaltır ve kasta glikoz atılımını artırır, böylece dolaşımdaki serum glikoz ve insülin düzeylerini azaltır(51).

Hayvan deneyleri kadar in vitro hücre kültürü çalışmaları da metforminin antitümör özelliklerini göstermiştir. Farelerde meme tümörü büyümesi metformin ile azaldığından insan meme kanseri tedavisinde de umut verici olarak görülmüştür. Metformin, onkogenik hücre hatlarında kısmi hücre döngüsü durdurur, hücre proliferasyonunu inhibe eder, kanser proliferasyonunu azaltır. Metformin gibi, tiyazolidindionlar da in vitro düzeyde kanser hücresi büyümesini, güçlenmesini ve proliferasyonunu inhibe ederek apoptozu indükler(51).

Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) agonistleri, tip 2 diyabet tedavisinde nispeten yeni ilaçlardır(51).

2.6. Glukagon benzeri peptid-1

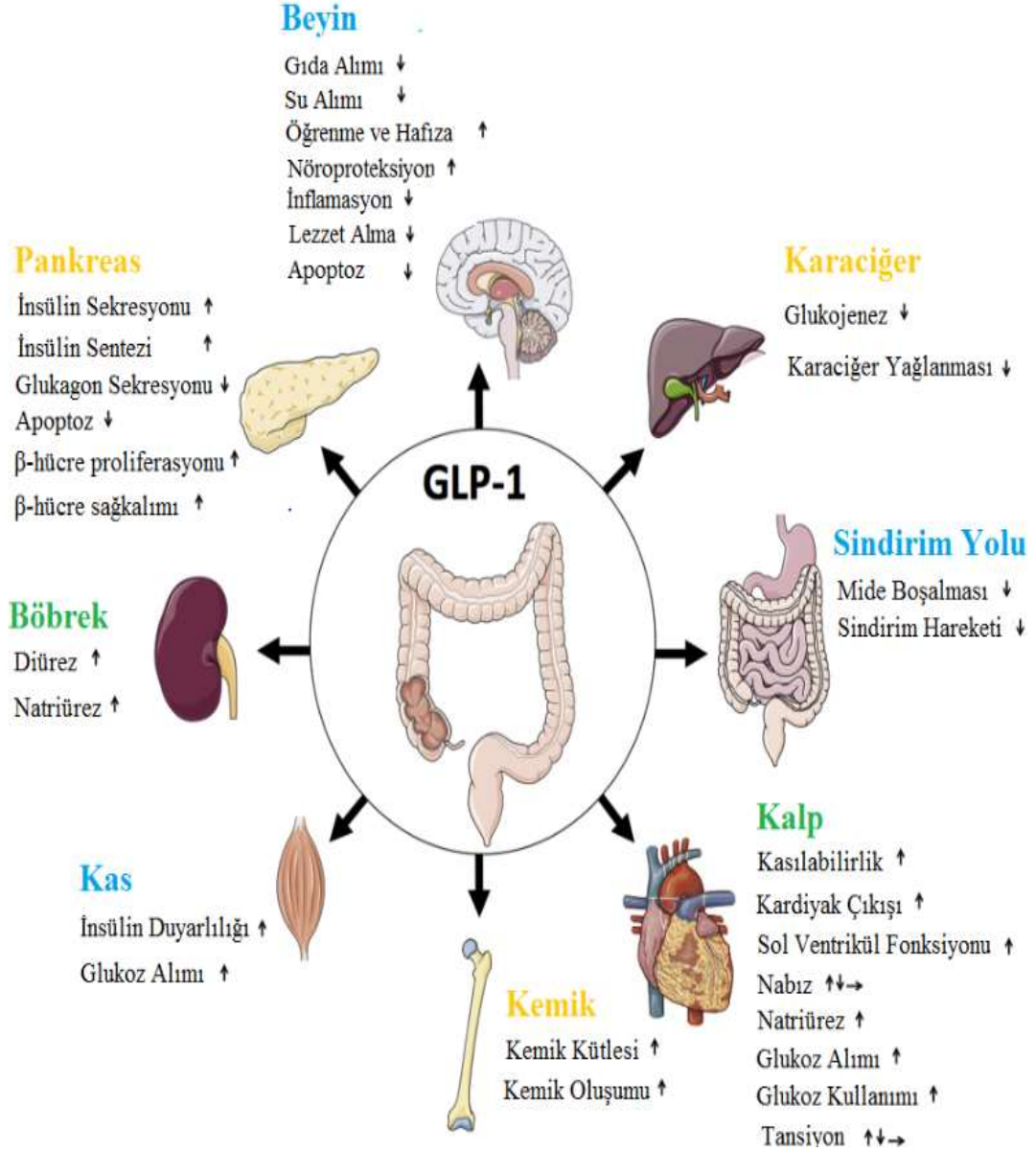
Glukagon benzeri peptid-1(GLP-1), çok yönlü, farmakolojik potansiyeli geniş olan 30 aminoasitlik bir bağırsak hormonudur. GLP-1 ağızdan alınan besinlerin etkisiyle ince bağırsaktan salgılanır ve kana geçerek pankreasta insülin salınımını artırır. Glukagon salgılanmasını ve apoptozu azaltır(52).

Üretilen pro-glukagon, farklı organlarda farklı türde bölünmelere uğrar ve GLP-1, GLP-2, glisentin ve oksintomodulin bağırsakta bölünmenin ürünleridir. GLP-1'in olgunlaşmamış 37 aminoasit formu, C-terminal ucundan bölünür ve amidlenir. Bunun sonucunda GLP-1'in aktif formu ortaya çıkar(53).

Doğal GLP-1'in çok kısa bir yarılanma ömrü vardır. Neredeyse 1-2 dakikadır(54). Dipeptidilpeptidaz-4(DDP-4) enziminin etkisi ile inaktive edilir. DDP-4, GLP-1 salgılama bölgelerine bitişik olanlar dahil, endotel hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilmektedir. Hem çözünüp dolaşım formunda hem de zara bağlı şekilde bulunur. DDP-4 enziminin aktivitesi ile, salgılanan GLP-1'in yalnızca %10-15'i bozulmaya uğramadan dolaşıma katılır(55, 56).

GLP-1 reseptörü glisemik kontrolü iyileştirir, β -hücre proliferasyonunu ve sağkalımını destekler. Glukagon sekresyonunu baskılayarak kan şekerini düşürür, kardiyovasküler performansı iyileştirir, gıda alımını baskılayarak vücut ağırlığını azaltır. GLP-1 idrar ve sodyum atılımının dışında su alımını azaltır, pankreas adacıklarının proliferasyonunu uyarır, gastrik asit sekresyonunu inhibe eder. Hafıza ve öğrenmeyi artırır. Kaslar, kemikler, böbrekler, karaciğer olmak üzere çok sayıda dokuda koruyucu ve düzenleyici etkileri olduğu gösterilmiştir(Şekil 2.6)(52).

GLP-1'in yarılanma ömrü çok kısa olduğundan ilaç olarak kullanılmamakta olup onun yerine GLP-1 gibi davranan agonistleri kullanılmaktadır. Potansiyelinin geliştirilmesi için biyokimyasal olarak değiştirilmiş olan GLP-1 reseptör agonistleri, tip 2 diyabet tedavisi için başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Yalnızca diyabet için değil obezite tedavisi için de bir çok GLP-1 tabanlı ilaç tedavileri değerlendirilmektedir(52).



Şekil 2. 6. GLP-1 in doğrudan ve ya dolaylı olarak metabolizma üzerine etkileri(52).

2.6.1. Liraglutid

Liraglutid, doğal glukagon benzeri peptit-1 ile %97 amino asit homolojisine sahip bir açillenmiş glukagon benzeri peptit-1 analogudur. Doğal GLP-1 ile karşılaştırıldığında liraglutid, 34. Pozisyonda arginin ile değiştirilmiş lizine sahiptir. Ayrıca 26. Pozisyondaki lizin N-palmitoil-1-glutamik asitin'in γ -karboksil grubu ile ϵ -amino grubu üzerinde açillenmiştir. Büyük olasılıkla liraglutid enjeksiyonu sonrası, baskın plazma proteini olan insan serum albüminine bir yağ asidi bağlama bölgesi yoluyla kovalent olmayan bir şekilde bağlanır(57).

GLP-1 reseptörü agonistleri, tip 2 diyabet için glukoz bağımlı insülin salgılanmasını destekler. Ve glukagon salınımını inhibe eden köklü bir terapötik grubu oluşturur(57). Ayrıca GLP-1 agonistlerinin miyokard enfarktüsünden sonra sol ventrikül performansını iyileştirme ve kardiyak iskemiye ve aterosklerozun ilerlemesine karşı koruma gibi doğrudan faydalarının olduğu bildirilmiştir. Ek olarak, inkretin bazı tedavinin, glisemik kontrole atfedilebilenlerden bağımsız olarak kalp koruyucu etkileri nedeniyle diyabetli kalp yetmezliği hastalarının tedavisi için yeni bir terapötik stratejiyi temsil edeceği öne sürülmüştür. Yapılan bir çalışmada GLP-1 analogu liraglutidin, tip 1 diyabetli sıçanlarda 5' AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK)-Sirt1 yolağının aktivasyonu yoluyla miyokardiyal steatoz, oksidatif stres ve apoptoza karşı koruduğu gösterilmiştir(58).

Klinik kullanımda baskın olan GLP-1 reseptörü agonisti liraglutiddir. Diğer GLP-1 reseptörü agonistlerine kıyasla bire bir çalışmalarda yüksek düzeyde glisemik fayda göstermiştir. Liraglutid ayrıca vücut ağırlığında ve sistolik kan basıncında azalma ve düşük hipoglisemi oranları dahil olmak üzere birçok başka klinik faydaya sahiptir(57).

Liraglutidin, tip-2 diyabet tedavisinde glisemik kontrolü iyileştirdiği ve inflamasyonda nötrofil ekstrasvazyonunu önlediği tahmin edilmiştir. Bu bağlamda fare akciğer ve karaciğer kanserlerine yapılan liraglutid muamelesi, Nötrofil ekstraselüler tuzaklarını azaltarak anti-tümör etkinlik göstermiştir(59).

Liraglutidin kanser tedavisi için potansiyel bir strateji olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda endometrial kanserde liraglutidin kanser hücrelerinin büyümesini doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği, AMPK sinyal yolu aracılığıyla otofajiyi uyardığı ve yine bu yolakla apoptozu indüklediği sonucuna varılmıştır(60).

Liraglutid, glikoz homeostazını iyileştiren ve vücut ağırlığını azaltan, güçlü ve uzun etkili, antiinflamatuvar etkisi olan bir GLP-1 agonistidir. İnsan prostat ve pankreas kanserlerinde anti-proliferatif etkisi olduğu rapor edilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda obezite ile ilişkili meme kanserinde, liraglutidin, kanser hücrelerinin büyümesini bloke ederek etki gösterdiği görülmüştür(61).

Aşırı kilolu ve tip 2 diyabete sahip bireylerde meme kanseri risk faktörleri olduğundan, yüksek riskli popülasyonlarda GLP-1 agonistleri ile yapılan farmakolojik müdahalenin meme kanserini önleyip önlemediği ile ilgili çalışmalar bu konunun aydınlatılması için yol gösterici olacaktır(7).

2.7.Hipotez

Diyabetin meme kanseri riskini artırdığı yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Diyabet ilacı olarak kullanılan, GLP-1 reseptör agonisti liraglutidin farklı kanser türlerinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, çalışmamız için ‘liraglutid meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını azaltır ve apoptozu uyarır’ hipotezini ileri sürmüş bulunmaktayız.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

3.1.1. Cihazlar

Cihaz	Marka
Azot tankı	International Cryogenics
Buz makinesi	Nüve
Hassas terazi	A&D
Isı bloğu	Benchmark
İnkübatör	Euro Clone Safegrow
Kemolüminesans	ChemiDoc-It2
Laminer hava akımlı kültür kabini	Euro Clone Safegrow 1.2
Manyetik karıştırıcı	Daihan
Mikroskop	Olympus
pH metre cihazı	Mettler Toledo
Santrifüj cihazı	Hermle
Soğutmalı santrifüj	Hermle
Çalkalayıcı	Benchmark Scientific
Spektrofotometre cihazı	Emax Plus
Su banyosu (benmari)	Benchmark
Western Blot tankı	Bio-Rad
Vorteks	Heidolph

3.1.2. Kimyasal Maddeler, Malzemeler ve Kitler Marka

Dimetil Sülfoksit	Merck
DMEM F12 1:1 mix	Sigma
L-glutamin	Capricorn
Fetal Bovine Serum	Capricorn
Penisilin-Streptomisin	Capricorn
Etil Alkol	Merck
Phosphate-Buffered Saline	Capricorn
Metil Alkol	Merck
PI	Chem Cruz

Mikropipetler	Ependorf
Liraglutid	Abcam
<hr/>	
CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega
Protein Assay Kit	Bio-Rad
FITC Annexin-V Apoptosis Detection Kit with PI	Biolegend

3.1.3. Antikorlar

β -actin	NeoMarkers
α -tubulin	Santa-Cruz
p53	Santa-Cruz
belcin-1	Santa-Cruz
Donkey (anti-rabbit)	Santa-Cruz
Goat (anti- mouse)	Santa-Cruz
Goat (anti- rabbit)	Santa-Cruz
Rabbit (anti-mouse)	Santa-Cruz

3.2. Metotlar

3.2.1. Hücre Kültürü

Tablo 3. 1. Hücreler ve Özellikleri

MDA-MB-231	MCF-7
ATCC Kodu: HTB-26™	ATCC Kodu: HTB-22™
Doku: Meme	Doku: Meme
Hücre Tipi: Epitel	Hücre Tipi: Epitel
Organizma: <i>Homosapiens</i>	Organizma: <i>Homosapiens</i>
Hastalık Adı: Adenokarsinom	Hastalık Adı: Adenokarsinom
Büyüme Özelliği: Yapışan (Adherent)	Büyüme Özelliği: Yapışan (Adherent)
(ER-, PR-, Her2-)	(ER+, PR+, Her2+)

Çalışma için kullanılan bütün hücreler ATTC (American Type Culture Collection)'den ticari olarak temin edilmiştir. MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücreleridir. Çalışmada bu hücrelerin tercih edilmesinin sebebi liraglutidin HER2'yi ifade eden meme kanseri hücresi ve etmeyen meme kanseri hücresini nasıl etkilediğini ortaya koymaktır.

Hücre kültürü çalışmasının aşamalarında, her iki hücre hattı için 100 µg/ml penisilin-streptomisin, % 10 FBS ve 2 mM L-glutamin bulunduran DMEM:F12 besi yeri kullanılmıştır.

Hücre kültürünün basamakları, laminar akımlı kabin içinde gerçekleştirilmiştir. Hücreler, 37 C° sıcaklıkta ve %5 CO₂ ortamında nemlendirilmiş inkübatörde yetiştirilmiştir.

3.2.2. Hücrelerin Çözülmesi

DMEM F-12-1:1 besi yerleri, 37 C° deki bir benmariye konmuştur. Azot tankında dondurma tüplerinde muhafaza edilen hücrelerin, tanktan çıkarılarak çözülmesi sağlanmıştır. Çözülen hücrelerin süspanse hale gelmesi için pipetaj yapılmış, 15ml'lik falkon tüplerine alınmıştır. Hücrelerin üzerlerine 5 ml besi yeri eklenip 5 dakika 1300 rpm'de santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatant uzaklaştırılıp 4 ml besi yeri peletin üzerine eklenmiştir. Daha sonra 25 cm²'lik flasklara alınıp hacim 6 ml'ye kadar tamamlanmıştır.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak %70 doluluk oranına ulaşan hücrelerin 3-4 günde bir olarak pasajlama işlemi yapılmıştır. Pasaj işleminde ilk olarak hücrelerin üzerindeki besi yeri uzaklaştırılmıştır. Flasklara 2 ml tripsin ilave edilip %5 CO₂ içeren 37°C sıcaklıktaki inkübatörde 5-6 dakika bekletilmiştir. Daha sonra faz kontrast mikroskobu kullanılarak, hücrelerin yapıştıkları yüzeyden kalkma durumları gözlemlenmiştir. Ardından 5-6 ml besi yeri eklenip tripsinin etkisi inhibe edilmiştir. Hücre ve besi yeri karışımı 15 ml'lik falkon tüplerine konularak 1300 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet elde edilmiştir. Hücreler pelet miktarına göre DMEM F-12-1:1 besi yeri ile süspanse edilerek homojen edilmiştir. Homojen hale geldikten sonra 25 cm²'lik flasklara alınmıştır. Hücreler %5 CO₂ içeren 37 C° deki etüvde inkübe edilmiştir.

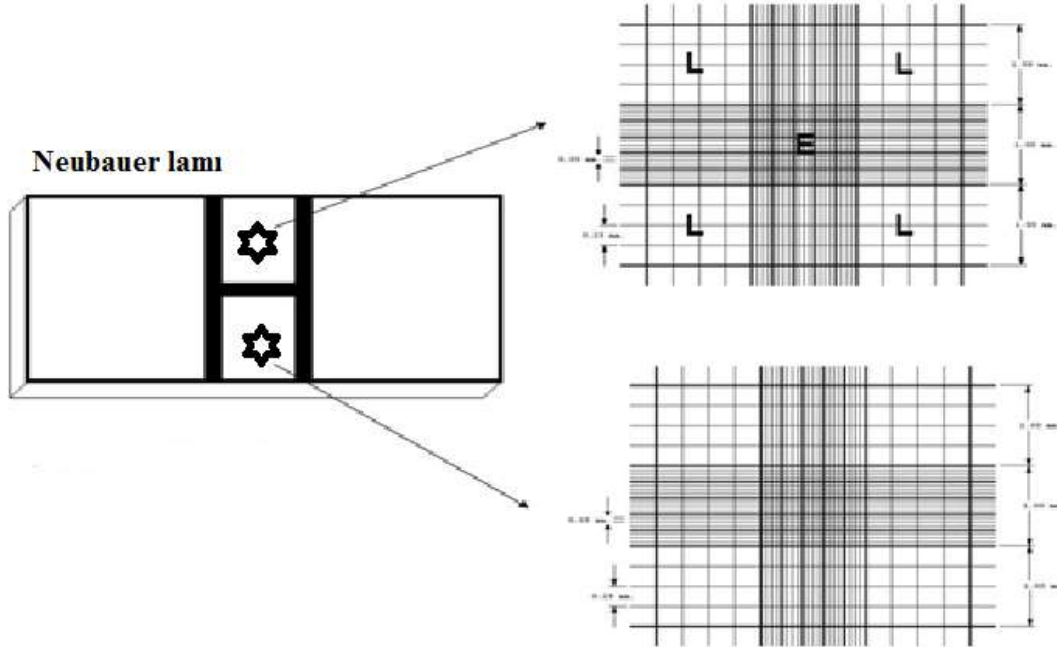
3.2.4. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler T-25 flaskların yüzeyini %80 kapladıktan sonra PBS ile yıkanmıştır. Ardından tripsinle yapıştıkları yüzeyden kaldırılarak 15 ml'lik falkon içerisine alınmıştır. Ardından 1500 rpm'de, 5 dakika santrifüjlenmiştir.

Süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından peletin üzerine her bir dondurma tüpüne 2 ml olacak şekilde 1:10 oranında DMSO besiyeri hazırlanarak eklenmiştir. Dondurma tüplerine konulan hücreler bir gün -80 C°'de bekletilip ardından -196 C° olan azot tankına yerleştirilmiştir.

3.2.5. Hücrelerin Sayılması

Deneyle için gereken hücre sayısını belirlemek amacıyla, hücrelere sayım işlemi yapılmıştır. Sayım, üzerinde 16'şar kare ve toplam dört alanı bulunan neubauer lamı kullanılarak yapılmıştır. Toplam dört alanın içerisinde bulunan hücreler sayılmıştır. Ortalamaları hesaplanarak, alan başına düşen (ortalama) hücre sayısı bulunmuştur(Bkz. Şekil 3.1.).



Şekil 3. 1. Neubauer Lam

3.2.6. Hücre Lizatı Elde Edilmesi

Kültürü yapılan ve flasklara yapışık halde bulunan hücreler, bölüm 3.2.3.'de pasaj işleminde belirtildiği şekilde kaldırılmıştır. Kaldırılan hücreler 15 ml'lik falkon tüplerine alınıp 5 dakika 1700 rpm de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletin üzerine 1 ml PBS eklenmiş, hücreler 1.5 ml'lik ependorf tüplerine konulmuştur.

Tüpler 5000 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletin üzerine hücre miktarına göre (2 milyon hücre de 160µl lizis tampon) lizis solüsyonu (2mL Lizis solüsyonuna 2 µL Na₃VO₄, 2µL NaF olacak şekilde) eklenmiştir. Karışım 15 sn. vorteks edilmiştir. Ardından 10 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Yapılan işlem 3 kere daha tekrarlanmıştır. Süspansiyon +4 °C de 13000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Son olarak süpernatant alınarak yeni bir ependorf tüpe konulmuştur.

3.2.7. Protein Miktarının Ölçülmesi

Total protein miktarının belirlenmesi için hücrelerden elde edilen lizatlara Protein Assay kit (Biorad) ile Bradford yöntemi uygulanmıştır. Bradford yönteminde 3 solüsyon karışımı kullanılmıştır. Bu karışımlar: Protein Assay Reagent-A, Protein Assay Reagent-B, Protein Assay Reagent-S.

Bradford yönteminde kullanılması amacıyla BSA (Bovine Serum Albumin) standardı hazırlanmıştır. 1 ml dH₂O'da 10 mg BSA çözdürülmüştür. Bu ana stok solüsyondan seri dilüsyonla 0.25, 0.5, 1 ve 2 ug/ul'lik standartlar hazırlanmıştır.

dH₂O ve hazırlanan her 4 standart, her bir kuyucukta 5 µl hacimde olacak şekilde eklenmiştir. Daha sonra 20 ul reagent S ve 1000 ul Reagent A'dan örnek adedine göre karışım hazırlanmıştır. Sonrasında her bir kuyucuğa standart dışında 25 ul ekleme yapılmıştır. Daha sonra üzerlerine 200 ul reagent B solüsyonundan eklenmiştir. Ölçüme hazır hale gelen örnekler plate'te (96 kuyulu) iken 750nm'de ölçüm işlemi yapılmıştır.

3.2.8. Western Blot Analizi

Tablo 3. 2. Western Blot İçin Kullanılacak Karışımların Oranları

10x TBS (Tris Buffer Salin) (1 lt) (+4°C)	1x TBS/Tween (1 lt)
31,5 g Tris-HCl <input type="checkbox"/>	900 ml dH ₂ O <input type="checkbox"/>
80 g NaCl <input type="checkbox"/>	100 ml TBS <input type="checkbox"/>
ph= 7,6 <input type="checkbox"/>	2 ml Tween-20 <input type="checkbox"/>

10x Yürütme Solüsyonu (1 lt) (+4°C)	1x Yürütme Solüsyonu (1 lt)
30 gr Tris <input type="checkbox"/>	100 ml 10x Yürütme Solüsyonu <input type="checkbox"/>
144 gr Glisin <input type="checkbox"/>	%10 SDS 10ml <input type="checkbox"/>
	890 ml dH ₂ O <input type="checkbox"/>

Transfer Solüsyonu (1 lt) (+4°C)	Yükleme Solüsyonu (-20°C)
100 ml 10x Yürütme Solüsyonu <input type="checkbox"/>	7 ml 0,5 M Tris-HCl ph:6,8 <input type="checkbox"/>
700 ml dH ₂ O <input type="checkbox"/>	3,6 ml Gliserol <input type="checkbox"/>
200 ml Metanol <input type="checkbox"/>	1 g SDS <input type="checkbox"/>
	1,2 mg Bromofenol Blue <input type="checkbox"/>

%18'lik Ayırıcı Jel	%12'lik Depolayıcı Jel
2,6 ml dH ₂ O <input type="checkbox"/>	2,6 ml dH ₂ O <input type="checkbox"/>
1.1ml %30 ACA/bisACA <input type="checkbox"/>	3.2ml %30 ACA/bisACA <input type="checkbox"/>
1.1.25ml 0.5M Tris-HCl pH 6.8 <input type="checkbox"/>	2ml 1.5M Tris-HCl pH 8.8 <input type="checkbox"/>
50µl %10 SDS <input type="checkbox"/>	80µl %10 SDS <input type="checkbox"/>
50 µl %10 APS <input type="checkbox"/>	80µl %10 APS <input type="checkbox"/>
5 µl TEMED kullanıldı. <input type="checkbox"/>	

Çalışmadaki hücrelerin lizati elde edildikten sonra 3.2.7'de açıklandığı gibi protein ölçümü yapılmıştır. Her lizattan 40µg total protein içeren örnekler 90V'da SDS-PAGE elektroforezi ile yürütülmüştür. Ve yürütme ile PVDF membrana transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu membran daha sonra Tween-20 bulunduran TBS (Tris-Buffer-Salin) (TBS/T) ile birlikte uygulanan %5'lik süt tozu karışımında bir saat blotlanmıştır. TBS/T muamelesi 10'ar dakika ara ile 3 kez tekrarlanmıştır. %2.5'lük süt tozu içerisinde

1:1000 oranı ile dilue edilen p53 ve becn-1 antikorları ile bir gün +4°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ardından TBS/Tween-20 ile 3 kez 10 dakika ara ile yıkanmıştır. Yine TBS/Tween-20 ile %2.5’luk süt tozu solüsyonunda sekonder antikorları ile oda sıcaklığında bulunan çalkalayıcı üzerinde bir saat bekletilmiştir.

Hedef proteini tespit için membran, 3 kez TBS/Tween-20 tamponu ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi yapıldıktan sonra, luminol ve peroksit 1:1 oranında karıştırılarak membrana uygulanmıştır. Daha sonra, UVP ChemiDoc-It2 kemoluminesans cihazı kullanılarak şeffaf petri kabı içinde görüntüleme işlemi yapılmıştır. Örneklerin yüklenme durumunun kontrolü için β -aktin antikorları kullanılmıştır. Sekonder antikor işleminden sonra, TBS-Tween ile yıkanarak görüntülenmiştir. ImageJ programı kullanılarak bant yoğunlukları tespit edilmiştir.

3.2.9. Annexin V Boyaması ile Apoptozun Belirlenmesi

T-25 cm² flaklara MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için 1.5x10⁵ sayıda hücre ekimi yapılmıştır. 24 saatlik sürenin ardından IC₅₀ dozu belirlenen liraglutid tedavisi yapılmıştır. 72 saat periyodun tamamlanmasının ardından hücreler üzerinde bulunan besi yeri falkon tüplere alınmıştır. Yapışan hücreler tripsinle kaldırılıp falkon tüplere eklendikten sonra 1500 rpm’de 5dk santrifüjlenmiştir. Daha sonra resüspanse olması için 500 ul soğuk PBS eklenmiştir. Tekrar 1500 rpm’de 5 dk santrifüjlenmiştir. Her bir hücre için, 400 ul 1X binding hazırlanarak buza konulmuştur.

Tablo 3.3.’e göre 100 ul anneksin inkübasyon karışımı her bir hücre için hazırlanmıştır.

Tablo 3. 3. Anneksin V Boyamasında Kullanılan Kimyasalların Oranları

10X-Binding	10 μl
Propidyum iyodür	5 μl
Anneksin	5 μl
dH₂O	80 μl
Total hacim	100 μl

Hazırlanan karışım karanlık ortamda, buz üzerinde 10 dakika kadar bekletilmiş ve buz üzerinden alınmıştır. Her bir tüp içerisine 100 ul eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında

bekletilmiştir. Sonra üzerine 400 µl Binding-1X eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika-1 saat arası bekletilmiştir. Sonrasında ölçüm için akış sitometrisi kullanılmıştır.

3.2.10. Hücre Proliferasyon Testi- MTS

Çalışmada kullanılan liraglutidin hücrelerin çoğalması üzerindeki etkisini gözlemlemek için, her bir kuyucuk 1.5x10³ hücre içerecek şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekim yapılmıştır. Ve 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda çeşitli dozlarda liraglutid ile tedavi uygulanmıştır. 72 saatlik tedavi süresini tamamlaması için inkübatörde bekletilmiştir.

72 saat tamamlandıktan sonra CellTiter-96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega kiti ile 20 µl MTS solüsyonu her bir kuyucuğa eklenmiştir. İnkübatörde 2 saat, renk değişim durumu kontrol edilerek bekletilmiştir. Ardından 490 nm 'de spektrofotometre ölçümü yapılmıştır

3.2.11. Yazılım ve Veritabanları

Image J	Western Blot sonuçlarının analizi
M. Office 365 Excel	Elde edilen sonuçları grafiğe dökülmesi
Graph Pad Prism 9	Grafik çizim yazılımları

Image J analiz programı Western Blot sonuçlarının sayısal verilere dökülmesi için kullanılmıştır. Sonrasında elde edilen veriler, Excel'de analiz edilmiştir.

3.2.12. İstatistiksel Analiz

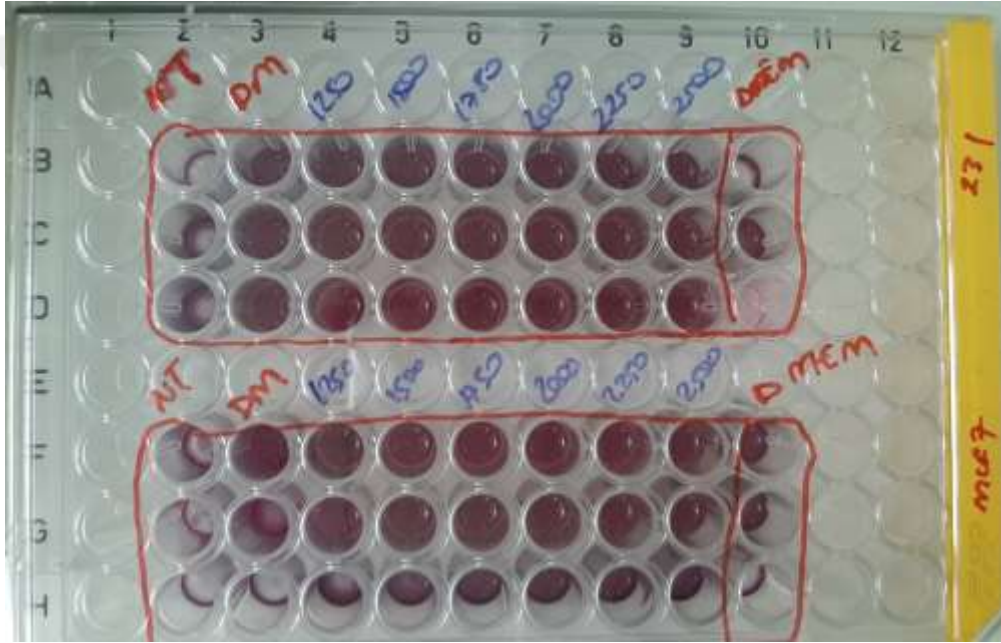
Yapılan çalışmaların sonuçlarının değerlendirilmesi için student t testi kullanılmış ve p değerinin 0.05'den küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Liraglutid ile Muamele Edilen Hücrelerin Proliferasyonu ve Hayatta Kalımı

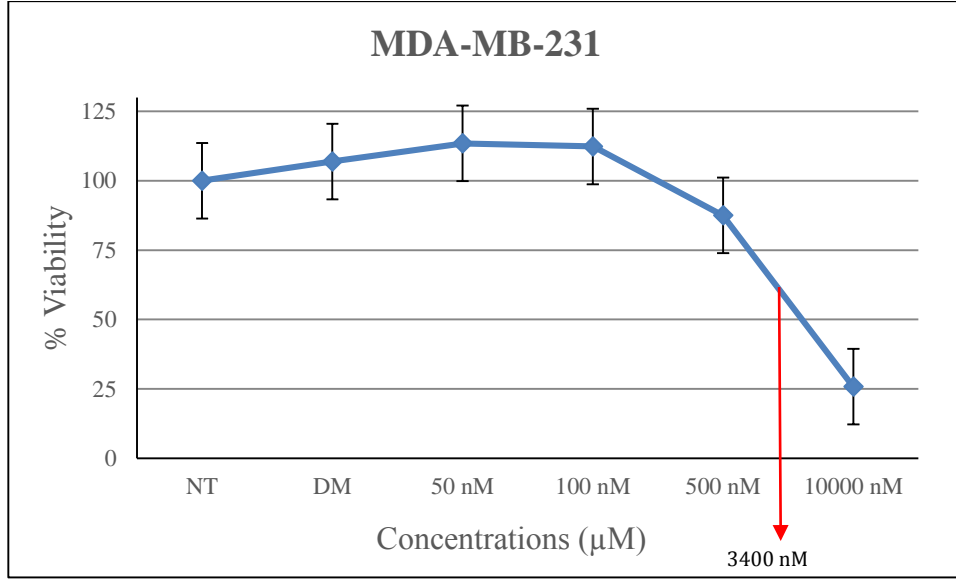
Liraglutidin hücrelerin proliferasyonu üzerindeki etkisinin gözlemlenmesi ve sitotoksitenin belirlenmesi için MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde MTS analizi yapılmıştır. Liraglutidin belirli dozlarda uygulanmasından 72 saat sonra analiz yapılarak IC50 konsantrasyonu belirlenmiştir.

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları için yapılan ekimin plaka görüntüleri Şekil 4.1. 'de gösterilmiştir.

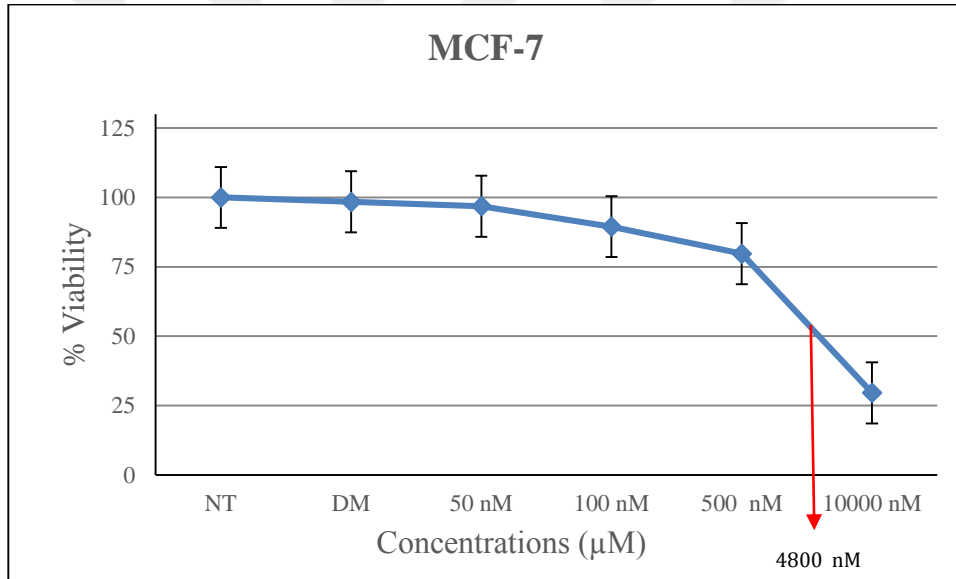


Şekil 4. 1 MTS analizi sonrası MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hattı plakalarının görüntüleri

Spektrofotometre cihazında okutma işlemi yapıldıktan sonra IC50 oranları MDA-MB-231 için 3400 nM, MCF-7 için 4800 nM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. 2. MDA-MB-231 hücre hattının liraglutid konsantrasyonları sonrası hücre canlılığı grafiği



Şekil 4. 3. MCF-7 hücre hattının liraglutid konsantrasyonları sonrası hücre canlılığı grafiği

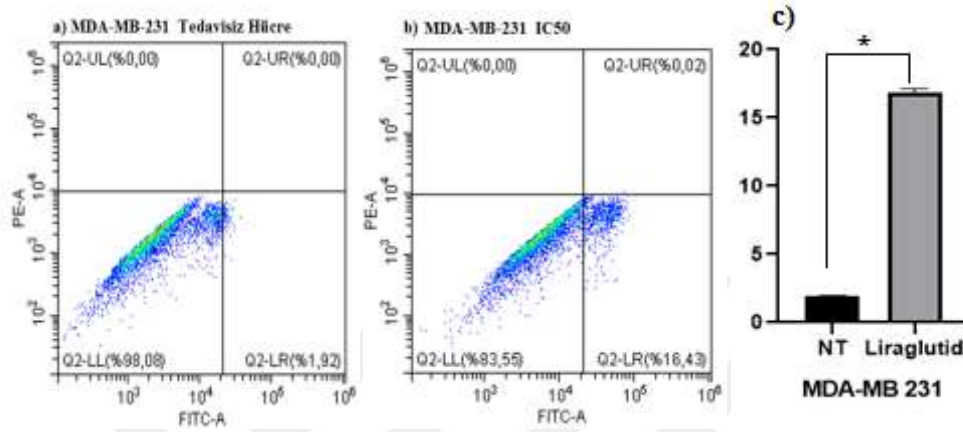
Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.'da görüldüğü gibi 72 saat sonra her iki hücre hattında da liraglutid tedavisi ile hücre canlılığının tedavisiz gruba göre azalmalarının olduğu görülmüştür.

4.2. Anneksin PI Boyanması ile Apoptoz Tespiti

Hücre ölümünün tespiti için Anneksin V ve PI boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ölen hücrelerin dış yüzeyinde transloke olan fosfatidilserin molekülleri ile bağlanarak apoptotik hücrelerin görünür hale gelmesini sağlayan FITC ile konjuge olan bir mantığa dayanmaktadır.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları, liraglutid tedavisinden 72 saat sonra toplanılmış ve apoptotik hücrelerin tespiti için gerekli olan anneksin V ve PI boyama protokolleri uygulanmıştır.

Şekil 4.4.'de MDA-MB-231 hücre hatlarının akış sitometrisi ile elde edilen analiz sonuçları gösterilmiştir.

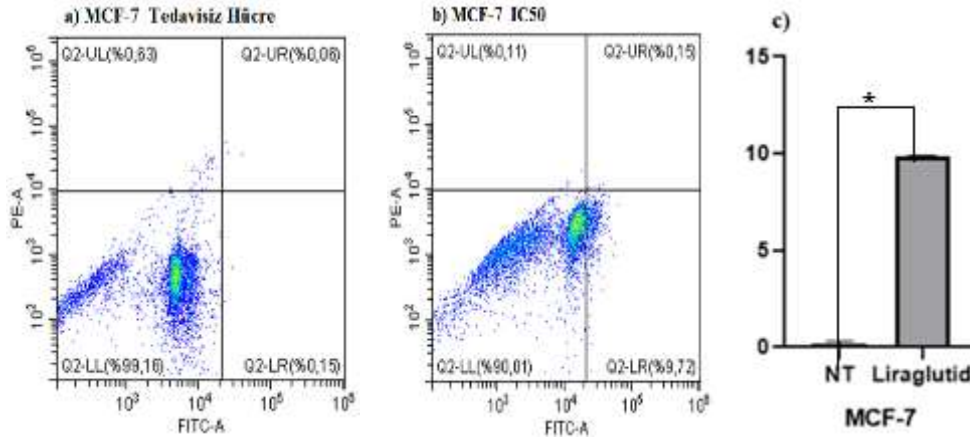


Şekil 4. 4. MDA-MB-231 hücre hatlarında tedavisiz ve IC50 3400 nM liraglutid uygulaması sonucu oluşan apoptoz yüzdeleri gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, hücre apoptozunun belirlenmesi için yapılan Anneksin V ve PI boyama yöntemi sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir(c). Bu grafikte, tedavi grubu ve tedavisiz grup arasında yüzdelik hücre sayıları karşılaştırılmıştır. Unpaired t testi ile belirlenen istatistiksel anlamlılık seviyesi $p < 0.05$ olarak hesaplanmış ve sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlar, MDA-MB-231 hücre hattında yapılan liraglutid uygulamasının hücre apoptozunu uyarmada etkili olduğunu göstermektedir. Tedavisiz grupta bulunan hücrelerin yüzdesi liraglutid uygulanan hücrelerin yüzdesi karşılaştırıldığında, 3400 nM liraglutid uygulaması sonrasında hücrelerde oluşan ölüm oranı %16.45 iken tedavisiz grupta bu oran %1.92'dir. Bu sonuçlar, liraglutidin MDA-MB-231 hücre hattında apoptozu uyardığını göstermektedir.

Ayrıca yapılan analizlerde, liraglutid uygulamasının hem erken hem de geç apoptoz yüzdelerinde artışa neden olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar liraglutidin apoptozu uyarıcı etkisinin hücre ölümünün farklı aşamalarında da rol oynadığını göstermektedir.

Şekil 4.5.'de MCF-7 hücre hatlarının akış sitometrisi ile elde edilen analiz sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 4. 5. MCF-7 hücre hatlarında tedavisiz (a) ve IC50 4800 nM liraglutid (b) uygulaması sonucu oluşan apoptoz yüzdeleri gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, hücre apoptozunun belirlenmesi için yapılan Annexin V ve PI boyama yöntemi sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir(c). Bu grafikte, tedavi grubu ve tedavisiz grup arasında yüzdelik hücre sayıları karşılaştırılmıştır. Unpaired t testi ile belirlenen istatistiksel anlamlılık seviyesi $p < 0.05$ olarak hesaplanmış ve sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

MCF-7 hücre hattında yapılan liraglutid uygulamasının hücre apoptozunu uyardığına dair sonuçlar elde edilmiştir. Tedavisiz grupta bulunan hücrelerin yüzdesi ile liraglutid uygulanan hücrelerin yüzdesi karşılaştırıldığında, 4800 nM liraglutid uygulaması sonrasında hücrelerde oluşan ölüm oranı %9.87 iken kontrol grubunda bu oran %0.21'dir.

Flow sitometri kullanılarak yapılan analizlerde, liraglutid uygulamasını hem erken hem de geç apoptoz yüzdelerinde artışa neden olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar liraglutidin apoptozu uyarıcı etkisinin hücre ölümünün farklı aşamalarında da rol oynadığını göstermektedir.

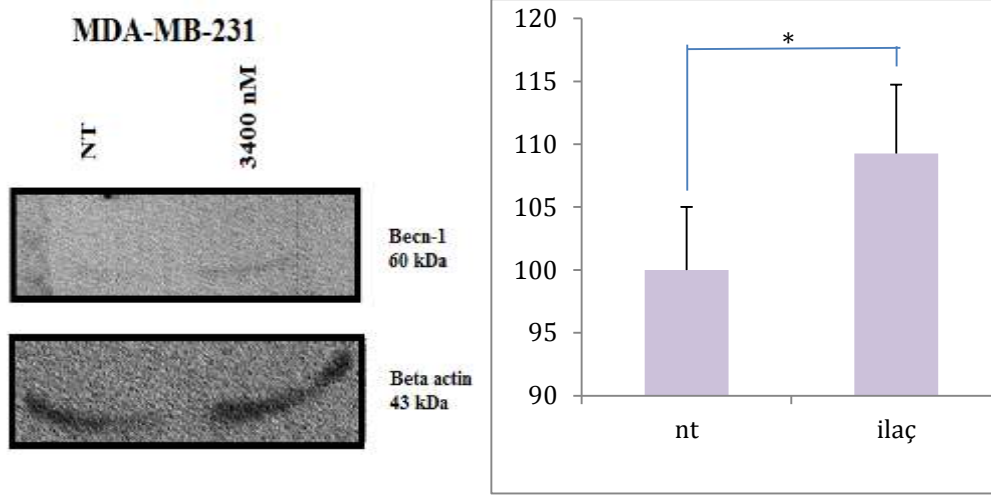
4.2. Liraglutidin Hücre Ölümündeki Rolünün Western Blot ile Belirlenmesi

Western blot, bir proteinin belirli bir boyutta olduğunu doğrulamak için kullanılan bir teknik olduğundan çalışmada kullanılmıştır.

MDA-MB-231 hücre hattında beclin-1'in ifadesi Şekil 4. 6. 'da gösterilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan 3400 nM liraglutid muamelesi ile beclin-1 ifadesinin ilaç verilen grupta artışı görünmektedir. Bu artış yapılan hesaplamalar sonucunda, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

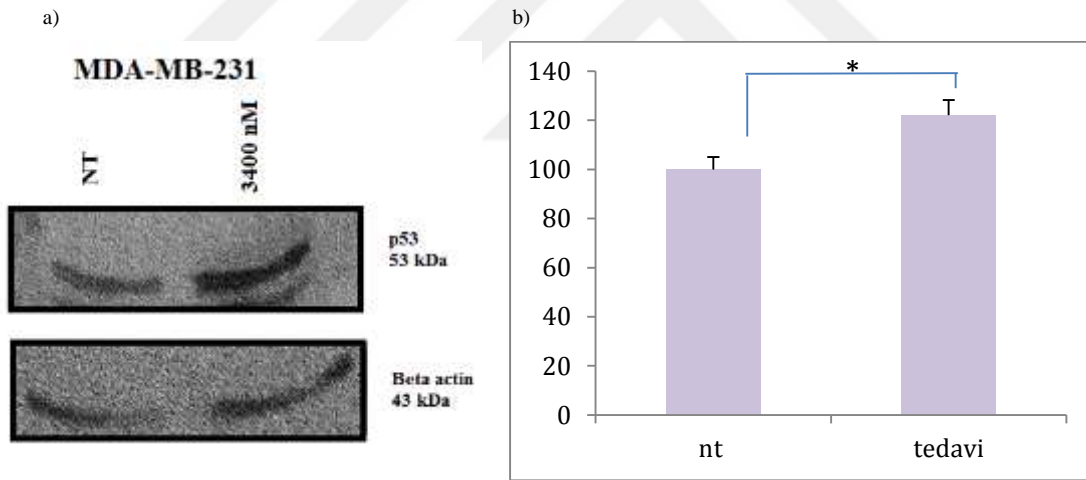
a)

b)



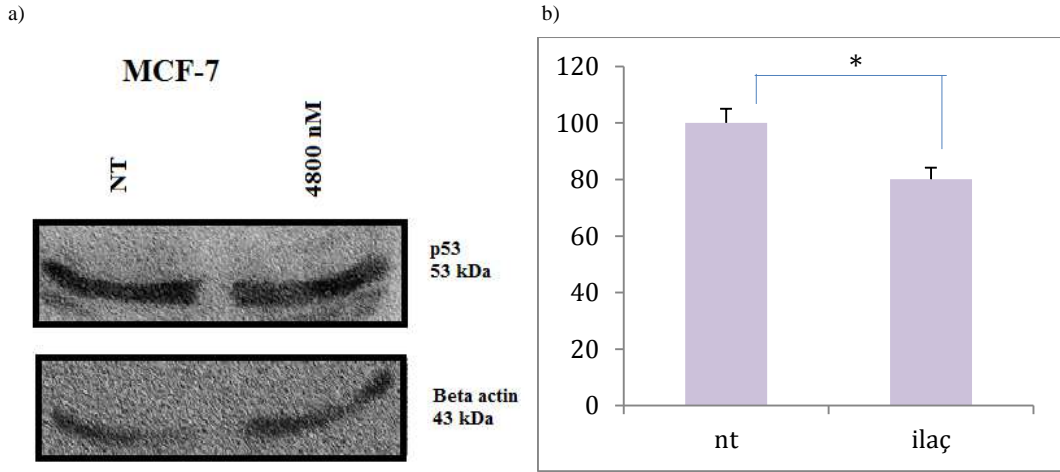
Şekil 4. 6 MDA-MB-231 hücre hattında beclin-1 ifadesinin artışının görüntüsü (a) ve grafiği (b) ($p<0.05$)

MDA-MB-231 hücre hattında p53'ün ifadesi Şekil 4. 7. 'da gösterilmiştir. 3400 nM liraglutid uygulamasının p53 ifadesi üzerindeki etkisi kontrol grubuna kıyasla, anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0.05$).



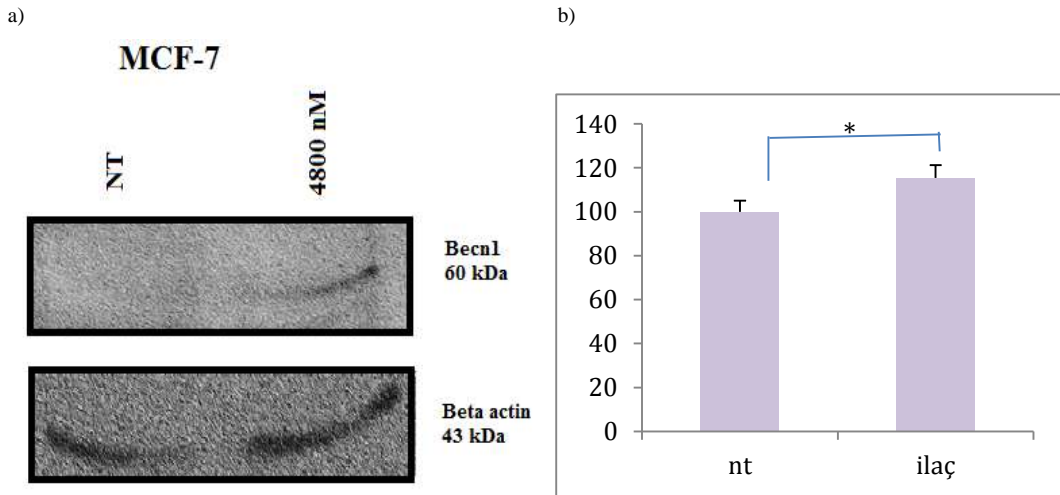
Şekil 4. 7. MDA-MB-231 hücre hattında p53 ifadesinin artışının görüntüsü (a) ve grafiği (b) ($p<0.05$)

MCF-7 hücre hattında p53'ün ifadesi Şekil 4. 8. 'da gösterilmiştir. MCF-7 hücrelerine uygulanan 4800 nM liraglutid muamelesi ile p53 ifadesinin ilaç verilen grupta azaldığı görülmektedir. . Bu azalış yapılan hesaplamalar sonucunda, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 4. 8 MCF-7 hücre hattında p53 ifadesinin azalışının görüntüsü (a) ve grafiği (b) ($p<0.05$)

MCF-7 hücre hattında beclin-1'in ifadesi Şekil 4. 8. 'da gösterilmiştir. MCF-7 hücrelerine uygulanan 4800 nM liraglutid muamelesi ile beclin-1 ifadesinin ilaç verilen grupta azaldığı görülmektedir. Bu azalış yapılan hesaplamalarla, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 4. 9 MCF-7 hücre hattında becn-1 ifadesinin artışının görüntüsü (a) ve grafiği (b) ($p<0.05$)

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve ölümlere neden olan önemli bir hastalıktır. Kadınlarda en sık görülen kanser türü olmasına rağmen erkeklerde de görülmektedir. Risk faktörleri arasında yaş, aile öyküsü, genetik faktörler, hormon seviyeleri, obezite ve alkol tüketimi gibi faktörler yer alır. Meme kanseri tedavisi, kanserin türü ve evresine bağlıdır ve tedavi seçenekleri arasında kemoterapi, radyoterapi, hormonal tedavi ve hedefe yönelik tedavi gibi yöntemler yer alır(3).

Meme kanseri ve diyabet ilişkisi, son yıllarda yapılan birçok araştırmada incelenmiştir. Diyabet hastalarının meme kanseri geliştirme riskinin arttığına dair bazı bulgular vardır. Ve bu artışa neden olan obezite, yüksek insülin seviyeleri, yüksek kan şekeri seviyeleri ve inflamasyon gibi faktörlerdir.

Diyabet tedavisinde liraglutid gibi GLP-1 reseptör agonisti ilaçlar kullanılmaktadır. Bazı çalışmalar, GLP-1 reseptör agonisti ilaçların meme kanseri riskini azaltabileceğini öne sürmüştür(51).

Piccoli ve ark. (62) GLP-1 reseptör agonisti uygulanan deneklerin yüksek meme neoplazmi riskine sahip olup olmadığını değerlendirmek için bir meta analiz yapmışlardır. Bu analize göre GLP-1 reseptör agonisti ile tedavinin meme kanseri riskini artırmadığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada, GLP-1 reseptör agonisti liraglutidin meme kanseri hücreleri üzerindeki anti-kanser etkisi incelenmiştir. Liraglutidin farklı konsantrasyonlarının apoptoz üzerinde olumlu etkiler gösterdiğini ve hücre tipine göre farklılık gösterdiği görülmüştür.

Shadboorestan ve ark. (63) liraglutidin MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerini araştırmış ve 50 nM liraglutid konsantrasyonunun önemli bir etki yaratmadığı sonucuna varmışlardır. Ancak 1000 nM ve 5000 nM arasındaki liraglutid konsantrasyonlarının hücre proliferasyonunu inhibe ettiği sonucuna ulaşmışlardır.

Çalışmamızda, MTS testi kullanılarak MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarındaki liraglutid konsantrasyonlarının farklı nM'ları ile hücre canlılığı tespit edildi. Bulgularımız, liraglutidin meme kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif etkileri olduğunu ve bu etkinin hücre hattına bağlı olarak farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra, MDA-MB-231 hücrelerinin, MCF-7 hücrelerine göre daha düşük bir IC50 konsantrasyonuna sahip olduğu belirlenmiştir.

Zhao ve ark. (64) Liraglutidin MCF-7 hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkilerini flow sitometri ile değerlendirmişlerdir. 48 saat boyunca 1000 nM liraglutide ile tedavi edilen grubun, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında apoptotik hücre yüzdesinde bir artışa tol açtığı görüldü. Erken ve geç apoptoz yüzdelerini tedavi ve kontrol grubuyla analiz ettiklerinde geç apoptozu istatistiksel olarak anlamlı buldular. Buldukları sonuç liraglutidin MCF-7 hücrelerinin apoptozunu destekleyebileceğini göstermiştir.

Flow sitometri tekniğini kullanarak yaptığımız çalışma sonrası analizlerde, hem MDA-MB-231 hem de MCF-7 hücre hatlarına yapılan liraglutid uygulamasının hem erken hem de geç apoptoz yüzdelerinde artışa neden olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar liraglutidin apoptozu uyarıcı etkisinin hücre ölümünün farklı aşamalarında da rol oynadığını göstermektedir.

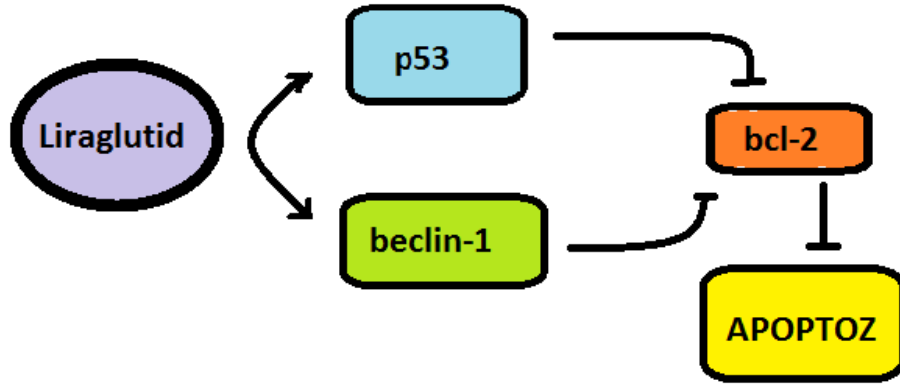
Wijshake ve ark. (65) Beclin 1'in MCF-7 meme kanseri büyümesini önleyen bir mekanizma belirlediler. Çalışmaya göre Beclin-1 tümör baskılayıcı işlevini E-cadherin varlığında göstermektedir. E-cadherin'in eksik olduğu hücrelerde Beclin-1'in tümör baskılayıcı işlevi kaybolmaktadır.

Bertozzi ve ark. (66) yaptığı bir çalışmada kemoterapiye dirençli meme kanserinin direnç gelişiminde etkili olabilecek bazı genlerin ifade düzeylerini araştırmışlardır. TFEB, SIRT1, CARM1 ve Beclin-1 genlerinin düşük ifade düzeylerinin olduğu görülmüştür.

Yaptığımız çalışmada, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları, liraglutid ile tedavi edildiğinde Beclin-1 seviyesinde anlamlı bir artış gözlemlendi. Bu sonuçlar, liraglutidin meme kanseri hücrelerindeki tümör baskılayıcı işlevi artırabileceğini göstermektedir.

Beclin-1, hücrelerin DNA hasarını onarma ve kanser hücrelerinin büyümesini engelleme işlevlerinde görev yapan bir proteindir(65). Bu nedenle liraglutidin, Beclin-1 seviyelerini artırarak kanser hücrelerinin büyümesini engellediği düşünülebilir.

P53 ifadesinin artması, hücrelerdeki DNA hasarının tespiti ve onarımını sağlar. Eğer hasar onarılmazsa, p53 apoptozis yoluyla hücrenin ölümünü tetikleyerek kanser hücrelerinin büyümesini engelleyebilir. Bu nedenle, p53'ün artan ifadesi, hücrelerin apoptoz yoluyla ölümünü artırabilir ve kanser hücrelerinin büyümesini engelleyebilir(67). MDA-MB-231 hücrelerine 3400 nM liraglutid muamelesi yaptığımız çalışmada p53 seviyesinde artış görülmüş ve bu artış yapılan hesaplamalar sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlar, p53 proteinin MDA-MB-231 hücrelerinde tümör baskılayıcı işlevi üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir. Ve p53 proteinin artması kanser hücrelerinin büyümesini engelleyebilir.



Şekil 5. 1 p53, beclin-1 ve apoptoz ilişkisi

Liraglutid, p53 ve beclin-1 gen ekspresyonunu artırır. Bcl-2 anti-apoptotik olduğundan p53 ve beclin-1, bcl-2 gen ekspresyonunu azaltarak apoptozu tetikler(Şekil 5.1).

MCF-7 hücre hatlarında 4800 nM liraglutid muamelesi sonrasında p53 protein ifadesinin kontrol grubuna göre azaldığı ancak istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, MCF-7 hücre hatlarında p53 proteininin tümör baskılayıcı işlevinin azalmış olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuçlar, farklı hücre hatlarının farklı genetik yapıya sahip olduğunu ve bu nedenle aynı proteinin bile farklı hücre hatlarında farklı etkilere sahip olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak meme kanseri ve diyabet arasındaki ilişki kompleks olmakla birlikte, diyabet hastalarının meme kanseri riskini arttırdığına dair bulgular vardır. Yapılan çalışmalar meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklemiş ve Liraglutid'in meme kanseri hücreleri üzerinde potansiyel bir anti-kanser etkisi olabileceği yönünde önemli bir bulgu sağlamıştır (62).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonuçları şöyle özetlenebilir;

Liraglutid ile tedavi edilen hücre hatları, belirlenen konsantrasyonlarla 72 saat sonra MTS testine tabi tutulmuştur. Sonuçlara göre, MCF-7 ve MDA-MB 231 hücre hatları için toksik etki gösterdiği görülmüştür.

Yapılan Anneksin V ve PI analizleri, liraglutidin MDA-MB-231 hücre hattında apoptozu uyardığı ve bu etkinin erken ve geç apoptoz yüzdelerinde artışa neden olduğu görülmüştür. Bu bulgular doğrultusunda liraglutidin MDA-MB-231 gibi agresif kanser hücre hatlarında apoptozu uyarması, tedavi seçeneklerinin çeşitliliğinin artırabilir.

MCF-7 hücre hattında yapılan liraglutid uygulamasının apoptozu uyardığı ve bu etkinin erken ve geç apoptoz yüzdelerinde artışa neden olduğu görülmüştür. Özellikle MCF-7 gibi hormon reseptör pozitif meme kanseri hücre hatlarında apoptozu uyarıcı etkisini göstermesi, tedavi seçeneklerinin çeşitliliğini artırabilir.

Bu bulgular her iki hücre hattı için de liraglutidin meme kanseri tedavisinde potansiyel bir ajan olarak kullanımının değerlendirilmesi gerektiğini öne sürmüştür.

Western Blot sonrası liraglutidin her iki hücre hattında da Beclin-1 seviyesini artırdığı, kanser hücrelerinin büyümesini engellemede potansiyel bir rol oynayabileceği görülmüştür.

Liraglutid uygulamasından sonra MDA-MB-231 hücrelerinde p53 ifadesinin artışı görülürken, MCF-7 hücre hattında p53 ifadesinin azaldığı görülmüştür. Bu nedenle, farklı hücre hatlarındaki protein ifadesi sonuçlarının değerlendirilmesi, kanser tedavisi gibi uygulamalarda daha doğru sonuçlar elde etmek için önemlidir.

Bu çalışma, meme kanseri tedavisinde liraglutidin kanser hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozuna karşı etkili olduğunu göstermiştir. Bu umut verici sonuçlar, liraglutidin meme kanseri tedavisinde potansiyel bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilirliğini düşündürmektedir.

Çalışmamız sadece in vitro koşullarda gerçekleştirilmiştir. Önerimiz, klinik çalışmaların yapılmasıdır. Bu çalışmalar, liraglutidin meme kanseri tedavisindeki etkinliğini daha ayrıntılı bir şekilde belirleyecek ve tedavinin yan etkilerini belirlemeye yardımcı olacaktır. Ayrıca, farklı kanser türleri ve farklı aşamalarda liraglutidin etkisini araştırmak da önemlidir.

Sonuç olarak liraglutid meme kanseri tedavisinde umut verici bir tedavi seçeneği olarak görünmektedir. Daha geniş ve in vivo ortamlarda yapılacak çalışmalarla bu bulgularımızın destekleneceği kanaatindeyiz.



KAYNAKLAR

1. Wilkinson L, Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern. *Br J Radiol* 2022, 95(1130):20211033.
2. Arnold M, Morgan E, Rungay H, Mafra A, Singh D, Laversanne M, Vignat J, Gralow JR, Cardoso F, Siesling S, Soerjomataram I. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast* (Edinburgh, Scotland). 2022, 66:15-23.
3. Sarhangi N, Hajjari S, Heydari SF, Ganjizadeh M, Rouhollah F, Hasanzad M. Breast cancer in the era of precision medicine. *Mol Biol Rep* 2022, 49(10):10023-37.
4. Karami Fath M, Azargoonjahromi A, Kiani A, Jalalifar F, Osati P, Akbari Oryani M, Shakeri F, Nasirzadeh F, Khalesi B, Nabi-Afjadi M, Zalpoor H, Mard-Soltani M, Payandeh Z. The role of epigenetic modifications in drug resistance and treatment of breast cancer. *Cell Mol Biol Lett* 2022, 27(1):52.
5. Boyle P, Boniol M, Koechlin A, Robertson C, Valentini F, Coppens K, Fairley LL, Boniol M, Zheng T, Zhang Y, Pasterk M, Smans M, Curado MP, Mullie P, Gandini S, Bota M, Bolli GB, Rosenstock J, Autier P. Diabetes and breast cancer risk: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2012, 107(9):1608-17.
6. Ma R, Yi B, Riker AI, Xi Y. Metformin and cancer immunity. *APC*. 2020, 41(11):1403-9.
7. Chequin A, Costa LE, de Campos FF, Moncada ADB, de Lima LTF, Sledz LR, Picheth GF, Adami ER, Acco A, Gonçalves MB, Manica GCM, Valdameri G, de Noronha L, Telles JEQ, Jandrey EHF, Costa ET, Costa FF, de Souza EM, Ramos EAS, Klassen G. Antitumoral activity of liraglutide, a new DNMT inhibitor in breast cancer cells in vitro and in vivo. *Chem Biol Interact* 2021, 349:109641.
8. Funch D, Mortimer K, Li L, Norman H, Major-Pedersen A, Olsen AH, Kaltoft MS, Dore DD. Is there an association between liraglutide use and female breast cancer in a real-world setting? *Diabetes Metab Syndr Obes* 2018, 11:791-806.
9. Baykara O. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2016, 5(3):154-65.

10. Usul M, Güneş Bayır A. Kanser ve D vitamini ilişkisi The relationship between cancer and vitamin D. *Jour Radiat Oncol Palliat* August. 2021, 5(2):12-25.
11. Yokuş B, Çakır DÜ. Kanser biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2012, (1):7-18.
12. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2015, 93:52-79.
13. McKinnell RG, Parchment RE, Perantoni AO, Pierce GB. *The biological basis of cancer*: Cambridge University Press, 2nded. 1998: 401-468
14. Chabner BA, Roberts TG. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* 2005, 5(1):65-72.
15. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S, Safari E, Farahmand L. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol* 2020, 84:106535.
16. Haydaroglu A, Çakar B, Gökmen E, Özdemir N, Zekioğlu O, Özşaran Z, Alanyalı S, Göktepe B, Yeniay L. Ege Üniversitesi Hastanesi veri tabanında meme kanseri hastalarının epidemiyolojisi ve genel sağ kalım özellikleri. *Ege Tıp Dergisi*. 2019, 50-7.
17. Açıkgöz A, Yıldız EA. Meme kanseri etiyolojisi ve risk faktörleri. *Ergoterapi ve Rehabilitasyon Dergisi*. 2017, 5(1):45-56.
18. Dizen H, Karayiğit A, Özdemir D. B, Özdemir Ü, Karakaya İ. B, Peker Cengiz B, Ulaş M, Ünal B. Erkek Meme Kanserinde Klinik Ve Patolojik Özellikler: 16 Olgunun İncelenmesi. *Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*. 54(2):321-5.
19. Johnson K, Pan S, Mao Y, Group CCRER. Risk factors for male breast cancer in Canada, 1994-1998. *Eur J Cancer Prev* 2002, 253-63.
20. Krause W. Male breast cancer--an andrological disease: risk factors and diagnosis. *Andrologia*. 2004, 36(6):346-54.
21. Rosen EM, Fan S, Goldberg ID. BRCA1 and prostate cancer. *Cancer Invest* 2001, 19(4):396-412.

22. Bernard-Gallon DJ, Déchelotte PJ, Le Corre L, Vissac-Sabatier C, Favy DA, Cravello L, De Latour MP, Bignon YJ. Expression of BRCA1 and BRCA2 in male breast cancers and gynecomastias. *Anticancer Res* 2003, 23(1b):661-7.
23. Costa B, Amorim I, Gärtner F, Vale N. Understanding Breast cancer: from conventional therapies to repurposed drugs. *Eur J Pharm Sci* 2020, 151:105401.
24. Dhankhar R, Vyas SP, Jain AK, Arora S, Rath G, Goyal AK. Advances in Novel Drug Delivery Strategies for Breast Cancer Therapy. *Artif Cells, Blood Substit Immobil Biotechnol* 2010, 38(5):230-49.
25. Reinbolt RE, Mangini N, Hill JL, Levine LB, Dempsey JL, Singaravelu J, Koehler KA, Talley A, Lustberg MB. Endocrine Therapy in Breast Cancer: The Neoadjuvant, Adjuvant, and Metastatic Approach. *Semin Oncol Nurs* 2015, 31(2):146-55.
26. Dankwa-Mullan I, George J, Roebuck MC, Tkacz J, Willis VC, Reyes F, Arriaga YE. Variations in breast cancer surgical treatment and timing: determinants and disparities. *Breast cancer Res Treat* 2021, 188(1):259-72.
27. Jonczyk MM, Jean J, Graham R, Chatterjee A. Surgical trends in breast cancer: a rise in novel operative treatment options over a 12 year analysis. *Breast cancer Res Treat* 2019, 173(2):267-74.
28. Makhoul I, Atiq M, Alwbari A, Kieber-Emmons T. Breast cancer immunotherapy: An update. *Breast cancer* 2018, 12:1178223418774802.
29. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 2015, 26(8):1533-46.
30. Masoud V, Pagès G. Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. *World J Clin Oncol* 2017, 8(2):120.
31. Schirmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *Int J Oncol* 2019, 54(2):407-19.
32. Olver IN. New initiatives in the treatment of breast cancer. *MJA*. 2016, 205(10):449-50.

33. Di Leo A, Curigliano G, Diéras V, Malorni L, Sotiriou C, Swanton C, Thompson A, Tutt A, Piccart M. New approaches for improving outcomes in breast cancer in Europe. *Breast* (Edinburgh, Scotland). 2015, 24(4):321-30.
34. Wang X, Ding S. The biological and pharmacological connections between diabetes and various types of cancer. *Pathol Res Pract* 2021, 227:153641.
35. Giri B, Dey S, Das T, Sarkar M, Banerjee J, Dash SK. Chronic hyperglycemia mediated physiological alteration and metabolic distortion leads to organ dysfunction, infection, cancer progression and other pathophysiological consequences: an update on glucose toxicity. *Biomed Pharmacother* 2018, 107:306-28.
36. Lee C, An D, Park J. Hyperglycemic memory in metabolism and cancer. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2016, 26(2):77-85.
37. Wojciechowska J, Krajewski W, Bolanowski M, Kręcicki T, Zatoński T. Diabetes and cancer: a review of current knowledge. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2016, 124(05):263-75.
38. Ferroni P, Riondino S, Buonomo O, Palmirotta R, Guadagni F, Roselli M. Type 2 diabetes and breast cancer: the interplay between impaired glucose metabolism and oxidant stress. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 2015:183928.
39. Supabphol S, Seubwai W, Wongkham S, Saengboonmee C. High glucose: an emerging association between diabetes mellitus and cancer progression. *J Mol Med* (Berlin, Germany). 2021, 99(9):1175-93.
40. Zhou Y, Zhang X, Gu C, Xia J. Diabetes mellitus is associated with breast cancer: systematic review, meta-analysis, and in silico reproduction. *Panminerva Med* 2015, 57(3):101-8.
41. Thompson HJ, Neuhouser ML, Lampe JW, McGinley JN, Neil ES, Schwartz Y, McTiernan A. Effect of low or high glycemic load diets on experimentally induced mammary carcinogenesis in rats. *Mol Nutr Food Res* 2016, 60(6):1416-26.
42. Zielinska H, Holly J, Bahl A, Perks C. Inhibition of FASN and ER α signalling during hyperglycaemia-induced matrix-specific EMT promotes breast cancer cell invasion via a caveolin-1-dependent mechanism. *Cancer Letters*. 2018, 419:187-202.

43. Yamamoto M, Patel NA, Taggart J, Sridhar R, Cooper DR. A shift from normal to high glucose levels stimulates cell proliferation in drug sensitive MCF- 7 human breast cancer cells but not in multidrug resistant MCF- 7/ADR cells which overproduce PKC- β II. *Int J Cancer*. 1999, 83(1):98-106.
44. Flores-López LA, Martínez-Hernández MG, Viedma-Rodríguez R, Díaz-Flores M, Baiza-Gutman LA. High glucose and insulin enhance uPA expression, ROS formation and invasiveness in breast cancer-derived cells. *Cell Oncol* 2016, 39(4):365-78.
45. Hou Y, Zhou M, Xie J, Chao P, Feng Q, Wu J. High glucose levels promote the proliferation of breast cancer cells through GTPases. *Breast Cancer: Targets and Therapy*. 2017, 9:429.
46. Sun XF, Shao YB, Liu MG, Chen Q, Liu ZJ, Xu B, Luo SX, Liu H. High-concentration glucose enhances invasion in invasive ductal breast carcinoma by promoting Glut1/MMP2/MMP9 axis expression. *Oncology letters*. 2017, 13(5):2989-95.
47. Viedma-Rodríguez R, Martínez-Hernández MG, Flores-López LA, Baiza-Gutman LA. Epsilon-aminocaproic acid prevents high glucose and insulin induced-invasiveness in MDA-MB-231 breast cancer cells, modulating the plasminogen activator system. *Mol Cell Biochem* 2018, 437(1):65-80.
48. Wu K, Yu X, Huang Z, Zhu D, Yi X, Wu YL, Hao Q, Kemp KT 2nd, Elshimali Y, Iyer R, Nguyen KT, Zheng S, Chen G, Chen QH, Wang G, Vadgama JV, Wu Y. Targeting of PP2C δ by a small molecule C23 inhibits high glucose-induced breast cancer progression in vivo. *Antioxidants & redox signaling*. 2019, 30(17):1983-98.
49. Takatani-Nakase T, Matsui C, Maeda S, Kawahara S, Takahashi K. High glucose level promotes migration behavior of breast cancer cells through zinc and its transporters. *PLoS One*. 2014, 9(2):e90136.
50. Fainsod-Levi T, Gershkovitz M, Völs S, Kumar S, Khawaled S, Sagiv JY, Sionov RV, Grunewald M, Keshet E, Granot Z. Hyperglycemia impairs neutrophil mobilization leading to enhanced metastatic seeding. *Cell reports*. 2017, 21(9):2384-92.

51. Sun G, Kashyap SR. Cancer risk in type 2 diabetes mellitus: metabolic links and therapeutic considerations. *J Nutr Metab* 2011, 2011:708183.
52. Müller TD, Finan B, Bloom SR, D'Alessio D, Drucker DJ, Flatt PR, Fritsche A, Gribble F, Grill HJ, Habener JF, Holst JJ, Langhans W, Meier JJ, Nauck MA, Perez-Tilve D, Pocai A, Reimann F, Sandoval DA, Schwartz TW, Seeley RJ, Stemmer K, Tang-Christensen M, Woods SC, DiMarchi RD, Tschöp MH. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Mol Metab* 2019, 30:72-130.
53. Calsolaro V, Edison P. Novel GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1) Analogues and Insulin in the Treatment for Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Diseases. *CNS drugs*. 2015, 29(12):1023-39.
54. Hui H, Farilla L, Merkel P, Perfetti R. The short half-life of glucagon-like peptide-1 in plasma does not reflect its long-lasting beneficial effects. *Eur J Endocrinol* 2002, 146(6):863-9.
55. Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE. Dipeptidyl- peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon- like peptide- 1 (7–36) amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem* 1993, 214(3):829-35.
56. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 2007, 87(4):1409-39.
57. Jacobsen LV, Flint A, Olsen AK, Ingwersen SH. Liraglutide in Type 2 Diabetes Mellitus: Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet* 2016, 55(6):657-72.
58. Inoue T, Inoguchi T, Sonoda N, Hendarto H, Makimura H, Sasaki S, Yokomizo H, Fujimura Y, Miura D, Takayanagi R. GLP-1 analog liraglutide protects against cardiac steatosis, oxidative stress and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Atherosclerosis*. 2015, 240(1):250-9.
59. Chen D, Liang H, Huang L, Zhou H, Wang Z. Liraglutide enhances the effect of checkpoint blockade through the inhibition of neutrophil extracellular traps in murine lung and liver cancers. *FEBS open bio*. 2022.

60. Kanda R, Hiraike H, Wada-Hiraike O, Ichinose T, Nagasaka K, Sasajima Y, Ryo E, Fujii T, Osuga Y, Ayabe T. Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor and its role in regulating autophagy in endometrial cancer. *BMC cancer*. 2018, 18(1):657.
61. Alanteet AA, Attia HA, Shaheen S, Alfayez M, Alshanawani B. Anti-Proliferative Activity of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonist on Obesity-Associated Breast Cancer: The Impact on Modulating Adipokines' Expression in Adipocytes and Cancer Cells. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2021, 19(1):1559325821995651.
62. Piccoli GF, Mesquita LA, Stein C, Aziz M, Zoldan M, Degobi NAH, Spiazzi BF, Lopes Junior GL, Colpani V, Gerchman F. Do GLP-1 Receptor Agonists Increase the Risk of Breast Cancer? A Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2021, 106(3):912-21.
63. Shadboorestan A, Tarighi P, Koosha M, Faghihi H, Ghahremani MH, Montazeri H. Growth Promotion and Increased ATP-Binding Cassette Transporters Expression by Liraglutide in Triple Negative Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231. *Drug research*. 2021, 71(6):307-11.
64. Zhao W, Zhang X, Zhou Z, Sun B, Gu W, Liu J, Zhang H. Liraglutide inhibits the proliferation and promotes the apoptosis of MCF-7 human breast cancer cells through downregulation of microRNA-27a expression. *Mol Med Rep* 2018, 17(4):5202-12.
65. Wijshake T, Zou Z, Chen B, Zhong L, Xiao G, Xie Y, Doench JG, Bennett L, Levine B. Tumor-suppressor function of Beclin 1 in breast cancer cells requires E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021, 118(5).
66. Bertozzi S, Londero AP, Viola L, Orsaria M, Bulfoni M, Marzinotto S, Corradetti B, Baccarani U, Cesselli D, Cedolini C, Mariuzzi L. TFEB, SIRT1, CARM1, Beclin-1 expression and PITX2 methylation in breast cancer chemoresistance: a retrospective study. *BMC cancer*. 2021, 21(1):1118.
67. Kaur RP, Vasudeva K, Kumar R, Munshi A. Role of p53 Gene in Breast Cancer: Focus on Mutation Spectrum and Therapeutic Strategies. *Curr Pharm Des* 2018, 24(30):3566-75.

EKLER

EK.1. ÖZGEÇMİŞ



EK.2. ETİK KURUL GEREKLİ OLMADIĞINA DAİR BELGE

