



**ERİBULİN VE EF24'ÜN HÜCRE ÖLÜMÜ SİNYAL YOLAKLARI
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN TRİPLE NEGATİF MEME KANSERİ
HÜCRE HATLARINDA BELİRLENMESİ**

Başak YALÇIN BURHAN

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Başak YALÇIN BURHAN

09/02/2023

ERİBULİN VE EF24'ÜN HÜCRE ÖLÜMÜ SİNYAL YOLAKLARI ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİNİN TRİPLE NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
BELİRLENMESİ
(Doktora Tezi)

Başak YALÇIN BURHAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ocak 2023

ÖZET

Triple negatif meme kanseri meme kanserinin en agresif alt tiplerinden birisidir. Östrojen ve progesteron reseptörü bulundurmamasından ve artmış Her-2 ifadesi göstermediğinden spesifik bir terapötik hedefi yoktur. EF24 biyoyararlanımı ve etkinliği yüksek bir kurkumin analogudur. Bu tez çalışmasında bir kemoterapötik ajan olan Eribulin Mesilatın ve EF24'ün tek başına veya birlikte kullanımının hücre canlılığına, hücre ölüm ve sağ kalım yollarına etkisinin incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 hücre hatlarına değişen konsantrasyonlarda EF24 ve Eribulin Mesilat tek başlarına veya birlikte uygulandı. Her iki hücre hattında da konsantrasyona bağlı hücre canlılığında azalma tespit edildi. Seçilen konsantrasyonlarda DNA fragmentasyon oranında MDA-MB-436 hücre hattında EF24'ün tekli uygulamasında 1,6 kat ve Eribulin Mesilat ile birlikte uygulanmasında 1,2 kat artış gözlemlendi. Fosforile NF- κ B düzeyinde ise her iki hücre hattında Eribulin Mesilatın tekli uygulamasına göre EF24 ile birlikte uygulanmasının azalmaya neden olduğu görüldü. İki kimyasal ajanın birlikte uygulanması, BRCA mutant MDA-MB-436 hücre hattında fosforile ERK1/2 ve JNK düzeyini azalttı ve p38 seviyesini arttırdı. Beclin-1 ve p62 protein düzeyleri ile birlikte tüm veriler değerlendirildiğinde, MDA-MB-231 hücre hattında daha çok otofajik yolağın, MDA-MB-436 hücre hattında ise daha çok apoptotik yolağın aktive olabileceğini düşündürdü. EF24, Eribulin Mesilatın hücre canlılığına olan negatif etkisini artırmaktadır. İleride yapılacak diğer preklinik çalışmalar EF24'ün kemoterapötik ajanlara destekleyici bir fitokimyasal olması yolunda aday bir molekül olarak değerlendirilmesini sağlayacaktır.

Bilim Kodu	: 1055.1
Anahtar Kelimeler	: EF24, Eribulin Mesilat, Triple Negatif Meme Kanseri
Sayfa Adedi	: 68
Danışman	: Doç. Dr. H. İlke ÖNEN

THE EFFECTS OF ERIBULIN AND EF24 ON CELL DEATH SIGNALING
PATHWAY IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER CELL LINES

(Ph. D. Thesis)

Başak YALÇIN BURHAN

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2023

ABSTRACT

Triple negative breast cancer is one of the most aggressive subtypes of breast cancer. It does not have a specific therapeutic target as it lacks estrogen and progesterone receptors and does not show increased Her-2 expression. EF24 is a curcumin analog with high bioavailability and efficacy. It was aimed to examine the effects of the use of Eribulin Mesylate and EF24, a chemotherapeutic agent, alone or together, on cell viability, cell death and survival pathways. For this purpose, varying concentrations of EF24 and Eribulin Mesylate were applied to MDA-MB-231 and MDA-MB-436 cell lines, alone or together. Concentration-dependent decrease in cell viability was detected in both cell lines. DNA fragmentation rate increased 1.6-fold in the single application of EF24 in the MDA-MB-436 cell line and 1.2-fold in the co-administration of Eribulin Mesylate. It was observed that the co-administration of Eribulin Mesylate with EF24 caused a decrease in the level of phosphorylated NF- κ B compared to the single application in both cell lines. Co-administration of the two chemical agents decreased phosphorylated ERK1/2 and JNK levels and increased p38 levels in BRCA mutant MDA-MB-436 cell line. When all the data together with Beclin-1 and p62 protein levels were evaluated, it was suggested that more autophagic pathways might be activated in MDA-MB-231 cell line and more apoptotic pathway might be activated in MDA-MB-436 cell line. EF24 increases the negative effect of Eribulin Mesylate on cell viability. It will enable EF24 to be evaluated as a candidate molecule to be a supportive phytochemical to chemotherapeutic agents.

Science Code	: 1055.1
Key Words	: EF24, Eribulin Mesylate; Triple Negative Breast Cancer
Page Number	: 68
Supervisor	: Assoc. Prof. Dr. H. İlke ÖNEN

TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı eğitimim sırasında ve doktora tezimin tüm aşamalarında sonsuz destek, öneri ve katkıları nedeni ile tez danışmanım Sayın Doç. Dr. H. İlke ÖNEN'e, doktora programım süresince bu alanda aldığım tüm eğitimlerdeki, bilimsel ve samimi destekleri için Sayın Prof. Dr. Ece KONAÇ'a, Prof. Dr. Sevda MENEVŞE'ye, Prof. Dr. Adnan MENEVŞE'ye ve Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ'ye, deneylerin gerçekleştirilmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen Uzm. Bio. Vedia DELETİOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması sırasında benden her türlü desteğini esirgemeyen Sayın Emel KAYMAZ'a, Sayın Musa TURHAN'a, annem, babam, kardeşlerime, eşim Mesut'a ve oğlum Burak Mert'e çok teşekkür ederim.

Çalışmamız Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından 01/2019-45 proje kodu ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Meme Yapısı	3
2.2. Meme Kanseri	4
2.2.1. Meme kanseri epidemiyolojisi.....	4
2.2.2. Meme kanserinde genetik faktörler	5
2.2.3. Meme kanseri sınıflandırması ve evreleri	7
2.3. Triple Negatif Meme Kanseri (TNMK).....	9
2.3.1. Triple negatif meme kanseri epidemiyolojisi ve risk faktörleri	11
2.3.2. Triple negatif meme kanseri sınıflandırması	13
2.4. Eribulin Mesilat Yapısı ve Etki Mekanizması	15
2.5. EF24 Yapısı ve Etki Mekanizması.....	16
3.GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Gereç	21
3.1.1. Hücre hatları	21
3.1.2. Kullanılan cihazlar.....	21
3.1.3. Kullanılan sarf malzemeler.....	22
3.1.4. Kullanılan kimyasal malzemeler	22

	Sayfa
3.1.5. Kullanılan kitler ve antikorlar.....	23
3.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı	23
3.3. Yöntemler.....	26
3.3.1. Hücre kültürü.....	26
3.3.2. Hücre canlılığının belirlenmesi	26
3.3.3. DNA fragmentasyon oranının belirlenmesi.....	27
3.3.4. MAPK sağ kalım yolağında görevli proteinlerin düzeyinin belirlenmesi	28
3.3.5. NF- κ B aktivite düzeyinin belirlenmesi.....	29
3.3.6. Mitokondriyal membran potansiyelinin değişiminin belirlenmesi.....	29
3.3.7. Protein miktar tayini	29
3.3.8. Beclin1, p62 ve GAPDH protein miktarlarının western blot yöntemi ile belirlenmesi	30
3.4. İstatistiksel Analiz.....	30
4.BULGULAR	31
4.1. Hücre Canlılığının MTT Yöntemi ile Belirlenmesi	31
4.1.1. EF24'ün hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-231 hücrelerinde belirlenmesi	31
4.1.2. Eribulin Mesilatın hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-231 hücrelerinde belirlenmesi	32
4.1.3. EF24 ve Eribulin Mesilatın birlikte uygulanmasının hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-231 hücrelerinde belirlenmesi	34
4.1.4. EF24'ün hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-436 hücrelerinde belirlenmesi	36
4.1.5. Eribulin Mesilat'ın hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-436 hücrelerinde belirlenmesi	38
4.1.6. EF24 ve Eribulin Mesilat'ın birlikte uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-436 hücrelerinde belirlenmesi	39
4.1.7. EF24 ve Eribulin Mesilat'ın tekli veya birlikte uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 hücrelerinde belirlenmesi	41

Sayfa

4.2. EF24 ve EM'nin Tekli veya Birlikte Uygulanmasının DNA Fragmentasyon Oranlarına Etkisinin Belirlenmesi	41
4.3. EF24 ve EM'nin Tekli veya Birlikte Uygulanmasının MAPK Sağ Kalım Yolağında Görevli Protein Düzeylerine Etkisinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi.....	42
4.4. EF24 ve EM'nin Tekli veya Birlikte Uygulanmasının NF- κ B Üzerine Olan Etkisinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi	44
4.5. EF24 ve EM'nin Tekli veya Birlikte Uygulanmasının Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerine Olan Etkisinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi.....	45
4.5. EF24 ve EM'nin Tekli veya Birlikte Uygulanmasının Beclin-1 ve p62 Üzerine Olan Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi.....	46
5.TARTIŞMA.....	49
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	67

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Meme kanseri ile ilişkili genler	6
Çizelge 2. 2. Duktal in situ karsinoma (DCIS) ve lobüler in situ karsinoma (LCIS) özellikleri.....	8
Çizelge 2. 3. Meme kanseri intrinsik alt tipleri özellikleri	9
Çizelge 2. 4. TNMK sınıflandırma kriterleri	10
Çizelge 2.5. TNMK alt tiplerinin potansiyel tedavi seçenekleri.....	15

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Kadın meme anatomisi	3
Şekil 2.2. TNMK ve bazal benzeri hücre oranları	11
Şekil 2.3. Eribulin Mesilat yapısı.....	16
Şekil 2.4. EF24 yapısı	17
Şekil 2.5. EF24'ün etkileri.....	17
Şekil 2.6. EF24'ün NF-kB yolağı üzerinden etki mekanizması	18
Şekil 4.1. MDA-MB-231 hücrelerine EF24'ün 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.	31
Şekil 4.2. MDA-MB-231 hücrelerine EF24'ün 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.	32
Şekil 4.3. MDA-MB-231 hücrelerine EM'nin 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.	33
Şekil 4.4. MDA-MB-231 hücrelerine EM'nin 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.	34
Şekil 4.5. MDA-MB-231 hücrelerine EF24 ve EM'nin 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda birlikte uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.	35
Şekil 4.6. MDA-MB-231 hücrelerine EF24 ve EM'nin 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda birlikte uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.	36
Şekil 4.7. MDA-MB-436 hücrelerine EF24'ün 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.	37
Şekil 4.8. MDA-MB-436 hücrelerine EF24'ün 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.	37
Şekil 4.9. MDA-MB-436 hücrelerine Eribulin Mesilat'ın 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.	38
Şekil 4.10. MDA-MB-436 hücrelerine Eribulin Mesilat'ın 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları	39
Şekil 4.11. MDA-MB-436 hücrelerine EF24 ve Eribulin Mesilat'ın 24 saat süresince birlikte farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları	40

Şekil 4.12. MDA-MB-436 hücrelerine EF24 ve Eribulin Mesilat'ın 48 saat süresince birlikte farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları	40
Şekil 4.13. MDA-MB-213 hücre hattında EF24 ve Eribulin Mesilatın tek başlarına veya birlikte uygulanmasının sonucundaki DNA fragmentasyon oranları...	41
Şekil 4.14. MDA-MB-436 hücre hattında EF24 ve Eribulin Mesilatın tek başlarına veya birlikte uygulanmasının sonucundaki DNA fragmentasyon oranları...	42
Şekil 4.15. MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 hücre hattında EF24 ve Eribulin Mesilatın tek başlarına veya birlikte uygulanmasının sonucundaki pERK 1/2/tERK 1/2 oranı	43
Şekil 4.16. MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 hücre hattında EF24 ve Eribulin Mesilatın tek başlarına veya birlikte uygulanmasının sonucundaki pJNK/tJNK oranı	43
Şekil 4.17. MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 hücre hattında EF24 ve Eribulin Mesilatın tek başlarına veya birlikte uygulanmasının sonucundaki pp38/tp38 oranı	44
Şekil 4.18. MDA-MB-231 hücrelerine 8 µM EF24 ve 10 nM EM'nin 24 saat süresince tek başlarına ve birlikte uygulanması sonucu belirlenen p-NF-κB/ NF-κB oranları.	44
Şekil 4.19. MDA-MB-436 hücrelerine 8 µM EF24 ve 10 nM EM'nin 24 saat süresince tek başlarına ve birlikte uygulanması sonucu belirlenen p-NF-κB/ NF-κB oranları.	45
Şekil 4.20. MDA-MB-231 hücrelerine 8 µM EF24 ve 10 nM EM'nin 24 saat süresince tek başlarına ve birlikte uygulanmasının mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	derece santigrat
µg/ml	mikrogram/mililitre
µl	mikrolitre
µM	mikromolar
µM	mikromolar
cm ²	santimetre kare
CO ₂	karbondioksit
dk	dakika
IU/ml	uluslararası ünite/mililitre
ml	mililitre
nM	nanomolar

Kısaltmalar	Açıklamalar
AML	Akut Miyeloid Lösemi
ATM	Ataksia-telenjektazi Mutasyonu
BRCA	Breast Cancer
BRIP1	BRCA1 Interacting Protein 1
CDH1	Cadherin 1
CHEK2	Checkpoint Kinaz 2
DCIS	Duktal in situ Karsinoma
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Östrojen Reseptörü
FBS	Fetal Sığır Serum

Kısaltmalar**Açıklamalar**

FDA	Food and Drug Administration (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi)
FGFR2	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 2
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
HER-2	Human Epidermal Growth Factor-2
HOX	Homeobox
ICD-NST	İnvaziv Duktal Karsinoma -Spesifik Olmayan Tip
IKK β	Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Kinaz Subunit Beta
LCIS	Lobüler in situ Karsinoma
LSP1	Lenfosit Spesifik Protein 3
MAP3K1	Mitojen Aktivated Protein Kinaz Kinaz Kinaz 1
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromit
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
PALB2	Part and localizer of BRCA2
PI3K	Fosfoinozitol 3 Kinaz
PIK3CA	Fosfatidil İnositol 4,5 Bifosfat 3 Kinaz Katalitik Alt Ünit Alfa
PR	Progesteron Reseptörü
PTEN	Fosfotaz ve Tensin Homoloji
RB1	Retinoblastoma 1
STK11	Serin/Treonin Kinaz 11
TGFB1	Transforming Growth Factor Beta 1
TGF-β1	Transforming Growth Factor Beta 1
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNM	Tümör, Lenf Nodu, Metastaz
TNM	Tümör, Lenf Nodu, Metastaz
TNMK	Triple Negatif Meme Kanseri
TOX3	TOX Yüksek Mobilite Grubu Ailesi 3
VEGFR2	Vasküler Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2

1. GİRİŞ

Dünyada ve Türkiye’de kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseridir. Günümüzde erken tanı olanakları ve gelişen tedavi seçeneklerine rağmen mortalite oranı yüksektir. Triple negatif meme kanseri prognozu en kötü meme kanserleri alt tiplerinden biridir. İlk üç yılda relaps riski çok yüksek olan bu alt tipin uzak organ metatazı kemik yerine iç organlara olmaktadır. Meme kanseri tedavisinde kullanılan üç belirtecin yokluğu (östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve Her-2 ifade artışı) ile karakterize olan bu meme kanseri türünün terapötik hedefi yoktur. Bu nedenle toplam sağkalım oranı diğer meme kanseri alt tiplerine göre metastazik triple negatif meme kanseri tanımlı hastalarda daha kısadır.

Halichondrin B, ilk defa nadir bulunan bir Japon deniz süngeri olan *Halichondria okadai*’den izole edilmiş kompleks doğal bir poliyeter makroliddir. Amerika Birleşik Devletleri Kanser Enstitüsü tarafından 60 hücre serisinde test edilmiş, diğer kansere karşı kullanılan ajanlarla karşılaştırılmış ve kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ortaya konmuştur. Bu etkileri bilinsede deniz süngerinin nadir bulunmasından dolayı bu ajandan ilaç geliştirme çalışmalarına bir süre ara verilmiştir. Yoshito Kishi tarafından 1998’de sitotoksik fonksiyonun C1-C30 motifindeki makrolid lakton kısmında olduğunun keşfiyle gözler tekrar bu ajan üzerine çevrilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda Halichondrin B’nin tamamen sentetik ve yapısal olarak basitleştirilmiş bir makrosiklik keton analogu olan Eribulin Mesilat, Esai Araştırma Enstitüsü tarafından patentlenmiştir. Bir mikrotübül inhibitörü olan bu ajan 2010 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi’den daha önce metastazik meme kanseri nedeniyle en az iki kemoterapi rejimi uygulanmış hastalar için onay almıştır.

İnsanlık tarihi boyunca çeşitli doğal bitkiler tıbbi amaçlarla kullanılabilmektedir. Bunlardan en yaygın kullanılanlardan biri de kurkumindir. Kurkumin *Curcuma longa* bitkisinin kökünden elde edilen bir hidrofobik polifenoldür. Biyolojik aktiviteleri, yaşlanmadan kanser tedavisine kadar çok geniş bir alanda çalışılmıştır. Birçok araştırmada antikanser etkisi gösterilen kurkuminin düşük etkinlik ve emiliminden dolayı çeşitli analogları üretilmiştir. Bu analoglarından biyoyararlanımı en yüksek olanlardan biri EF24’dür. EF24 antikanser, antiinflamatuvar ve antibakteriyel etkileri kuvvetli ve biyoyararlanımı yüksek bir ajandır.

Tümör büyümesini engellemektedir. Bu etkisini temel olarak NF- κ B yolağını inhibe ederek göstermektedir.

Biz bu çalışmada EF24 tek başına veya Erbibulin Mesilatla birlikte uygulanmasının hücre ölüm sinyal yollarına etkisini inceledik. Literatürde TNMK hücrelerine EF24 ve Erbibulin Mesilat'ın birlikte uygulandığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu ajanların tek başlarına ya da birlikte uygulanmasının; hücre canlılığını, apoptozu ve hücre içi sinyal yollarını nasıl etkileyeceğini saptanmayı hedefledik. Ayrıca, BRCA geninin TNMK hücrelerinde ifadesi ya da ifadesinin yokluğunun kullanacağımız ajanların oluşturacağı hücresel cevap üzerine etkisinin olup olmadığını belirlemeye çalıştık.

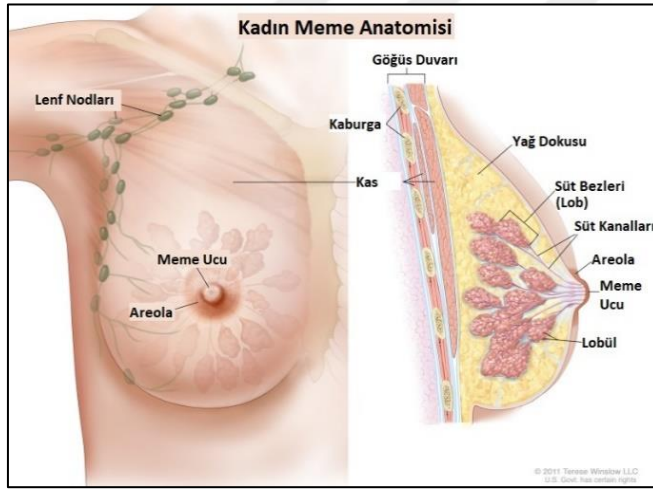


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Yapısı

Göğüsün önünde T2 ve T6 kaburgaları düzeyinde yer alan değişmiş ve özelleşmiş bir ter bezidir. Embriyonik dönemde ektoderm tabakasından gelişen meme dokusu ergenlik dönemine kadar kadın ve erkekte aynıdır. Ergenlik döneminde erkeklerde testosteron etkisi ile atrofiye olurken, kadınlarda östrojen ve progesteron etkisi ile gelişimine devam eder (Pandya ve Moore, 2011).

Ergenlik dönemine kadar meme dokusu; altında miyoepitel tabakası olan tek sıra epitel ile çevrilmiş süt kanallardan (duktus) oluşan epitelyal elementler ve adipöz ve fibröz dokudan oluşan stromal elementlerden meydana gelmiştir (Kosova ve Arı, 2008).



Şekil 2.1. Kadın meme anatomisi

Kadınlarda meme dokusu gelişimin her evresinde salgılanan hormonların etkisiyle farklı büyüklüklerde ve yapıdadır. Ergenlik döneminde östrojen ve progesteron hormonlarının etkisi ile memedeki epitel ve bağ dokusu proliferasyona uğrar. Bu sayede meme bezi gelişir ve meme yağ depolayarak büyür. Bu evrede kadın meme dokusu yağ dokusu, süt bezleri, süt kanalları, meme ucu ve aerolar kompleksten meydana gelmiştir. Ayrıca memedeki yapısal bütünlüğü sağlayan ve memeyi göğüs duvarına yukarı doğru asan ve bir bağ dokusu elemanı olan Cooper ligamentleri mevcuttur (Şekil 2.1) (Hassiotou ve Geddes, 2013).

Meme hamilelik sırasında östrojen, progesteron, büyüme hormonu, prolaktin ve plasentadan salınan hormonların etkisi ile hacimsel büyüyerek ve yoğunluğu artarak gelişimini tamamlar. Doğumdan hemen sonra östrojen ve progesteron düzeyinin düşmesi ve prolaktin hormonunun salgılanması ile süt salgılamaya başlar. Doğum eylemi için salgılanan oksitosin hormonu da süt salınımını düzenler. Emzirme döneminin bitmesiyle süt bezleri, süt kanalları ve stromal elementler atrofiye olur ve meme boyutu küçülür (Pandya ve Moore, 2011).

Menopoz döneminde ise meme dokusu yoğun olarak yağ ve stromadan oluşur. Yaşlandıkça süt kanalları, süt bezleri ve stromal elementler azalır ve meme büzülerek şeklini kaybetmeye başlar. Ayrıca Cooper ligamentleri gevşer ve meme kaburgaların T7 seviyesine kadar sarkar (Pandya ve Moore, 2011).

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri meme dokusundaki hücrelerin kontrolsüz ve anormal olarak büyüyerek diğer dokulara yayılmasıdır (Akram ve diğerleri, 2017). Geçmişten günümüze kadar birçok kadını etkileyen meme kanseri geliştirilen birçok tedavi yöntemine rağmen kadınlarda kansere bağlı ölüm sebepleri arasında birinci sırada yer almaktadır.

2.2.1. Meme kanseri epidemiyolojisi

Günümüzde bilim alanındaki birçok gelişmeye rağmen kadınlarda en sık gözlenen kanserdir. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerde ilk sırada yer almaktadır. Dünya kanser istatistikleri değerlendirildiğinde yılda yaklaşık 2,3 milyon kadın bu kanser tanısını almaktadır. 2020 yılında ise yaklaşık 684.996 kadın (kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %15,5'i) meme kanseri nedeniyle ölmüştür (Sung ve diğerleri, 2021).

GLOBOCAN 2020 verilerine göre meme kanseri dünyada yeni tanı alan kanser vakalarında 2.261.419 vaka ile 1. ve kansere bağlı ölümlerde 684.996 vaka ile 5. sırada yer almaktadır (Sung ve diğerleri, 2021).

Dünyada ortalama meme kanseri insidansı 47,8 (100.000 kişi) iken mortalite oranı 13,6 (100.000 kişi) dir. En yüksek tanı alma insidansı Avustralya/Yeni Zellanda (95,5) görülürken en yüksek mortalite Barbadosdadir (18,9). Gelişmiş ülkelerde meme kanseri

insidansı yüksektir. Bu insidans farklılığının nedeni gelişmiş ülkelerdeki yaşam stili ve üreme davranışındaki değişiklikler ile gelişmekte olan ülkelerdeki düşük tarama oranları ve bildirim eksikliği olabilir. Türkiye’de ise meme kanseri insidansı 46,6 ve mortalite oranı 12,9 ile dünya ortalamasının altındadır (Estimated, 2020).

Türkiye’de de meme kanseri tüm kanser olguları arasında vaka sayısı bakımından ikinci sırada (24.174 yeni vaka sayısı) olmasına rağmen kadınlar arasında en sık görülen (46,6 / 100.000 kişi) kanser türüdür. Kadınlardaki kanser olgularının %23,3’ünü oluşturmaktadır. Amerika’daki Ulusal Kanser Enstitüsü verilerine göre (2014-2016) kadınların %12,8’i hayatlarının bir döneminde meme kanseri tanısı almaktadır. Ayrıca 5 yıllık sağkalım oranı %89,9’dur (Cancer Stat, 2022). Ülkemizde ise kadınlarda yaşam boyu meme kanserine yakalanma riski %6,6’dır. Her 15 kadından biri meme kanserine yakalanma riski taşımaktadır (Orun, 2017).

Erkeklerde meme kanseri görülme oranı oldukça düşüktür. Erkeklerde görülen malignitelerin %1 den azını meme kanseri oluşturmaktadır. Erkeklerde yaşam boyu meme kanserine yakalanma riski 1000’de 1’dir. Ülkemizde de erkeklerde meme kanseri hızı 0,8’dir (100 000 kişide) (Rojas ve Stuckey, 2016).

2.2.2. Meme kanserinde genetik faktörler

Meme kanserlerinin %5-10’nunu kalıtsal meme kanserleri oluşturmaktadır. Meme kanseri ile ilişkilendirilen birçok mutasyon bulunmaktadır (Ban ve Godellas, 2014). Bunlardan en iyi çalışan ve ilişkisi tespit edilen BRCA1/BRCA2 genlerindeki mutasyonlardır (Çizelge 2.1) (Shiovitz ve Korde, 2014, Pharoah ve diğerleri, 2001, Tan ve diğerleri, 2012, Schon ve Tischkowitz, 2018, Torabi Dalivandan ve diğerleri, 2021).

Çizelge 2.1. Meme kanseri ile ilişkili genler

GEN	LOKUS	İŞLEVİ	KLİNİK TABLO	MEME KANSERİ RİSKİ	PENETRANS
BRCA1	17q21	Tümör Supresör Gen DNA Tamiri	Kalıtsal Over ve Mem Kanseri	Yaşam boyu yakalanma riski %50-85	Yüksek
BRCA2	13q13.1	Tümör Supresör Gen DNA Tamiri	Kalıtsal Over ve Meme Kanseri, Erkek Meme Kanseri	Yaşam boyu yakalanma riski %50-85	Yüksek
PTEN	10q23	Tümör Supresör Gen Fosfatidil inozitol tri fosfat defosforilasyonu	Cowden Sendromu	Yaşam boyu yakalanma riski %85	Yüksek
TP53	17p13.1	Tümör Supresör Gen	Li-Fraumeni Sendromu	60 yaşına kadar %85	Yüksek
CDH1	16q22.1	E-Kaderin üretimi	Kalıtsal Diffüz Gastrik Kanseri	Yaşam boyu yakalanma riski %39	Yüksek
STK11 (LKB1)	19p13.3	Tümör Supresör Gen	Peutz-Jeghers Sendromu	60 yaşına kadar %32	Yüksek
CHEK2	22q12.1	Tümör Supresör Gen	Li-Fraumeni Sendromu	Kadınlarda: RR:1.70 Erkeklerde: RR:10.3	Orta
BRIP1	17q23.2	DNA Helikaz BRCA1 C Terminal Domainine Bağlanır	Fankoni Anemisi: J Tipi Ailesel Meme Kanseri	Kadınlarda: RR:2.0 50 yaş altı Kadınlarda: RR:3.5	Orta
ATM	11q22.3	DNA Kırık Tamiri	Ataksi-telanjektazi	RR:2.37	Orta
PALB2	16p12.2	Tümör Supresör Gen BRCA2 Stabilizasyonu	Fankoni Anemisi: N Tipi	RR:2.3	Orta
FGFR2	10q26.13	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü	Kraniosinostoz, Apert Sendromu, Meme Kanseri	OR:1,26	Düşük
TOX3	16q12.1	DNA'nın Paketlenmesi ve Açılması	Meme Kanseri	OR: 1.14	Düşük
LSP1	11p15.5	Hücre içi F Aktin Bağlayıcı Protein (Nötrofil Hareketi)	Meme Kanseri	OR:1.06	Düşük
TGFB1	19q13.2	Transforming Büyüme Faktörü 1	Camurati-Engelmann Hastalığı Meme Kanseri	OR:1.07	Düşük
MAP3K1	5q11.2	Hücre Sinyal İletiminin Düzenlenmesi	Swyer Sendromu Meme Kanseri	OR: 1.13	Düşük

BRCA1/BRCA2(Breast Cancer Gene)

BRCA1 geni 17q21 de yer alan ve 22 ekzondan oluşan bir gendir. 1863 aminoasit uzunluğunda bir proteini kodlar. BRCA2 geni ise 13q12-13 de yer alan ve 27 ekzondan oluşan bir gendir. Bu genlerin bilinen 1800'den fazla varyantı bulunmaktadır. Bunların çoğu çerçeve kayması şeklinde mutasyonlar sonucu oluşmakta ve anlamsız veya işlevsiz proteinler sentezlenmektedir (Lee ve diğerleri, 2020).

BRCA1 ve BRCA2 kalıtsal meme kanseri ile ilişkili temel genlerdir. Bu genlerdeki mutasyonlar otozomal dominant olarak kalıtılır ve penetransı yüksektir. DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla tamirinde görev alırlar ve hücre döngüsünde tümör supresör gen olarak işlev görürler (Lee ve diğerleri, 2020).

BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar kanser gelişme riskini 10 kat artırmaktadır. Bu genlerdeki mutasyonu taşıyan kadınlarda ömür boyu meme kanserine yakalanma riski %45-87'dir (Łukasiewicz ve diğerleri, 2021).

BRCA1 mutasyonu sonucu oluşan meme kanseri tümörleri basal-benzeri fenotipe ve yüksek histolojik evreye sahip olma eğiliminde ve triple negatif meme kanseri tipindedirler. BRCA2 ilişkili tümörler ise HER2 negatif fakat ER ve PR pozitif olma eğilimindedirler.

2.2.3. Meme kanseri sınıflandırması ve evreleri

Meme kanseri, meme dokusundaki epitel hücrelerden (karsinom), salgı bezlerinden (adenokarsinom) veya nadirde olsa memedeki bağ dokusu, kas veya yağ dokusundan (sarkom) kaynaklanabilmektedir (Harbeck ve Gnant, 2017).

Meme kanserine histolojik olarak bakıldığında ya kanser duktus veya lobülün bazal membranının sınırları içinde orijinal başladığı yerdedir (in situ karsinom) yada bazal membranı geçerek yayılmıştır (invaziv karsinom). Memenin in situ karsinomu duktal (DCIS) ve lobüler (LCIS) olmak üzere 2'ye ayrılırken (Çizelge 2.2.), 20'den fazla invaziv karsinom tanımlanmıştır. İnvaziv meme kanserleri arasında %70 ila 80 oranında en yaygın olarak görülen meme kanseri ICD-NST (İnvaziv Duktal Karsinoma -Spesifik Olmayan Tip) dir. Bunu %10 oranında görülen invaziv lobüler karsinoma takip etmektedir (Malhotra ve diğerleri, 2010, Bonnie, 2019).

Çizelge 2. 2. Duktal in situ karsinoma (DCIS) ve lobüler in situ karsinoma (LCIS) özellikleri

	DCIS	LCIS
Yaş	54-56	44-46
Menapoz Durumu	Postmenapozal	Premenapozal
İnsidans	Yeni tanı %20	100 000 de 3,19
Histolojik Alt Grupları	Komodo Solid Kribriform Papiller Mikropapiller	Klasik Pleoformik
Mikrokalsifikasyon	Var	Yok
Aynı Memede İnvaziv Kanser Riski	%99	%50
Diğer Memede İnvaziv Kanser Riski	%1	%50

Perou ve diğerlerinin 2000 yılında yayınlanan çalışmalarında meme kanseri hücrelerinin gen ifade profili çıkarılmış ve meme kanseri ilk olarak 5 daha sonra yapılan çalışmalarla 4 grup olarak sınıflandırılmıştır: Luminal A, Luminal B, HER ve Bazal Benzeri (Çizelge 2.3.). İlk grupta Normal Benzeri olarak bir grup tespit edilmiş fakat bu grubun kanser dokusundaki normal hücrelerin kontaminasyonu ile oluştuğu sonucuna varılmıştır.

Luminal meme kanseri hücreleri meme dokusunun luminal epitel hücrelerine benzer gen ifade profiline sahiptirler. Diğer iki intrinsik alt tipe göre daha iyi prognoza sahip kanserlerdir. %20 inde TP53 mutasyonu gözlenir. İki alt tipi bulunur:

- Luminal A: İnvaziv meme kanserlerinin %50'sini oluştururlar. Östrojen ve progesteron reseptörlerini yüksek oranda sentezlerler. HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) ifadesi gözlenmez. Tümör dokusundaki yüksek proliferasyona sahip hücreleri gösteren bir antikor olan Ki-67 oranları düşüktür. TP53 mutasyonu nadirdir. Endokrin tedaviye cevap verirler ve prognozu daha iyidir.
- Luminal B: İnvaziv meme kanserlerinin %20'sini oluştururlar. Luminal epitel hücre genlerini ve östrojen reseptörü (ER) ve ilişkili genleri luminal A'ya göre daha az sentezlerler. Luminal A'ya göre daha fazla proliferasyona gösterirler ve HER2 ve ilişkili genleri daha çok sentezlerler. Hücre döngüsündeki TP53 ve RB kontrol noktaları luminal A tipine göre daha yüksek oranda inaktive olmuştur. Prognozu Luminal A kadar iyi değildir.

HER2-Yüksek İfade meme kanseri tipi HER2 ve aynı amplikondaki gen ifadelerinin yüksek olduğu tümörlerdir. İnvaziv meme kanserlerinin %15'ini oluştururlar. Bu grup kanser hücrelerinde östrojen ve progesteron reseptörü (PR) ve ilişkili genlerinin ifadesi düşüktür.

Ki67 ifadesi fazladır ve yüksek oranda proliferasyona sahiptirler. Çoğunluğunda TP53 (%72) ve PIK3CA (%39) mutasyonu gözlenir. Genellikle yüksek evreye sahiptirler ve lenf nodu metastazı gösterirler. Kötü prognoza sahiptirler. Trastuzumab tedavisine duyarlılıkları yüksektir.

Bazal Benzeri alt tipi de invaziv meme kanserlerinin %15'ini oluşturur. Meme dokusunun bazal epitel ve miyoepitel hücrelerine ait genlerin (sitokeratin 5, sitokeratin 17, p-kaderin, vimentin) ifadesi gözlenir. Östrojen ve Progesteron Reseptörü ve HER2 ifadeleri düşüktür. HER2-Yüksek İfade meme kanseri tipinde olduğu gibi Ki67 ifadesi fazladır ve yüksek oranda proliferasyona sahiptirler. Çoğunluğu TP53 mutasyonuna sahiptir. Retinoblastoma 1 (RB1) ve BRCA1 genlerinde mutasyon gözlenir. Bu alt tipte MYC amplifikasyonu ve PI3K/AKT yolağının aktivasyonu gözlenmektedir. Prognozu kötüdür.

Çizelge 2. 3. Meme kanseri intrinsik alt tipleri özellikleri

		Luminal A	Luminal B	HER2-Yüksek İfade	Bazal Benzeri
İmmünohistokimyasal Özellikleri	ER	+	+	-	-
	PR	+ veya -	+ veya -	-	-
	HER2	-	+ veya -	+	-
	Ki67	Düşük	Yüksek	Yüksek	Yüksek
TP53 Mutasyonu		Nadir	Yaygın	Çok Yaygın	Çok Yaygın
İnvaziv Meme Kanserlerindeki Oranı		%50	%20	%15	%15
Prognozu		İyi	Orta	Kötü	Kötü

Meme kanserinin tedavi protokolünü ve prognozunu etkileyen en önemli faktörlerden biri de ilk tanı koyulduğundaki evresidir. Meme kanseri TNM (Tümör, Lenf Nodu, Metastaz) sınıflama sistemine göre 5 evreden oluşmaktadır. Evre 0 en iyi prognoza sahipken, evre 4 en kötü prognozu gösterir.

2.3. Triple Negatif Meme Kanseri (TNMK)

ER, PR ve HER2 ifadesi göstermeyen tümör hücrelerinden meydana gelen meme kanseri türüdür. Tüm meme kanserlerinin %15-20'sini oluştururlar. Yüksek oranda morfolojik ve moleküler heterojenite gösterirler. Diğer meme kanserleri alt gruplarına göre daha agresif tümörlerdir ve yüksek mitotik orana sahiptirler. Meme kanseri tedavisinde hedef olarak

kullanılan üç belirtecin de olmamasından dolayı terapötik hedefi yoktur, prognozu kötüdür ve metastazik TNMK tanılı hastalarda sağkalım daha kısadır. İlk 3 yılda relaps riski yüksek olan TNMK'nın uzak organ metastazı kemik yerine daha çok iç organlardır (Foulkes, 2010, Uscanga, 2016).

TNMK'nin temel karakteristik özellikleri Bazal-benzeri meme kanserine benzerlik gösterse de bu iki tip meme kanseri aynı değildir. TNMK bir meme kanseri fenotipidir. Bu fenotipte tümör hücreleri immünohistokimyasal olarak analiz edildiğinde östrojen ve progesteron reseptörü negatif olarak gözlenir. Ayrıca immünohistokimyasal olarak bakıldığında HER2 aşırı ifadesi gözlenmez veya florasan *in situ* hibridizasyon tekniğiyle analiz edildiğinde HER2 gen amplifikasyonu gözlenmez (Çizelge 2.4.).

Çizelge 2. 4. TNMK sınıflandırma kriterleri

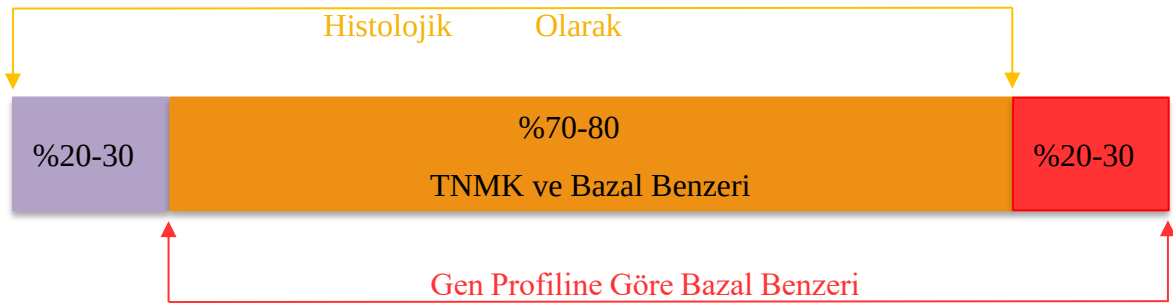
RESEPTÖR	YÖNTEM	ANALİZ
Östrojen	İmmünohistokimyasal	Kontrolle göre <%1 oranında herhangi bir yoğunlukta tümör hücre boyanması
Progesteron	İmmünohistokimyasal	Kontrolle göre <%1 oranında herhangi bir yoğunlukta tümör hücre boyanması
HER2	İmmünohistokimyasal	0 veya +1
	Florasan <i>in situ</i> hibridizasyon	Tek prob HER2 ortalama kopya sayısı <4 sinyal/hücre İki prob HER2/CEP17 oranı <2 ve ortalama <4 sinyal/hücre HER 2

Bazal Benzeri meme kanseri ise bir moleküler alt tipi ifade eder. Bu alt tip tümör hücrelerinin gen ifade profiline göre gruplandırılmıştır. TNMK'nin çoğu Bazal-benzeri tipte, bazal hücre belirteçlerinin üreten meme kanseri tümörlerinin de çoğu triple negatiftir. Fakat tüm Bazal-benzeri meme kanseri hücreleri ER, PR ve HER2 negatif değildir. Ayrıca tüm TNMK hücreleri bazal hücre belirteçlerini sentezlemezler.

Bertucci ve diğerlerinin 2008 yılında yayınlanan çalışmalarına göre;

- Histolojik olarak boyandığında TNMK olarak sınıflandırılan 172 meme tümörü gen ifade profiline göre analiz edildiğinde 123'ünün (%71) bazal benzeri tipte olduğu gözlenmiştir.
- Gen ifade profiline göre bazal benzeri olarak gruplandırılan 160 meme tümörü histolojik olarak boyandığında 123'ünün (%77) TNMK olduğu gözlenmiştir.

Daha sonra farklı grupların yaptığı çalışmalar da bu sonuçları destekler niteliktedir (Şekil 2.9.)



Şekil 2.2. TNMK ve bazal benzeri hücre oranları

2.3.1. Triple negatif meme kanseri epidemiyolojisi ve risk faktörleri

TNMK tüm invaziv meme kanseri olgularının %15-20'sini oluşturmaktadır. Kadınlarda insidansı 13,0 (100.000 kadında)'dır. Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü 2012-2018 kanser istatistiklerine göre 5 yıllık sağkalım oranı en düşük (%77,1) olan meme kanseri alt tipidir (Cancer Stat, 2022).

Ülkemizde Özmen ve diğerlerinin (2019) 2005-2017 yılları arasında meme kanseri tanısı almış 19.503 kadınla yaptığı çalışmada olguların %12'sinin triple negatif fenotipte olduğu gözlenmiştir.

Meme kanserinin en agresif seyreden alt tipi olan TNMK'nın risk faktörleri meme kanserinin diğer alt tiplerinden az oranda farklılık göstermektedir.

Etnik Köken

Meme kanseri en yüksek oranda beyaz ırkta görülmektedir. Meme kanseri alt tipleri etnik köken bakımından incelendiğinde; TNMK en yüksek oranda siyah ırka mensup kadınlarda görüldüğü anlaşılmaktadır. Siyah ırka sahip kadınlarda meme kanseri görülme riski düşük olsa da görülen meme kanserlerinin triple negatif fenotipte olma oranı yüksektir (Boyle, 2012; Avery, 2018).

Yaş

Hormon reseptörü pozitif meme kanserlerinin görülme sıklığı yaş arttıkça artmaktadır. Triple negatif meme kanseri ise daha çok genç kadınlarda gözlenmektedir. 40 yaş altı

kadınlarda görülme sıklığı daha yüksek olan (OR:1,53) TNMK'nın, 65 yaş ve üzeri kadınlarda görülme sıklığı %10-30'dur. TNMK uzak organ metastazları bakımından incelendiğinde ise 50 yaş ve üzerinde metastaz riskinin arttığı gözlenmiştir (Yao ve diğerleri, 2019).

Sosyoekonomik Durum

Genellikle sosyoekonomik statü arttıkça meme kanseri riski artmaktadır. TNMK'da ise durum tam terstir.

BRCA Mutasyonu

BRCA-1 mutasyonu taşıyan meme kanserlerinin büyük bir çoğunluğu TNMK fenotipini göstermektedir. Bu tümörlerin gen ifade profiline bakıldığında ise genellikle bazal benzeri olduğu gözlenmektedir. TNMK'ların yaklaşık %25'i BRCA-1 mutasyonu taşıırken, BRCA mutasyonu taşıyan meme kanserlerinin %75'den fazlası TNMK ve/veya bazal benzeri tiptir. BRCA-2 mutasyonunun da TNMK ile ilişkili olduğu bulunmuştur. TNMK olgularında BRCA-2 mutasyonu görülme oranı %4-16'dır (Guney Eskiler ve diğerleri, 2018, Avery, 2018, Sporikova, 2018).

Obezite

Premenapozal kadınlardaki obezite TNMK riskini artırmaktadır. Kwan ve diğerlerinin (2009) yaptığı bir çalışmada premenapozal dönemdeki TNMK hastalarının büyük oranda aşırı kilolu veya obez olduğu gözlenmiştir. İnvaziv meme kanseri olan 2.659 kadınla yapılan bir çalışmada vücut kitle indeksi $>30 \text{ kg/m}^2$ olan premenapozal kadınlarda TNMK oluşma riskinin, vücut kitle indeksi $<25 \text{ kg/m}^2$ olanlara göre %82 oranında artmış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 18 yaşından sonra vücut kitle indeksinde 10 kg/m^2 veya daha fazla kilo artışı gösteren kadınlar, kilo değişikliği olmayanlara göre TNMK oluşması bakımından 2 kat artmış riske sahiptirler.

Menstürel Döngü, Üreme Öyküsü ve Hormonal Faktörler

Menstürel döngü, üreme öyküsü ve hormonal faktörlerin TNMK açısından riskleri hormon pozitif meme kanserlerinden çok az farklıdır. TNMK fenotipinde meme kanseri olan

kadınların genç yaşta menarj olduğu ve ilk tam hamileliğini genç yaşta geçirdiği görülmektedir. Ayrıca fazla sayıda hamilelik ve emzirme döneminin kısalığı TNMK riskini artırmaktadır. En az 4-6 ay emzirme TNMK riskini %25-50 oranında azaltmaktadır (Dawood, 2010, Millikan, 2008).

Kadınlarda TNMK için risk faktörlerini aşağıdaki şekilde özetleyebiliriz:

- 50 yaş altında premenapozal dönemde meme kanseri tanısı alma
- Siyahi ırka sahip olma
- Yüksek vücut kitle indeksi
- Genç yaşta menarj
- Çok sayıda hamilelik
- İlk doğumunu genç yaşta yapma
- Emzirmeme

TNMK erkeklerdeki meme kanseri olgularının yaklaşık %3-6'sını oluşturmaktadır. Erkeklerde de prognozu daha kötü olan TNMK, daha genç yaşta gözlenir, tanı koyulduğunda daha ileri seviyededir ve yüksek oranda mastektomiye gider (Leone ve diğerleri, 2017).

2.3.2. Triple negatif meme kanseri sınıflandırması

Lehman ve diğerlerinin 2011 yılında triple negatif meme kanserini 6 alt tip ve stabil olmayan tip olarak sınıflandırmışlardır. Bunlar: Bazal Benzeri-1 (BB-1), Bazal Benzeri-2 (BB-2), İmmünomodülatör (IM), Mezenkimal (M), Mezenkimal Kök Hücre Tipi (MKH) ve Luminal Androjen Reseptör (LAR). Daha sonra TNMK dört alt tipe indirgenmiştir.

Bazal Benzeri-1 (BB-1): Proliferasyona oranı yüksektir. Hücre döngüsü kontrolünü kaybetmişlerdir ve çok hızlı hücre bölünmesi gösterirler. Bu nedenle Ki67 mRNA'sını yüksek oranda sentezlerler ve antimitotik ajanlara karşı duyarlıdırlar. Hücre döngüsünü düzenleyen, DNA tamir ve DNA replikasyonu ile ilgili genlerin ifadeleri bozulmuştur.

Bazal Benzeri-2 (BB-2): Büyüme faktörü ve miyoepitel belirteçleri sentezlerler. Glikoliz ve glikoneogenez yolları aktive olmuştur. Bu alt tipte hücre sinyal yollarının normal olmayan aktivasyonu gözlenir.

İmmünomodülatör (IM): İmmün sistem hücrelerinden oluşmuşlardır. Sitokin ifadesi gösterirler ve antijen sunarlar. Medüller meme kanseri ile benzer özellikler göstermektedir. Prognozları iyidir. İmmün hücre ilişkili genlerin ve sinyal iletim yolları aktivedir.

Mezenkimal ve Mezenkimal Kök Hücre Tipi (M ve MKH): Epitelyal mezenkimal geçiş ve angiogenez (VEGFR2) belirteçleri sentezlerler. Dasatinib (Tirozin Kinaz inhibitörü) ve mTOR'a duyarlıdır. Mezenkimal alt tipte hücre göçüyle ilgili sinyal yolları, ekstraselüler matriks reseptör ilişkili yollar ve farklılaşma ile ilgili yollar aktive olmuştur. Mezenkimal kök hücre alt tipinde ise hücre çoğalması ile ilişkili genler düşük ifade gösterirken, kök hücre ilişkili genlerin, HOX genlerinin ve mezenkimal kök hücre spesifik belirteçlerin ifadesi artmıştır.

Luminal Androjen Reseptör (LAR): Diğer TNMK alt tiplerine göre farklı gen ifade profili gösterirler. Hormon ilişkili sinyal yolları aktive olmuştur. Androjen reseptör ifadesi gösterirler. Androjen reseptörüne karşı geliştirilmiş tedavi seçenekleri için en uygun alt gruptur (Dass ve diğerleri, 2021, Bosch ve diğerleri, 2010, De Ruijter ve diğerleri, 2011).

TNMK hücreleri ER, PR ve HER ifadesi göstermediğinden endokrin veya moleküler hedefli tedavilere duyarlı değildir. Sistemik tedavi olarak kemoterapi uygulanmakta fakat geleneksel cerrahi sonrası adjuvan kemoterapi etkinliği düşüktür. Çoğu erken evre TNMK hastaları için standart tedavi antrasiklin-taksan kürüdür. Antrasiklinin kontraedike olduğu durumlarda dosetaksel-siklofosfamid tedavisi uygulanabilmektedir. Neoadjuvan kemoterapi sonrasında residüel hastalığı olan hastalarda kapesitabin akla gen bir kemoterapik ajandır. Karboplatin ise tüm standart (doksorubisin, siklofosfamid, paklitaksel) kemoterapi ajanlarına eklenebilmektedir. Tam patolojik cevabın oluşmasını sağlamaktadır. BRCA mutasyonu bulunanlarda daha etkili olabilmekle birlikte ciddi toksisite göstermektedir (Caparica ve diğerleri, 2019, Colligon ve diğerleri, 2016, Cesar, 2020). TNMK alt tipleri için düşünülen ve çalışmaları devam eden bazı kemoterapotik ajanlar Çizelge 2.5'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. TNMK alt tiplerinin potansiyel tedavi seçenekleri

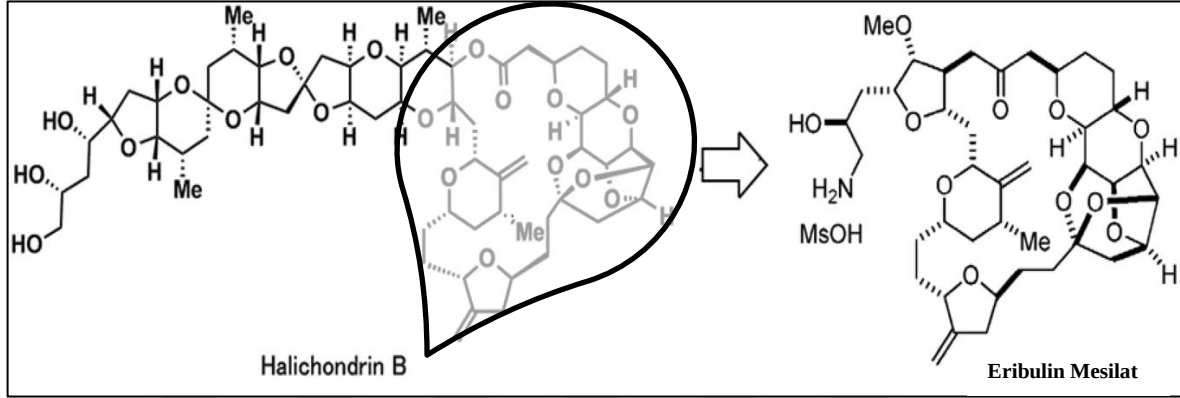
TNMK Alt Tipi	Özellikleri	İlişkili Genler / Sinyal Yolakları	Potansiyel Tedavi Seçenekleri
Bazal Benzeri-1	Proliferasyon Oranı Yüksek DNA Replikasyonu ve Onarımda Bozulma Hücre Döngüsünde Bozulma	MYC, TP53, PIK3CA, KRAS, FGFR1, CCNE1, CDK6, CDKN2A/B, BRCA2, PTEN, MDM2, RB1, IGF1R, AKT2,	Mitoz İnhibitörleri Sitostatik Ajanlar PARP İnhibitörleri Sentetik DNA İnhibitörleri
Bazal Benzeri-2	Büyüme Faktörü İlişkili Sinyal Yolaklarında Aktivasyon Metabolik Yolaklarda Aktivasyon	EGFR, MET, NGF, Wnt/ β -katenin, IGF-1R yolakları	Sitostatik Ajanlar PARP İnhibitörleri Büyüme Faktörü İnhibitörleri mTOR İnhibitörleri
İmmünomodülatör	İmmün Hücre İlişkili Genlerin Aktivasyonu	Th1/Th2, NK hücre, B Hücre Reseptör Sinyal, Dendritik Hücre, T Hücre Reseptör Sinyal, IL-12 ve IL-7 Yolakları	Sitostatik Ajanlar PARP İnhibitörleri İmmün Kontrol Noktası İnhibitörü
Mezenkimal	Hücre Göçüyle Sinyal Yolakları Aktivasyonu Ekstraselüler Matriks Reseptör İlişkili Yolakların Aktivasyonu Farklılaşma Yolakları Aktivasyonu	TGF- β Sinyal Yolağı, EMT İlişkili Genler Büyüme Faktörleri Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı	Büyüme Faktörü İnhibitörleri mTOR İnhibitörleri PI3K İnhibitörleri MAPK İnhibitörleri Scr İnhibitörleri
Mezenkimal Kök Hücre	Mezenkimal Alt Tipi Özellikleri Düşük Proliferasyon	Kök Hücre İlişkili Genler HOX Genleri	Büyüme Faktörü İnhibitörleri PI3K İnhibitörleri Scr İnhibitörleri mTOR İnhibitörleri MAPK İnhibitörleri
Luminal Androjen Reseptör	Hormonla İlişkili Yolakların Aktivasyonu Steroid Sentezi Porfirin Metabolizması Androjen/Östrojen Metabolizması	Hormon İlişkili Sinyal Yolakları	Nonsteroid Antiandrojenler mTor İnhibitörleri PI3K İnhibitörleri

2.4. Eribulin Mesilat Yapısı ve Etki Mekanizması

Eribulin mesilat halichondrin B'nin sentetik makrosiklik keton analogudur. Halichondrin B kompleks ve doğal bir poliyeter makrolittir. İlk defa 1985 yılında Hirata ve Uemura tarafından nadir bulunan bir Japon deniz süngeri olan Halichondria okadai'den izole edilmiştir. Bu araştırma grubu tarafından *in vitro* ve *in vivo* ortamda belirgin antikanser aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu deniz süngerinin nadir ve pahalı olmasından dolayı ilaç geliştirme çalışmaları duraklamıştır.

1998 yılında Yoshito Kishi'nin halichondrin B'nin sitotoksik fonksiyonunun C1-C38 motifindeki makolid lakton grubu olduğunun keşfetmesiyle, Eisai Araştırma Enstitüsü bu motifi içeren halichondrin B'nin sentetik analogu olan Eribulin Mesilat'ın (Halaven®) patentini almıştır (Şekil 2.3). Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (Food and

Drug Administration-FDA) 15 Kasım 2010 yılında antrasiklin ve taksan tedavisi içeren en az 2 kemoterapi rejimi uygulanmış metastatik meme kanserinde Eribulin mesilat kullanılmasına onay vermiştir. Ayrıca 2016 yılında FDA tarafından liposarkom için 2. kuşak tedavi için onay almıştır (Swami, 2015, Jimenez, 2018).



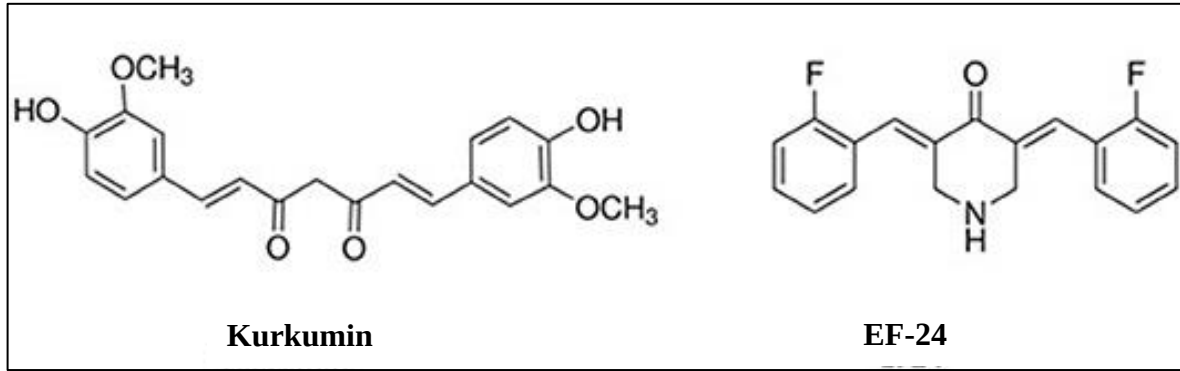
Şekil 2.3. Eribulin Mesilat yapısı

Eribulin mesilat bir mikrotübül dinamik inhibitörüdür ve antikanser etkisini tübüline bağlanarak göstermektedir. Tübiline bağlandığında; polimerizasyon inhibe olur ve mikrotübül uzaması engellenir. Hücrede geri dönüşümsüz mitoz blokajı oluşur ve hücre apoptoza gider.

Yapılan çalışmalar Eribulin mesilatın antikanser etkisinin sadece tübiline üzerinden olmadığını göstermiştir. Tümör mikroçevresini değiştirerek de kanser hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır. Antiangiogenik etkisi olmakta, tümör oksijen saturasyonunu artırmakta, TGF- β 1 plazma konsantrasyonunu düşürerek tümörün hipoksik bölgelerine oksijen akışını azaltmakta ve SMAD2 ve SMAD3 fosforilasyonunu baskılayarak *in vitro* migrasyon ve invazyonu, *in vivo* metastazı inhibe etmektedir (Funahashi, 2014).

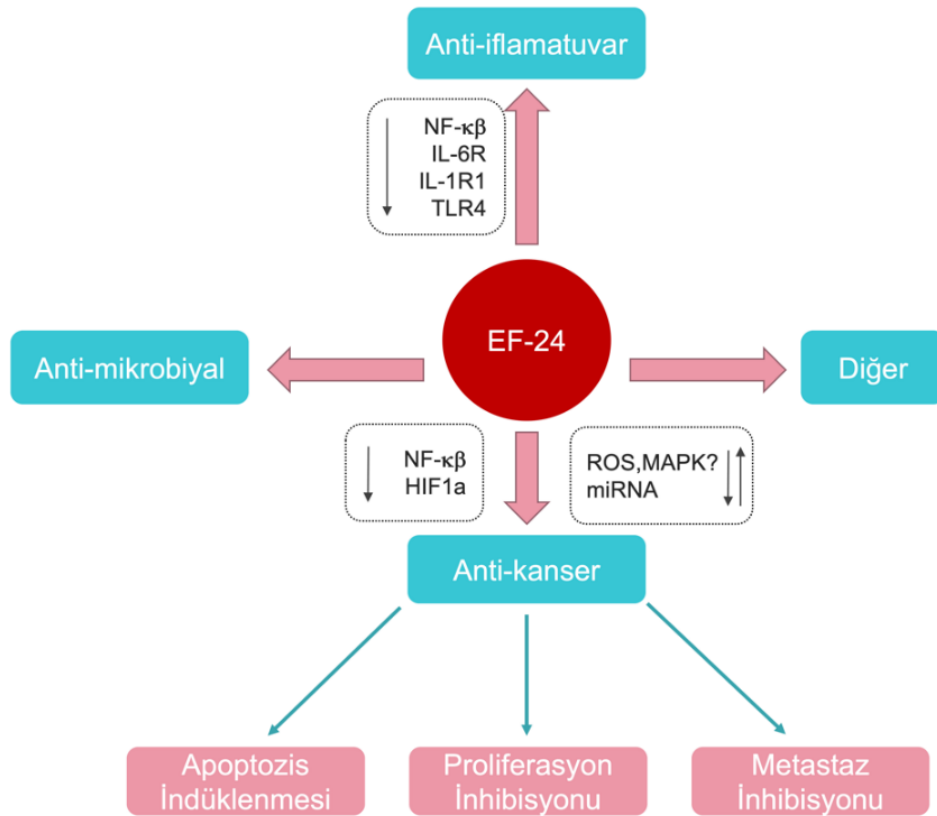
2.5. EF24 Yapısı ve Etki Mekanizması

EF24 bir hidroforik polifenol olan Curcuma long'nın (Kurkumin) sentetik analogudur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. EF24 yapısı

Antioksidan, anti-inflamatuvar, antimikrobiyal ve antikanser etkileri gösterilmiş olan kurkuminin düşük etkinlik profili olması ve oral biyoyararlanımının düşük olması nedeniyle sentetik olarak analogları üretilmiştir (Yonghan, 2018). Biyoyararlanımı en iyi analoglarından biri EF24'dir (Şekil 2.5).

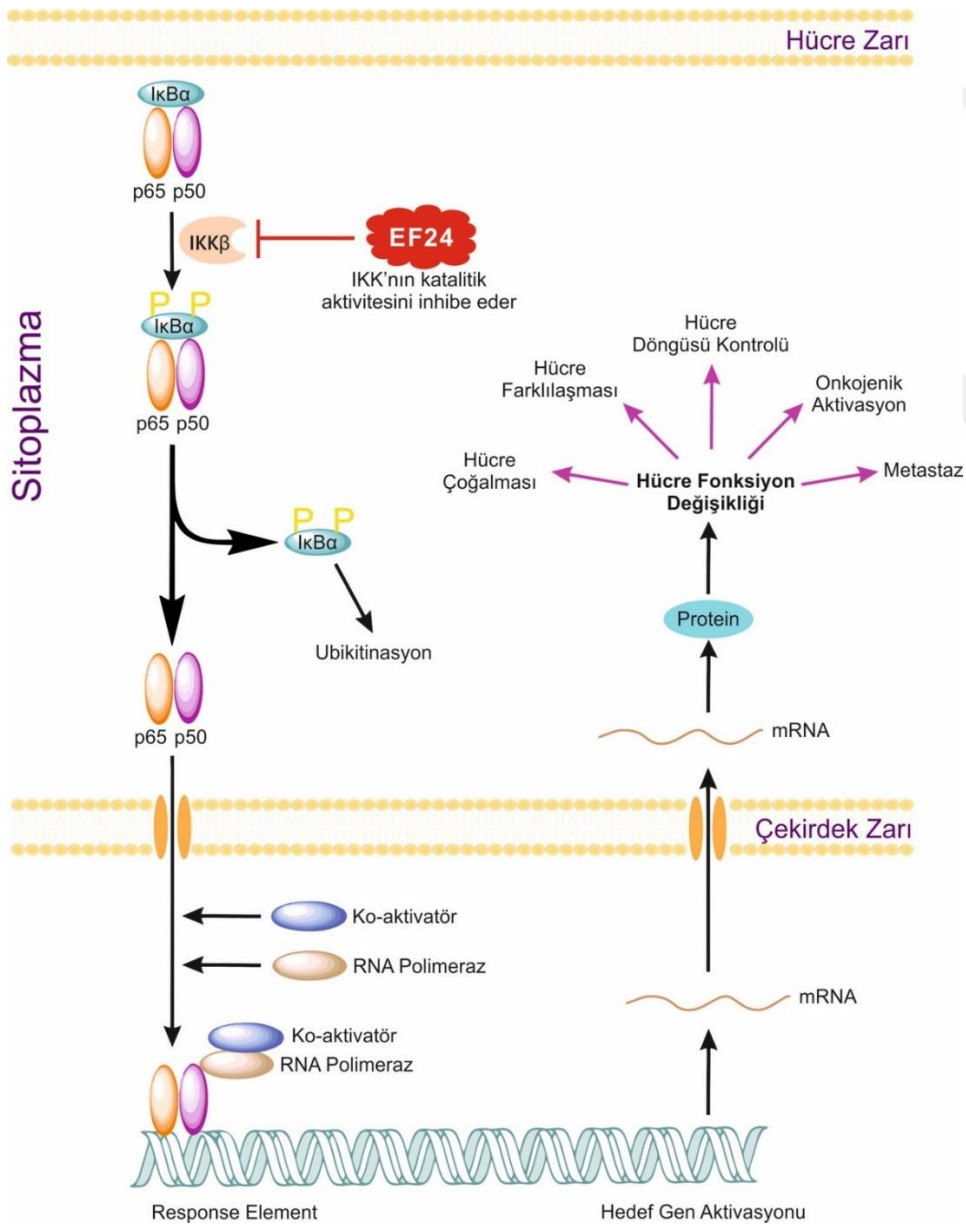


Şekil 2.5. EF24'ün etkileri

EF24 antikanser etkisini NF-κB sinyal yolağı üzerinden göstermektedir (Kasinski ve diğerleri, 2008). EF24 IκB kinaz'ı (IKKβ) üzerinden NF-κB sinyal yolağını inhibe ederek

hücreyi apoptoza götürür. NF- κ B hücrede birçok yolda yer alan genleri düzenlemektedir. Bu yollarlar:

- Hücre çoğalması
- Hücre farklılaşması
- Hücre döngüsünün kontrolü
- Onkojenik aktivasyon
- Metastaz



Şekil 2.6. EF24'ün NF- κ B yolağı üzerinden etki mekanizması

Yapılan birçok çalışmalarda EF24'ün antitümör etkisi gösterilmiştir. Lin ve diğerlerinin 2021 yılında yayınlanan çalışmalarında EF24'ün osteosarkom hücrelerinde hücre ölümünü uyardığı gösterilmiştir. Ayrıca metastazik kolanjiokarsinom fare modelinde yapılan bir çalışmada EF24'ün metastazı baskıladığı gösterilmiştir (Yin,2016). Adams ve diğerlerinin 2005 yılında TNMK hücre hattında (MDA-MB-231) yaptıkları bir çalışmada EF24'ün apoptozu indüklediği gösterilmiştir.

Agresif ve prognozu kötü bir meme kanseri alt tipi olan TNMK'nın günümüzdeki tedavi protokolleri ile ilk beş yılda mortalite oranı yaklaşık %40 dır. Meme kanseri hücrelerinde gözlenen spesifik belirteçlerinin olmamasından dolayı endokrin tedavi veya HER2 tedavisine yanıt vermeyen bu alt tipin henüz standart bir tedavisi bulunmamaktadır.

Literatürde TNMK hücrelerine EF24 ve eribulin'in uygulandığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada bu ajanların tek başlarına ya da birlikte uygulanmasının, hücre canlılığını nasıl etkileyeceğinin saptanması, hücrelerde sitotoksositeye neden olup olmayacağının belirlenmesi, hangi hücre ölüm yolağının ya da sağ kalım yollarının uyarılacağının tespiti hedeflenmektedir. Ayrıca, BRCA geninin TNMK hücrelerinde ifadesi ya da ifadesinin yokluğunun kullanacağımız ajanların oluşturacağı hücresel cevap üzerine etkisinin olup olmadığını belirlemeyi amaçlıyoruz.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hücre hatları

Bu tez çalışmasında BRCA Yabanıl Tip (+/+) Triple Negatif Hücre hattı olarak MDA-MB-231 ve BRCA Mutant Tip (-/-) Triple Negatif Hücre hattı olarak MDA-MB-436 kullanmıştır. Bu çalışmada kullanılan hücre hatları bölümümüzde önceki projelerde ticari olarak satın alınmıştır.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

- Biyogüvenlik kabini (DanLaf)
- Cedex XS Analyzer (Roche)
- Çalkalayıcı (Biosan 3D mini shaker)
- -86°C Derin dondurucu (Sanyo)
- -20°C Derin dondurucu (Sanyo)
- Dikey Elektroforez Sistemi (BioRad)
- Hassas terazi (Precisa)
- Invert mikroskop (Zeiss)
- Jel ve Membran Görüntüleme Cihazı (GelLogic 2200pro)
- Karbondioksitli Etüv (Sanyo)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan)
- Manyetik karıştırıcı (TMA 2071)
- Mikropipetler, 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Ependorf)
- Mikroplaka okuyucu (Spectramax M3, Molecular Devices)
- pH metre (WTW 422)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Soğutmasız santrifüj (Heraeus Labofuge 200)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22 R)
- Spin vorteks (Biosan)

3.1.3. Kullanılan sarf malzemeler

- Hücre dondurma ampülü (Greiner)
- Hücre kültür flaskları, 75 cm² (Nest Scientific)
- Hücre sayımı için tek kullanımlık Slayt (İbidi)
- 0.2, 0.6 ve 1.5 ml mikrosantrifüj tüpleri (Nest Scientific)
- Plaka, 96 kuyulu (Nest Scientific)
- Polivinildenflorit Membran (GVS)
- Santrifüj tüpleri 15 ve 50 ml (Nest Scientific)

3.1.4. Kullanılan kimyasal malzemeler

- 4X Örnek Yükleme Çözeltisi (BioRad)
- β -Merkaptoetanol (Merck)
- %5 Tripsin EDTA (Sartorius)
- Aquaguard 1 (Sartorius)
- Akrilamid (Amresco)
- Amonyum per Sülfat (Sigma)
- Bisakrilamid (Amresco)
- Eribulin Mesilat (MedChemExpress)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck)
- EF24 (Sigma)
- Etanol (Sigma)
- Fetal sığır serum (FBS) (Gibco)
- Glisin (Ablicam)
- Kemolimunisans Ajanı (BioRad)
- L-Glutamin içeren DMEM Besiyeri (Capricorn Scientific)
- Metanol (Merck)
- MTT (BioShop)
- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (Capricorn Scientific)
- Penisilin/Streptomisin (Sartorius)
- Protein Standartı (ABM)
- Sodyum Dodesil Sülfat (Ablicam)
- Tetrametiletildiamin (Sigma)

- Tripan mavisi boyası (Sigma)
- Tris (Ablicam)
- Twin 20 (BioShop)

3.1.5. Kullanılan kitler ve antikorlar

- Beclin 1 Monoklonal Antikoru (Proteintech)
- BCA Protein Tayin Kiti (Thermo)
- Cell Death Detection ELISA (Roche)
- HRP Konjuge Antimouse m-IgG_k BP-HRP (Santa Cruz)
- GAPDH Monoklonal Antikoru (Santa Cruz)
- m-IgG_k BP-HRP (Santa Cruz)
- Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (II) (Cell Signaling)
- Phospho-ERK 1/2/JNK/P38 α ELISA Kit (RayBiotech)
- p62 Monoklonal Antikoru (Proteintech)
- NF kappaB p65 (pS536 + Total) (Abcam)

3.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı

a) %1 FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanışı;

Besiyeri 495 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyeri içerisine 5 ml Fetal Bovine Serum (FBS), penisilin (100 IU/ml) ve streptomisin (100 μ g/ml) olacak şekilde eklendi. FBS oranı %1, Penisilin-Streptomisin oranı %1 olan DMEM besiyeri hazırlandı.

b) %10 FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanışı;

Besiyeri 450 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyeri içerisine 5 ml Fetal Bovine Serum (FBS), penisilin (100 IU/ml) ve streptomisin (100 μ g/ml) olacak şekilde eklendi. FBS oranı %10, Penisilin-Streptomisin oranı %1 olan DMEM besiyeri hazırlandı.

c) %0,5 MTT karışımının hazırlanması;

MTT çözeltisini hazırlamak için toz halinde bulunan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromit konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde tartıldı. PBS (Fosfat Buffer Saline) içerisinde çözöldü. Hazırlanan stok çözelti, por çapı 0,20 µm olan filtreden geçirilerek daha az miktarlara ayrılmak suretiyle +4°C’de karanlıkta saklandı.

d) 20 mM EF24 stok çözeltisinin hazırlanması;

5 mg EF24 tartılıp 803 µl DMSO içerisinde çözöldü. Kullanılincaya kadar -20°C’de saklandı. Hazırlanan stok çözelti seyreltilip çeşitli konsantrasyonlarda hücrelere uygulandı.

e) 1 mM Eribulin Mesilat (EM) stok çözeltisinin hazırlanması;

0,5 mg Eribulin Mesilat tartılıp 605,3 µL DMSO içerisinde çözöldü. Stok çözelti kullanılincaya kadar -20°C’de saklandı. Hazırlanan stok çözelti seyreltilip çeşitli konsantrasyonlarda hücrelere uygulandı.

f) %10’luk SDS hazırlanışı (100 ml)

10 g sodyum dodesil sülfat tartıldı. 100 ml distile su içerisinde çözöldü. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

g) 1,5 M Tris buffer (pH:8,8) (150 ml)

27,23 g Tris base tartıldı. 80 ml distile su içerisinde çözöldü (pH8,8). Distile su ile 150 ml’ye tamamlandı. +4°C’de saklandı.

h) 0,5 M Tris buffer (pH:6,8) (100 ml)

27,23 g Tris base tartıldı. 60 ml distile suda çözöldü (pH 6,8). Distile su ile 100 ml’ye tamamlandı. +4°C’de saklandı.

ı) 10X Running buffer (pH:8,3) (1000 ml)

500 ml distile su içerisinde 30,3 g Tris base, 144 g glisin ve 10 ml %10'luk SDS çözöldü. Toplam hacim distile su ile 1000 ml'e tamamlandı.

i) 10X Tris-Glisin stok solösyonu

30,3 g tris base tartıldı. 1000 ml distile suda, 144 g glisin ile çözöldü.

j) Transfer buffer

600 ml distile su, 10X konsantrasyondaki Tris glisin stoğu (100ml) ve metanol (200 ml) karıştırıldı (pH 8,3). Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

k) % 10 Amonyum persölfat (APS) solösyonu

1 ml suda 100 mg APS çözöldü. Her çalışma öncesi taze olarak hazırlandı.

l) 10X TBS solösyonu

500 ml distile suda 12,1 g Tris base ve 40 g NaCl çözöldü. 1X'inin pH'sı 7,4'e ayarlandı.

m) Primer ve sekonder antikor dilösyon solösyonu

Taze olarak 10 ml 1X TBS, %1 Tween20 ve 0,3 g BSA ile hazırlandı. Antikorlar uygun dilösyonda seyreltildi.

n) Örnekleme hazırlama solösyonu

10 ml örnekleme hazırlama solösyonu için 1,25 ml 2M Tris HCL (pH:6,8), 4 ml Gliserol, 4 ml %20 SDS ve % 0,0002 BP blue (0,75 ml) karıştırılarak hazırlandı.

o) SDS-PAGE için Jel Hazırlanması

Yökleme jeli toplamda 5 ml olacak şekilde; Distile su (3.4 ml), %30 Akrilamid/Bisakrilamid (0.83 ml), 1 M Tris (pH 6.8 0.63 ml), %10 SDS (0.05 ml), %10 APS (0.05 ml) ve TEMED (0.005 ml) karıştırılarak hazırlandı.

Toplamda 10 ml % 10'luk ayırma jeli için; Distile su (4 ml), %30 Akrilamid/Bisakrilamid (3.3 ml), 1,5 M Tris (pH 8.8 2,5 ml), %10 SDS (0,1 ml), %10 APS (0,1 ml) ve TEMED (0,004 ml) karıştırılarak hazırlandı.

ö) Stripping Solüsyonu

%10 SDS (20ml), 0,5 M Tris HCL (pH:6,8 12,5 ml), distile su (67,5 ml) ve β merkaptotanol (0,8 ml) karıştırılarak hazırlandı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hücre kültürü

Bu çalışmada MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 Triple Negatif Meme kanseri hücre hatları %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM besiyerinde %5 CO₂'li ve nemli etüvde 37°C de çoğaltıldı. MDA-MB-231 hücre hattı düşük glukoz (düşük glikoz) ve MDA-MB-436 hücre hattı yüksek glukoz (yüksek glikoz) içeren DMEM besiyerinde inkübe edildi. Hücre sayımı Cedex XS Analyzer cihazı ve Triptan mavisi çözeltisi kullanılarak yapıldı.

3.3.2. Hücre canlılığının belirlenmesi

Hücre canlılığının belirlenmesinde MTT yöntemi kullanıldı. MTT sarı renkte çözünür bir tetrazolyum boyasıdır. Canlı hücrelerde bulunan dehidrojenaz enzimi aktivitesi ile indirgenerek mor renkli formazan kristallerine dönüşür. Mossmann ve arkadaşlarının 1983 yılında yayınlanan çalışmalarında MTT analizi sonucu oluşan renk yoğunluğu ile canlı hücre sayısı arasında pozitif bağlantı olduğu gösterilmiştir (Mosmann, 1983)

Çalışmamızda MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 Triple Negatif Meme kanseri hücre hatlarına EF24 ve Eribulin Mesilat farklı konsantrasyonlarda tek başlarına, birlikte ve sıralı olarak 24 ve 48 saat uygulandı. Sıralı uygulamada EF24 hücrelere 24 saat uygulandı. Sonrasında EF24 içeren besiyeri uzaklaştırıldı ve EM içeren besiyeri ile 24 saat daha inkübe edildi. Fakat, sıralı uygulama sonucu elde edilen hücre canlılık oranları birlikte uygulama ile karşılaştırıldığında, hücre canlılığının fazla olması nedeniyle çalışmanın geri kalan

bölümlerinde ajanların birlikte uygulanması ile devam edildi. MTT yöntemi ile hücre canlılığı belirlendi.

Cedex XS Analyzer cihazı ile hücrelerin sayımı gerçekleştirildikten sonra 96 kuyulu hücre kültür plakalarında her kuyuya 10.000/100 µl hücre gelecek şekilde %1 FBS içeren DMEM besiyerine hücreler ekildi. MDA-MB-231 hücre hattı için düşük glukoz (düşük glikoz) ve MDA-MB-436 hücre hattı için yüksek glukoz (yüksek glikoz) içeren DMEM besiyeri kullanıldı. Kültür plakaları %5 CO₂'li ve nemli etüvde 37°C de 24 saat inkübe edildi. EF24 ve Eribulin Mesilat'ın stok çözeltileri ve %10 FBS içeren DMEM besiyeri kullanılarak EF24 ve Eribulin Mesilat'ın farklı konsantrasyonları hazırlandı. Hücreler bu konsantrasyonlarda tek başlarına, birlikte ve sıralı olarak 24 ve 48 saat olarak %5 CO₂'li ve nemli etüvde 37°C inkübe edildi. Kültür ortamında DMSO %0,1'in altında tutuldu. Süre sonunda hücre kültür kaplarındaki kuyularda bulunan besiyeri uzaklaştırıldı. Her bir kuyuya 90 µl %10 FBS içeren DMEM besiyeri ve stok MTT çözeltisinden 10 µl eklenerek 3 saat 37°C'lik etüvde inkübe edildi. MTT boyası uzaklaştırıldı. Formazan kristalleri her bir kuyuya 100 µl DMSO'nun eklenmesi suretiyle çözüldü. Mikroplaka okuyucusu (Spectramax M3 plate reader, Molecular Devices) kullanılarak 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Deney 4 tekrarlı yapıldı. Ortalama absorbans değerleri hesaplandı. EF24 ve/veya Eribulin Mesilat ile muamele edilmeyen kontrol hücrelerinin canlılığı (DMSO ile hazırlanan DMSO kontrol) %100 olarak kabul edildi. EF24 ve/veya Eribulin Mesilat ile inkübe edilen hücrelerin ortalama absorbans değeri, kontrol hücrelerinin absorbans değerine ile oranlandı. Yüzde olarak hücre canlılığı belirlendi.

3.3.3. DNA fragmentasyon oranının belirlenmesi

DNA fragmentasyon oranlarının belirlenmesinde Cell Death Detection ELISA (Roche) kiti kullanıldı.

MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 hücreleri 96 kuyulu kültür kaplarında her bir kuyucuğa 10.000 hücre gelecek şekilde %1 FBS'li DMEM ile ekildi. Hücrelere daha önce belirtilen miktarda 8 µM EF24, 10 nM EM ve 8 µM EF24 + 10 nM EM %10 FBS'li DMEM ile verilerek 24 saat inkübe edildi. Tüm konsantrasyonlarda deney çift tekrarlı yapıldı.

Süre sonunda 200 µL lizis tamponu eklenerek oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Hücre lizatı mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 10 dk 1000 rpm'de santrifüj edildi. Streptavidin kaplı mikropalakaya, 20 µL üstte kalan sıvı koyuldu. 80 µL anti-histon biyotin ve anti-DNA POD koyulduktan sonra çalkalayıcıda oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda 3 defa yıkama çözeltisi (300 µL) ile oda sıcaklığında yıkandı. Peroksidaz substrat çözeltisinden (ABTS) 100 µL eklenerek oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi. 100 µL ABTS durdurucu çözeltisi eklendi. Mikroplaka okuyucuda 405 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu.

3.3.4. MAPK sağ kalım yolağında görevli proteinlerin düzeyinin belirlenmesi

MAPK sağ kalım yolağında görevli proteinlerin düzeyinin belirlenmesinde Phospho-ERK 1/2/JNK/P38α ELISA Kit (RayBiotech) kullanıldı. MAPK sağ kalım yolağındaki ERK 1/2, JNK ve p38 proteinlerinin düzeyleri ve fosforile durumlarının miktarları analiz edildi.

Kit protokolüne uygun olarak hücre lizatları ve pozitif kontrol çözeltileri hazırlandı. MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 hücreleri 96 kuyulu kültür kaplarında her bir kuyucuğa 10.000 hücre gelecek şekilde %1 FBS'li DMEM ile ekildi. Hücrelere daha önce belirtilen miktarda 8 µM EF24, 10 nM EM ve 8 µM EF24 + 10 nM EM %10 FBS'li DMEM ile verilerek 24 saat inkübe edildi. Hücreler PBS ile yıkandı ve 1 ml'de 4x10⁷ hücre bulunacak şekilde 1x Lizis tamponunda çözündürüldü. Lizatlar 2-8 °C'de 30 dakika sallayıcı üzerinde inkübe edildi ve 2-8 °C'de 10 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Üste kalan sıvı temiz test tüpüne alınıp hızlıca -70°C'de donduruldu.

Antikorlarla kaplanmış mikropalkanın her bir kuyusuna 100 µL örnek veya pozitif kontrol eklenip sarıldı ve 2,5 saat oda sıcaklığı inkübe edildi. Çözelti uzaklaştırılıp kuyular yıkandıktan sonra hazırlanan primer antikordan her kuyuya 100 µL eklendi. Oda sıcaklığında inkübe edildi (1 saat). Süre sonunda kuyular yıkandı ve hazırlanan 1x HRP-bağlı antikor çözeltisinden 100 µL eklenip, 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Kuyular yıkandı ve 100 µL TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) one-step substrat reaktifinden eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edin. Son olarak kuyular tekrar yıkandı ve her bir kuyuya 50 µL durdurma çözeltisi eklenip bekletilmeden 450 nm'de mikropalaka okuyucu ile ölçüm yapıldı.

3.3.5. NF- κ B aktivite düzeyinin belirlenmesi

NF- κ B aktivite düzeyinin belirlenmesi için NF kappaB p65 (pS536 + Total) (Abcam) kiti kullanıldı. Kit protokolüne uygun olarak hücre lizatları ve pozitif kontrol solüsyonları hazırlandı. Kuyulara 50 μ L hücre lizatı veya kontrol eklendi. Daha sonra 50 μ L antikor kokteyli eklendi. Oda sıcaklığında inkübe edildi (1 saat). Süre sonunda tüm sıvı kuyulardan uzaklaştırılıp 350 μ L 1X Wash Buffer PT ile üç kez yıkandı. Her kuyuya 100 μ L TMB Substrat eklenip ve 15 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 100 μ L durdurma solüsyonu eklendi ve mikropilaka okuyucusunda 450 nm'de absorban değerleri okundu.

3.3.6. Mitokondriyal membran potansiyelinin değişiminin belirlenmesi

Mitokondriyal membran potansiyelinin değişiminin belirlenmesinde Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (II) (Cell Signaling) kullanıldı. Bu yöntemde mitokondriyal membran potansiyeli tetrametilrodamin etil ester (TMRE) floresan boyası kullanılarak belirlendi. Bu boya pozitif yüklüdür ve mitokondri membranından geçebilmektedir. Mitokondriler depolarize olduğunda TMRE sitoplazmaya yayılmakta ve hücrede floresan yoğunluğu artmaktadır. 8 μ M EF24, 10 nM EM ve 8 μ M EF24 + 10 nM EM %10 FBS'li DMEM ile verilerek 24 saat inkübe edilen hücrelere ve negatif kontrole TMRE 1000nM nihai konsantrasyonda eklenip 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

3.3.7. Protein miktar tayini

Hücre lizatlarında bulunan protein miktarlarının belirlenmesi için Bikinkoninik Asit (BCA) kiti kullanıldı. Standartlar bovine serum albüminin ve saf su kullanılarak 2000 μ g/ml, 1500 μ g/ml, 1000 μ g/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml, 125 μ g/ml ve 0 μ g/ml konsantrasyonlarda hazırlandı. 96 kuyulu plakanın herbir kuyusuna iki tekrarlı olacak şekilde 25'şer μ l örnek veya standart dağıtıldı. Reaktif B:A oranı 1:50 olacak şekilde hazırlanarak herbir kuyuya 200 μ l eklendi. 37°C de yarım saat inkübe edildi. ELISA mikropilaka okuyucuda 562 nm dalga boyunda ölçüm okundu. Standart solüsyonlardan elde edilen dalga boyu ve konsantrasyon oranları kullanılarak Microsoft excel programında standart eğri çizilip regresyon denklemi oluşturuldu. Örneklerde bulunan protein konsantrasyonu elde edilen bu denklem aracılığı ile hesaplandı.

3.3.8. Beclin1, p62 ve GAPDH protein miktarlarının western blot yöntemi ile belirlenmesi

Yükleme ve ayırma jeli döküldü. Örnekler her kuyuya 30 µg protein gelecek şekilde örnek hazırlama solüsyonu ile dilüye edildi. 95 °C de 5 dakika denatüre edildi. Oda sıcaklığına gelince ilk kuyuya marker protein çözeltisi ve diğer kuyulara örnekler yüklendi. Jel 1X running buffer içerisinde önce 20 mA ve daha sonra 40 mA'de 2 saat yürütüldü.

Jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinlerin gözle takibi marker aracılığı ile yapıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra jel üzerinde bulunan proteinler GVS membrana transfer edildi. Transfer kasetine sünger, kurutma kâğıdı, jel ve GVS membran yerleştirildi. Transfer tamponu içerisinde 2 saat 200mA'de transfer işlemi gerçekleştirildi.

Membranlar %5 lik kazeinde bloklandı. Üç kez TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Beclin 1 ve p62 primer antikorları eklendi. Bir gece boyunca +4°C de çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Üç kez TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Sekonder antikorlar eklendi. Oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde iki saat beklettikten sonra üç kez TBS-T solüsyonu ile yıkandı. CL Chemiluminescent HRP Western substrat solüsyonu ile karanlıkta 5 dakika karıştırıcı üzerinde bekletildi. Gel Logic 2200 Pro cihazında Carestreem programı kullanılarak görüntülendi. GAPDH analizi için membranlara stripping yapıldı. Membranlar 50°C de 45 dakika stripping solusyonunda bekletildi. TBST-T ile üç kez yıkanan membranlar bloklanarak yukarıdaki işlemler GAPDH antikorları kullanarak tekrarlandı. Bant kalınlıkları ImageJ programı kullanılarak değerlendirildi.

3.4. İstatistiksel Analiz

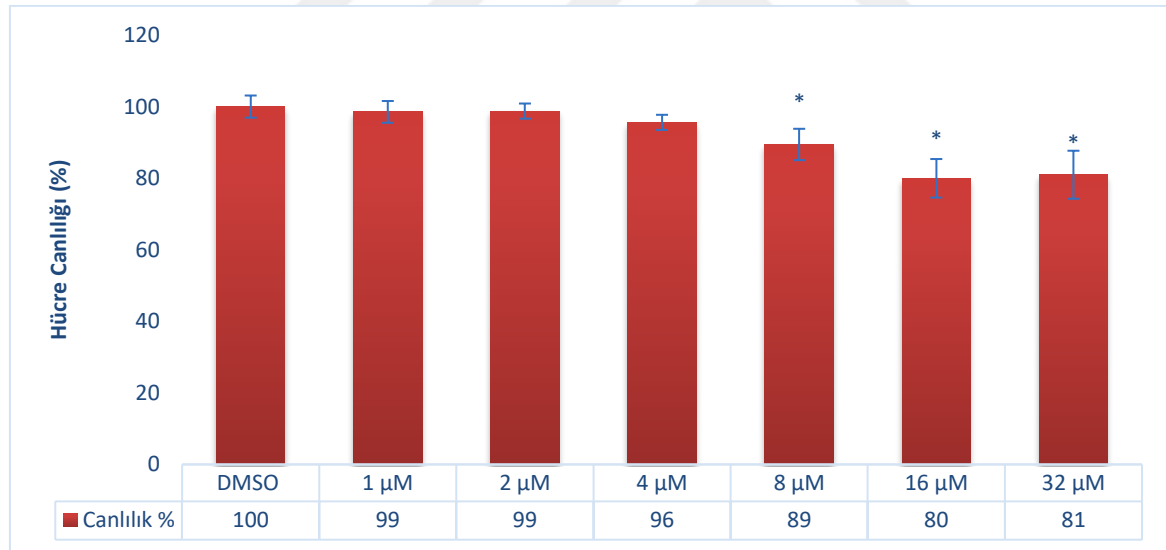
İstatistiksel analiz için SPSS-24 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) ve e-PICOS programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistiklerden ortalama $\pm$ standart sapma, yüzde ve oran kullanıldı. Sürekli verilerin karşılaştırılmasında student t testi kullanıldı. Oranların karşılaştırmasında Z testi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığının MTT Yöntemi ile Belirlenmesi

4.1.1. EF24'ün hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-231 hücrelerinde belirlenmesi

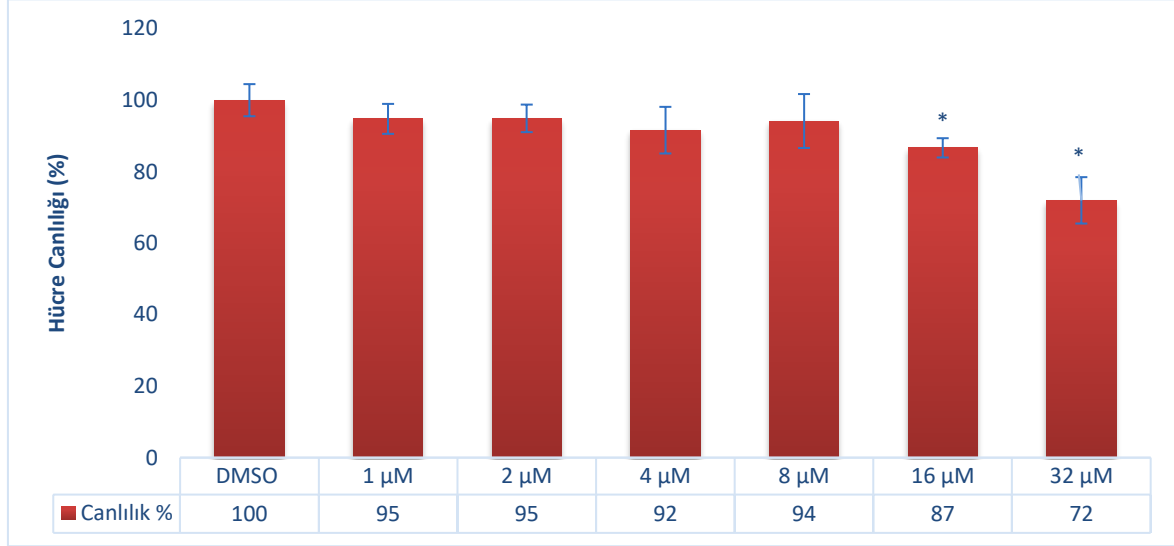
EF24, MDA-MB-231 hücrelerine 24 saat değişen konsantrasyonlarda uygulandı. Kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, hücre canlılığının konsantrasyona bağlı olarak azaldığı belirlendi. EF24'ün 1, 2 ve 4 μM olduğu konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücrelerindeki canlılığının yaklaşık %100 olduğu görüldü. Hücre canlılığının, 8 μM konsantrasyonda %89, 16 ve 32 μM konsantrasyonda yaklaşık %80 düzeylerinde olduğu belirlendi. MDA-MB-231 hücrelerine EF24 24 saat uygulandığında, 8 μM ($p=0,005$), 32 μM ($p=0,001$), 16 μM ($p=0,005$) konsantrasyonlarda azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. MDA-MB-231 hücrelerine EF24'ün 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *DMSO (Kontrol) grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değeri $p < 0.05$

EF24, MDA-MB-231 hücrelerine 48 saat değişen konsantrasyonlarda uygulandı. Kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, hücre canlılığının konsantrasyona bağlı olarak azaldığı belirlendi. EF24'ün 1, 2, 4 ve 8 μM olduğu konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücrelerindeki canlılığın %92-100 düzeylerinde olduğu görüldü. Hücre canlılığının, 16 μM konsantrasyonda %87, ve 32 μM konsantrasyonda %72 olduğu belirlendi. MDA-MB-231

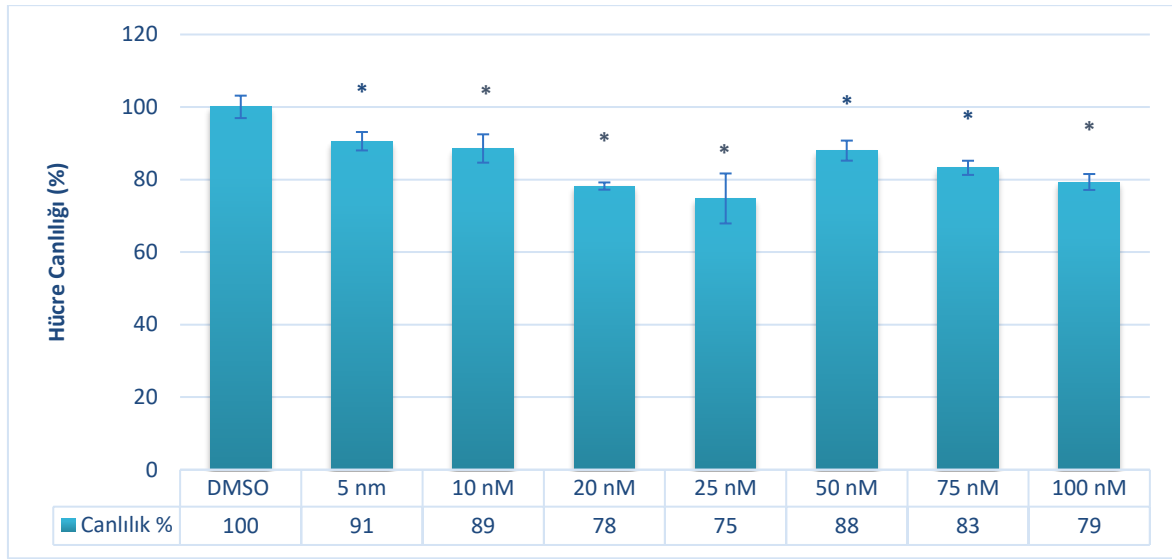
48 saat uygulandığında, 16 μM ($p=0,006$) ve 32 μM konsantrasyonlarda ($p<0,001$) hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. MDA-MB-231 hücrelerine EF24'ün 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *DMSO (Kontrol) grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değeri $p < 0,05$

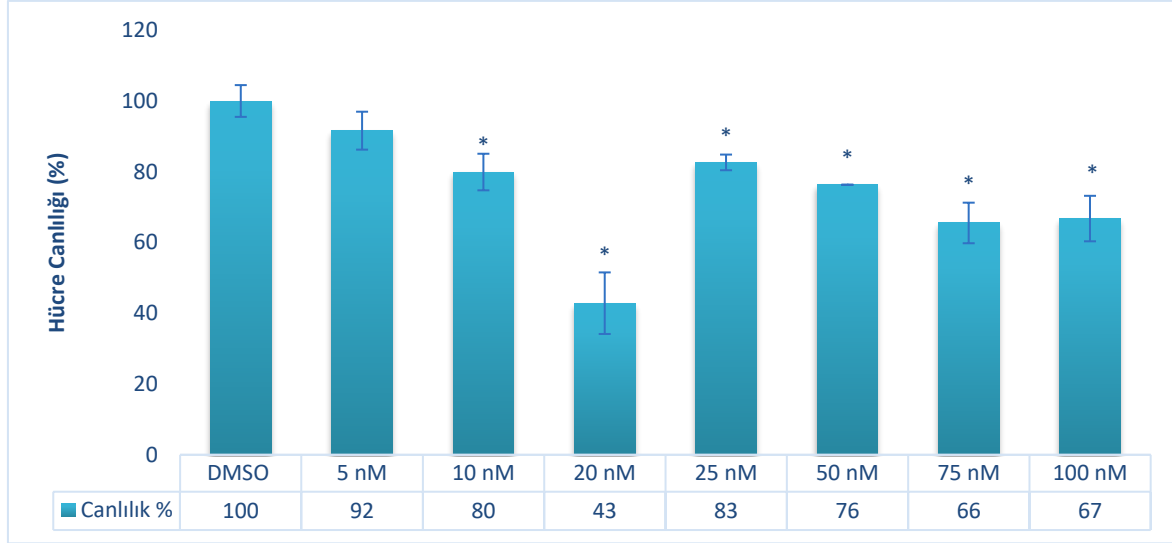
4.1.2. Eribulin Mesilatın hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-231 hücrelerinde belirlenmesi

EM, MDA-MB-231 hücrelerine 24 saat değişen konsantrasyonlarda uygulandı. Yapılan değerlendirmede, hücre canlılığının konsantrasyona bağlı azaldığı saptandı. Hücre canlılığının, 5nM konsantrasyonda %91, 10nM konsantrasyonda %89, 20 nM konsantrasyonda %78 ve 25nM konsantrasyonda %75 olduğu belirlendi. MDA-MB-231 hücrelerine EM 24 saat uygulandığında 5nM ($p=0,020$), 10 nM ($p=0,014$), 20 nM ($p=0,001$), 25 nM ($p=0,001$), 50 nM ($p=0,003$), 75 nM ve 100 nM konsantrasyonlarda ($p<0,001$) hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. MDA-MB-231 hücrelerine EM'nin 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *DMSO (Kontrol) grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri $p < 0.05$

EM, MDA-MB-231 hücrelerine 48 saat değişen konsantrasyonlarda uygulandı. Yapılan değerlendirmede, hücre canlılığının EM'nin düşük konsantrasyonlarında (5-20 nM) konsantrasyona bağlı olarak azaldığı belirlendi. 20nM konsantrasyonda hücre canlılığın %43'e düştüğü gözlemlendi. EM'nin yüksek konsantrasyonlarında ise (25-100) düşük konsantrasyonlara göre bir artış gözlenmiş ancak konsantrasyon arttıkça bir azalma saptandı. Hücre canlılığının, 25 nM konsantrasyonda %83, 50 nM konsantrasyonda %76, 75-100 nM konsantrasyonlarda ise %66 olduğu belirlendi. MDA-MB-231 hücrelerine EM 48 saat uygulandığında 10 nM ($p=0,002$), 20 nM ($p<0,001$), 25 nM ($p=0,002$), 50 nM ($p=0,002$), 75 nM ($p<0,001$) ve 100 nM ($p=0,001$) canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.4).

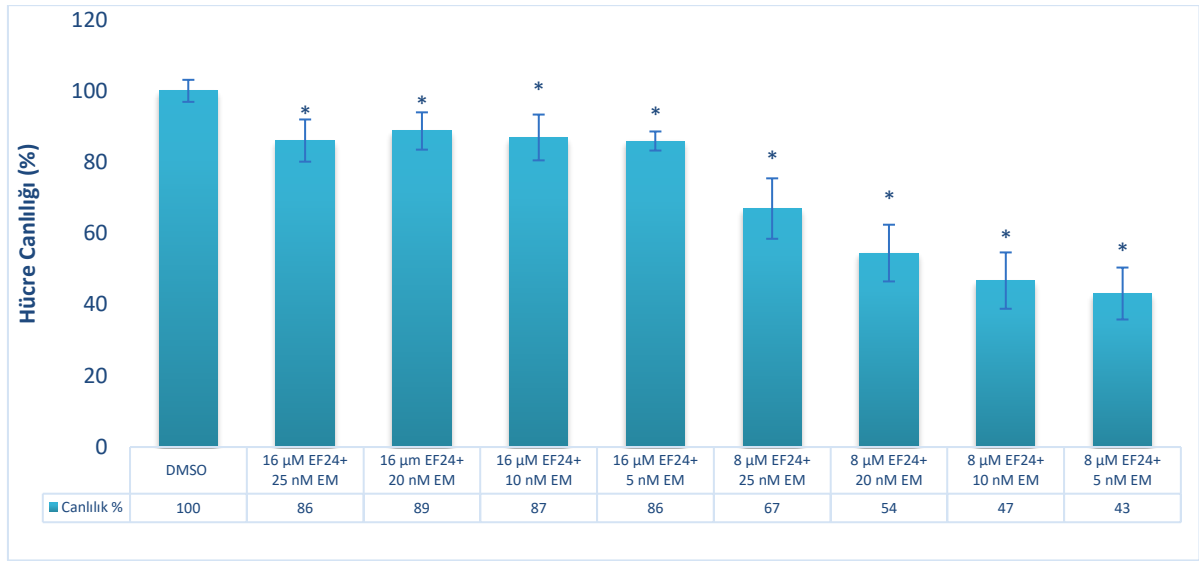


Şekil 4.4. MDA-MB-231 hücrelerine EM'nin 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *DMSO (Kontrol) grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri $p < 0.05$

4.1.3. EF24 ve Eribulin Mesilatın birlikte uygulanmasının hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-231 hücrelerinde belirlenmesi

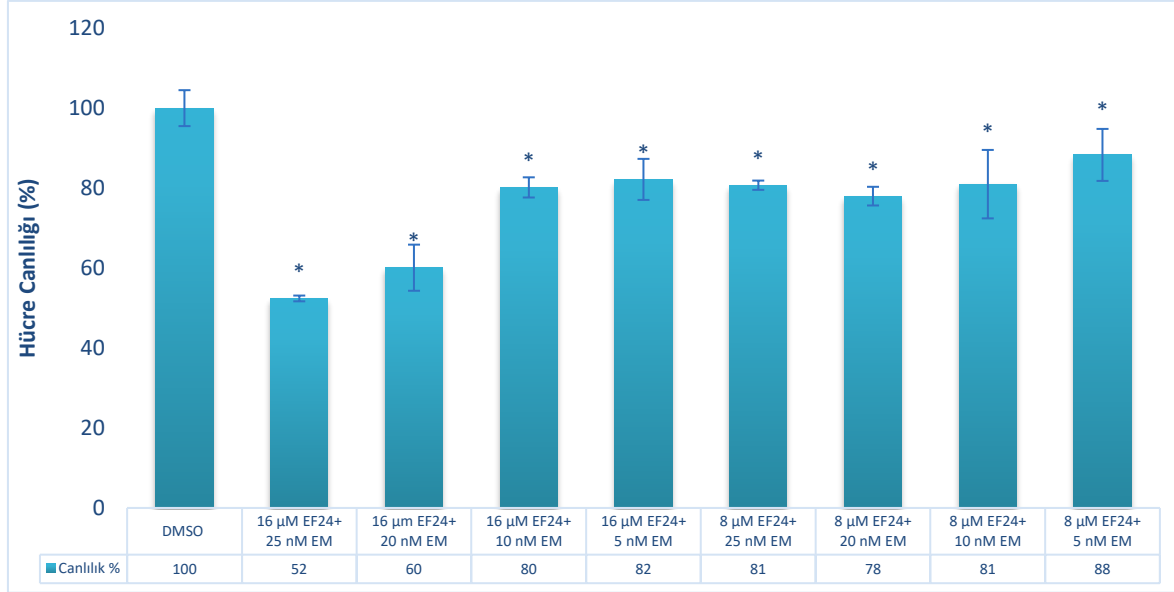
MDA-MB-231 hücrelerine tek başına uygulanan ajanların sonuçları değerlendirildikten sonra, EF24'ün 8 ve 16 μM konsantrasyonları birlikte uygulama deneyleri için seçildi. EF24'ün bu konsantrasyonları sabit uygulanıp, değişen düşük EM konsantrasyonlarındaki (5-25 nM) hücre canlılığı oranları 24 ve 48 saat sonunda değerlendirildi.

16 μM sabit EF24 konsantrasyonu ile EM'nin değişen konsantrasyonları (5-25 nM) 24 saat süresince MDA-MB-231 hücrelerine birlikte uygulandığında, hücre canlılık oranlarının, her ajanın tekli uygulaması ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak değişmediği gözlemlendi. Ancak, 8 μM sabit EF24 konsantrasyonu ile değişen EM konsantrasyonları birlikte uygulandığında, EM konsantrasyonları azaldıkça, hücre canlılığının anlamlı oranda azaldığı belirlendi. EF24 ve EM 24 saat MDA-MB-231 hücrelerine birlikte uygulandığında 16 μM EF24+25 nM EM ($p=0,003$), 16 μM EF24+20 nM EM ($p=0,007$), 16 μM EF24+10 nM EM ($p=0,010$), 16 μM EF24+5 nM EM ($p=0,005$), 8 μM EF24+25 nM EM ($p<0,001$), 8 μM EF24+20 nM EM ($p<0,001$), 8 μM EF24+10 nM EM ($p<0,001$) ve 8 μM EF24+5 nM EM ($p<0,001$) konsantrasyonlarında hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. MDA-MB-231 hücrelerine EF24 ve EM'nin 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda birlikte uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları
*DMSO (Kontrol) grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri $p < 0.05$

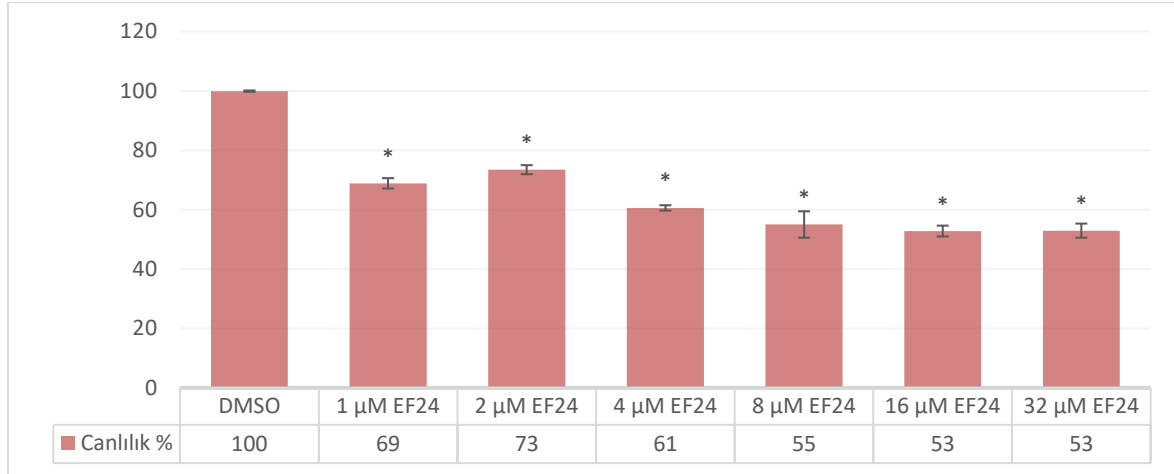
16 μ M sabit EF24 konsantrasyonu ile EM'nin değişen konsantrasyonları (5-25 nM) 48 saat süresince MDA-MB-231 hücrelerine birlikte uygulandığında, hücre canlılık oranlarının, EM'nin artan konsantrasyonlarında anlamlı olarak değiştiği gözlemlendi. Ancak, 8 μ M sabit EF24 konsantrasyonu ile değişen EM konsantrasyonları birlikte uygulandığında, 24 saatte gözlenen düşüş 48 saatte gözlenmedi. EF24 ve EM 48 saat MDA-MB-231 hücrelerine birlikte uygulandığında 16 μ M EF24+25 nM EM ($p < 0.001$), 16 μ M EF24+20 nM EM ($p < 0.001$), 16 μ M EF24+10 nM EM ($p = 0.005$), 16 μ M EF24+5 nM EM ($p = 0.003$), 8 μ M EF24+25 nM EM ($p = 0.001$), 8 μ M EF24+20 nM EM ($p < 0.001$), 8 μ M EF24+10 nM EM ($p = 0.004$) ve 8 μ M EF24+5 nM EM ($p = 0.018$) konsantrasyonlarında hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. MDA-MB-231 hücrelerine EF24 ve EM'nin 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda birlikte uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *DMSO (Kontrol) grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri $p < 0.05$

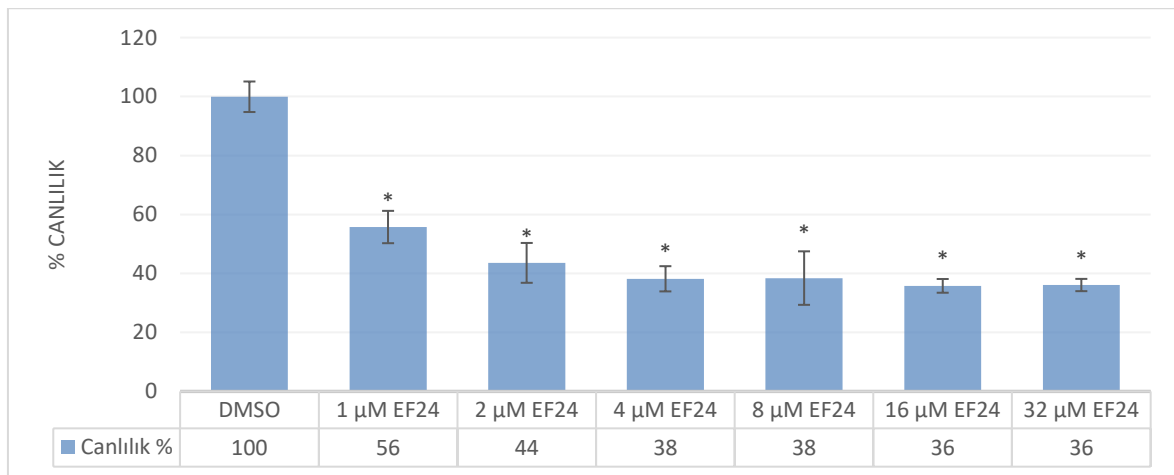
4.1.4. EF24'ün hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-436 hücrelerinde belirlenmesi

EF24, MDA-MB-436 hücrelerine 24 saat değişen konsantrasyonlarda uygulandı. Kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, hücre canlılığının konsantrasyona bağlı olarak azaldığı belirlendi. EF24'ün 1, 2 ve 4 µM olduğu konsantrasyonlarda MDA-MB-436 hücrelerindeki canlılığın %60-70 olduğu görüldü. Hücre canlılığının, 8, 16 ve 32 µM konsantrasyonlarda %50 düzeylerinde olduğu belirlendi. MDA-MB-436 hücrelerine EF24 24h uygulandığında; 1 µM ($p=0,015$), 2 µM ($p=0,016$), 4 µM ($p=0,002$), 8 µM ($p<0,001$) 16 µM ($p<0,001$), 32 µM ($p<0,001$) konsantrasyonlarda hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. MDA-MB-436 hücrelerine EF24'ün 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *DMSO (Kontrol) grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri $p < 0.05$

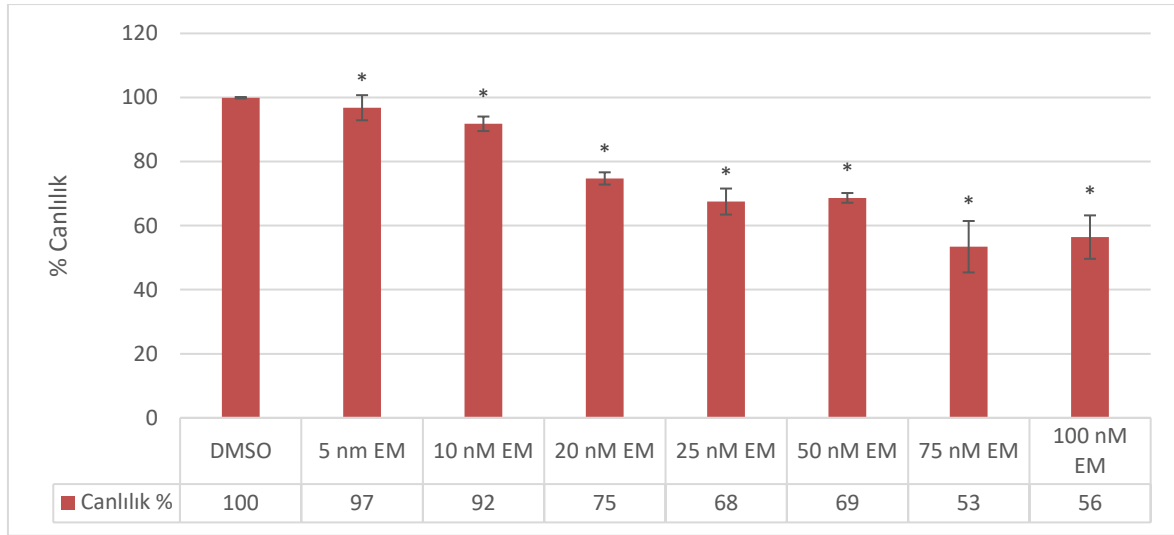
EF24, MDA-MB-436 hücrelerine 48 saat değişen konsantrasyonlarda uygulandı. Kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, hücre canlılığının konsantrasyona bağlı olarak azaldığı belirlendi. EF24'ün 0.5, 1, 2 µM olduğu konsantrasyonlarda MDA-MB-436 hücrelerindeki canlılığın %44-65 düzeylerinde olduğu görüldü. Hücre canlılığının, 4, 8, 16 ve 32 µM konsantrasyonlarda ise %36-38 düzeylerinde olduğu belirlendi. MDA-MB-436 hücrelerine EF24 48 saat uygulandığında; 1µM ($p < 0,001$), 2 µM ($p < 0,001$), 4 µM ($p < 0,001$), 8 µM ($p < 0,001$) 16 µM ($p < 0,001$) ve 32 µM ($p < 0,001$) konsantrasyonlarda hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. MDA-MB-436 hücrelerine EF24'ün 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. *DMSO (Kontrol) grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri $p < 0.05$

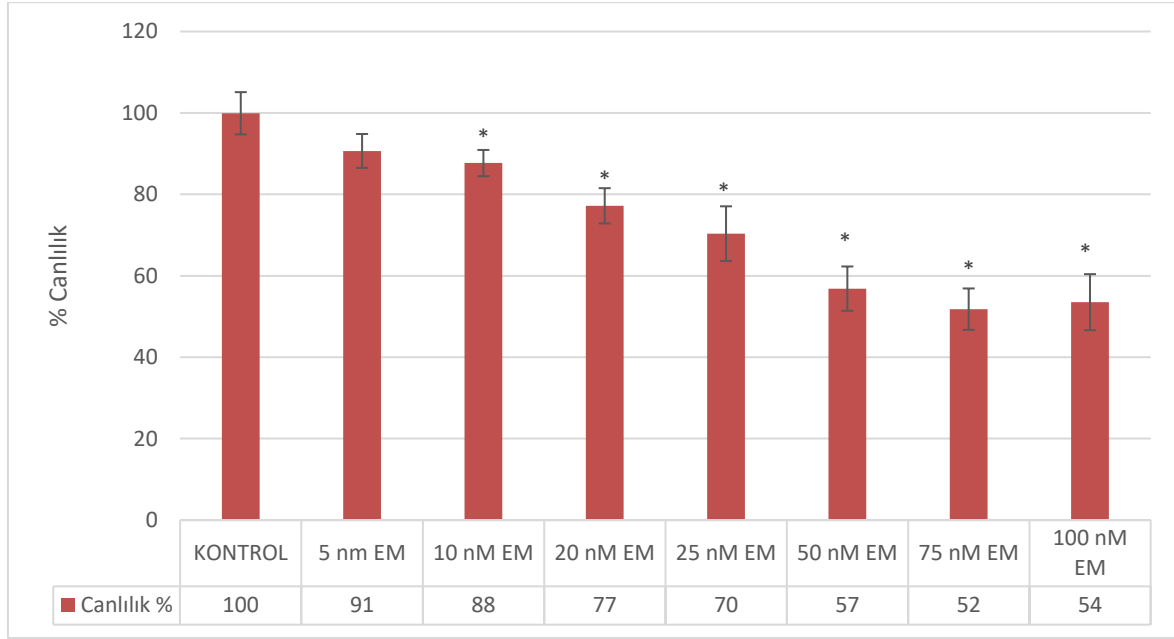
4.1.5. Eribulin Mesilat'ın hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-436 hücrelerinde belirlenmesi

EM, MDA-MB-436 hücrelerine 24 saat değişen konsantrasyonlarda uygulandı. Yapılan değerlendirmede, hücre canlılığının EM'nin artan konsantrasyona bağlı olarak azaldığı belirlendi. Hücre canlılığının, 5-10 nM konsantrasyonda %97-92, 20-100 nM konsantrasyonda ise, %75-56 aralığında değiştiği belirlendi. MDA-MB-436 hücrelerine EM 24 saat uygulandığında 10 nM ($p=0,020$), 20 nM ($p=0,023$), 25 nM ($p=0,037$), 50 nM ($p=0,012$), 75 nM ($p=0,041$) ve 100 nM ($p=0,039$) hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. MDA-MB-436 hücrelerine Eribulin Mesilat'ın 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. *DMSO (Kontrol) grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri $p < 0.05$

EM, MDA-MB-436 hücrelerine 48 saat değişen konsantrasyonlarda uygulandı. Yapılan değerlendirmede, hücre canlılığının EM'nin artan konsantrasyona bağlı olarak azaldığı belirlendi. Hücre canlılığının, 5-10 nM konsantrasyonda %91-88, 20-100 nM konsantrasyonda ise, %77-52 aralığında değiştiği belirlendi. MDA-MB-436 hücrelerine EM 48 saat uygulandığında 10 nM ($p=0,015$) ve 20 nM, 25 nM, 50 nM, 75 nM ve 100 nM ($p<0,001$) hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.10).

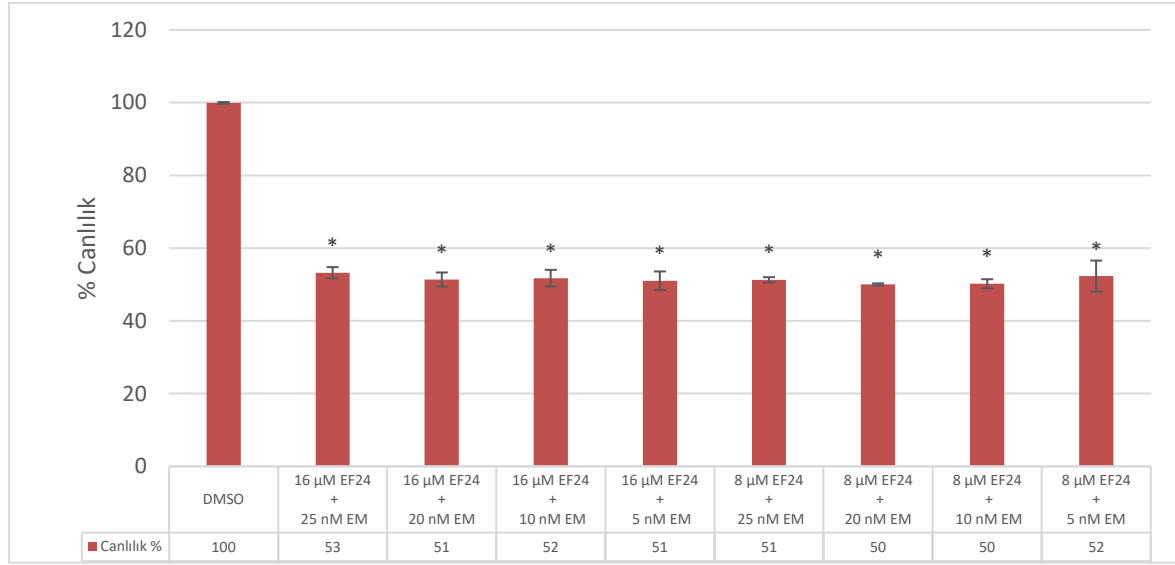


Şekil 4.10. MDA-MB-436 hücrelerine Eribulin Mesilat'ın 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları
*DMSO (Kontrol) grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri $p < 0.05$

4.1.6. EF24 ve Eribulin Mesilat'ın birlikte uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-436 hücrelerinde belirlenmesi

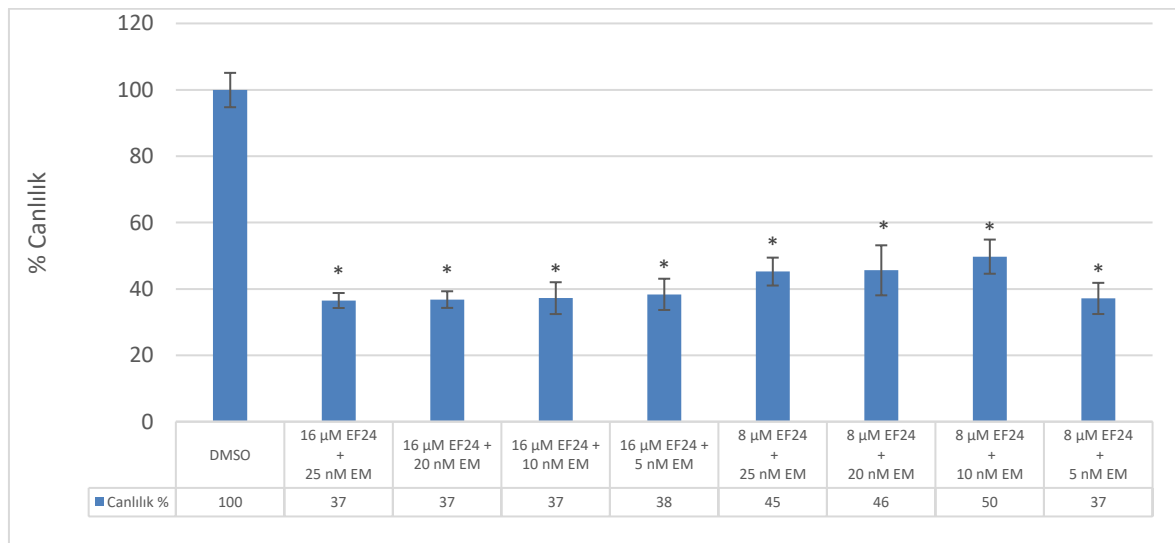
MDA-MB-436 hücrelerine tek başına uygulanan ajanların sonuçları değerlendirildikten sonra, EF24'ün 8 ve 16 μM konsantrasyonları birlikte uygulama deneyleri için seçildi. EF24'ün bu konsantrasyonları sabit uygulanıp, değişen düşük EM konsantrasyonlarındaki (5-25 nM) hücre canlılığı oranları 24 ve 48 saat sonunda değerlendirildi.

16 μM sabit EF24 konsantrasyonu ile EM'nin değişen konsantrasyonları (5-25 nM) 24 saat süresince MDA-MB-436 hücrelerine birlikte uygulandığında, hücre canlılık oranlarının, her ajanın tekli uygulaması ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak değişmediği gözlemlendi. Benzer şekilde, 8 μM sabit EF24 konsantrasyonu ile değişen EM konsantrasyonları birlikte uygulandığında, EM konsantrasyonları azaldıkça, hücre canlılık oranlarının, her ajanın tekli uygulaması ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak değişmediği gözlemlendi. 16 μM EF24+25 nM EM, 16 μM EF24+20 nM EM, 16 μM EF24+10 nM EM, 16 μM EF24 5 nM EM, 8 μM EF24+25 nM EM, 8 μM EF24+20 nM EM ve 8 μM EF24+5 nM EM ($p < 0,001$) ve 8 μM EF24+10 nM EM ($p = 0,003$) konsantrasyonlarında hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. MDA-MB-436 hücrelerine EF24 ve Eribulin Mesilat'ın 24 saat süresince birlikte farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları
*DMSO (Kontrol) grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri $p < 0.05$

16 µM ve 8 µM sabit EF24 konsantrasyonu ile EM'nin değişen konsantrasyonları (5-25 nM) 48 saat süresince MDA-MB-436 hücrelerine birlikte uygulandığında, hücre canlılık oranlarının, EM'nin artan konsantrasyonlarında anlamlı olarak değişmediği gözlemlendi. 16 µM EF24+25 nM EM, 16 µM EF24+20 nM EM, 16 µM EF24+10 nM EM, 16 µM EF24+5 nM EM, 8 µM EF24+25 nM EM, 8 µM EF24+20 nM EM, 8 µM EF24+10 nM EM ve 8 µM EF24+5 nM EM ($p < 0.001$) konsantrasyonlarında hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. MDA-MB-436 hücrelerine EF24 ve Eribulin Mesilat'ın 48 saat süresince birlikte farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları
*DMSO (Kontrol) grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri $p < 0.05$

4.1.7. EF24 ve Eribulin Mesilat'ın tekli veya birlikte uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 hücrelerinde belirlenmesi

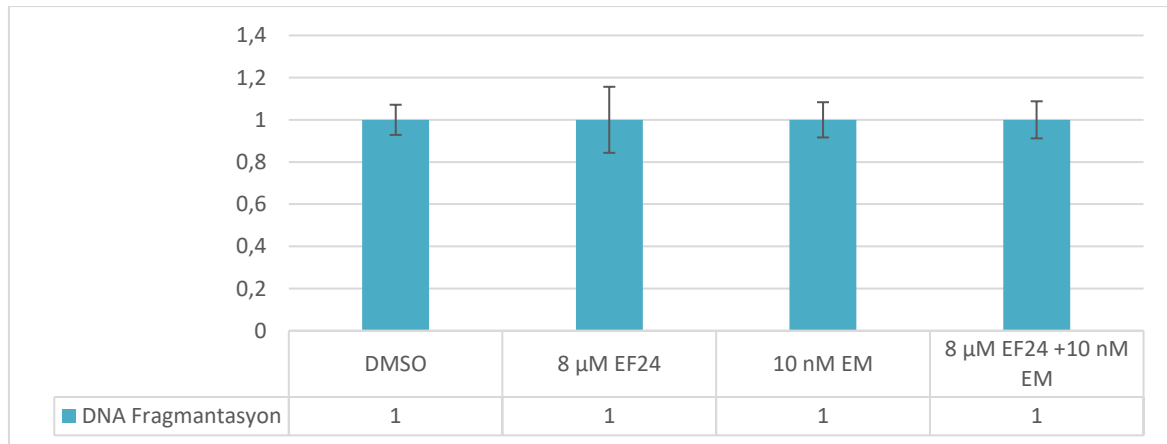
MDA-MB- 231 hücre hattında 24 saat süresince Eribulin Mesilat'ın 10 nM konsantrasyonda tek başına uygulanmasında hücre canlılık oranı %89 iken bu canlılık oranı EF24'ün 8 μ M konsantrasyonu ile birlikte uygulandığında %47'ye düşmüştür ($p=0,001$).

MDA-MB- 436 hücre hattında 24 saat süresince Eribulin Mesilat'ın 10 nM konsantrasyonda tek başına uygulanmasında hücre canlılık oranı %92 iken bu canlılık oranı EF24'ün 8 μ M konsantrasyonu ile birlikte uygulandığında %50'ye düşmüştür ($p<0,001$).

4.2. EF24 ve EM'nin Tekli veya Birlikte Uygulanmasının DNA Fragmentasyon Oranlarına Etkisinin Belirlenmesi

Seçilen konsantrasyonlara bağlı olarak hücrelerde görülen DNA fragmentasyon oranları belirlendi. MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 hücrelerine, 8 μ M EF24, 10 nM EM'nin tek başlarına ve 24 saat süresince birlikte uygulanmasının DNA fragmentasyonlarına olan etkileri incelendi.

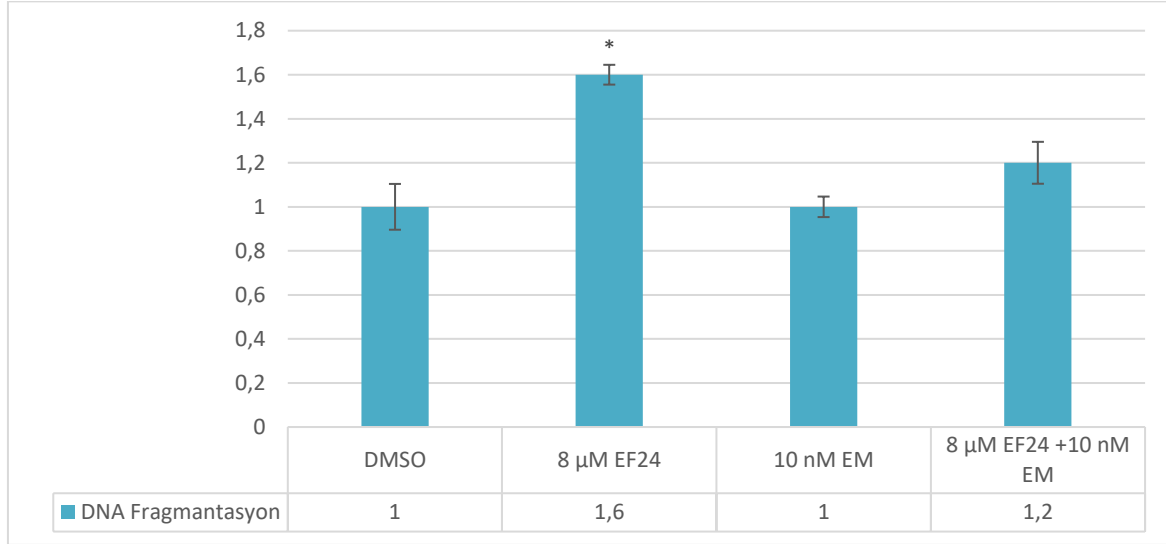
Kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, MDA-MB-231 hücrelerinde DNA fragmentasyonunda bir farklılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. MDA-MB-213 hücre hattında EF24 ve Eribulin Mesilatın tek başlarına veya birlikte uygulanmasının sonucundaki DNA fragmentasyon oranları

Kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, MDA-MB-436 hücrelerinde 8 μ M EF24'ün 1,6 kat ($p=0,002$) ve 8 μ M EF24+10 nM EM'nin ise DNA fragmentasyonunu 1,2 kat artırdığı

gözlendi. 10 nM EM'nin ise DNA fragmentasyonda belirgin bir artışa neden olmadığı belirlendi (Şekil 4.14).

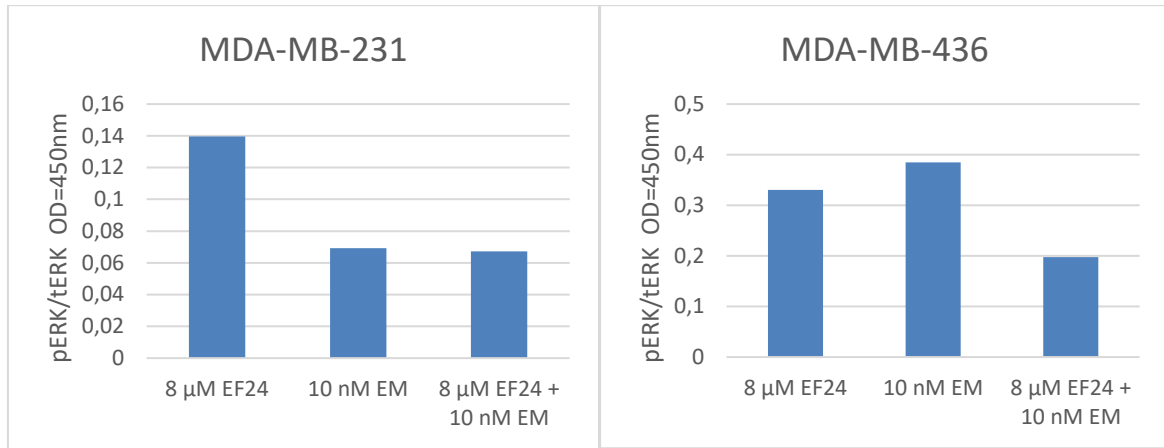


Şekil 4.14. MDA-MB-436 hücre hattında EF24 ve Eribulin Mesilatın tek başlarına veya birlikte uygulanmasının sonucundaki DNA fragmentasyon oranları *DMSO (Kontrol) grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri $p < 0.05$

4.3. EF24 ve EM'nin Tekli veya Birlikte Uygulanmasının MAPK Sağ Kalım Yolağında Görevli Protein Düzeylerine Etkisinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

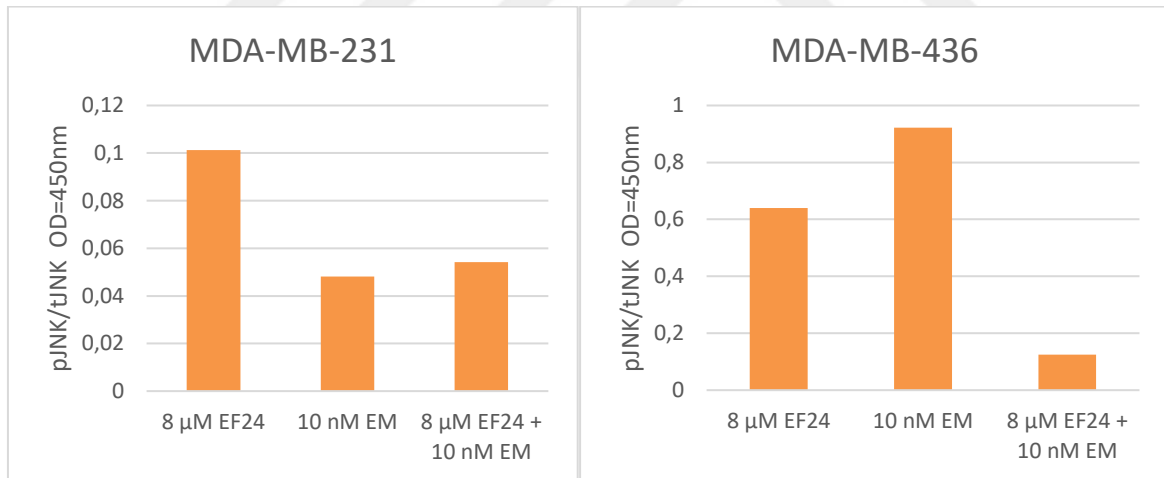
MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 hücrelerine 8µM EF24 ve 10 nM Eribulin Mesilat'ın (EM) 24 saat süre ile tek başlarına ve birlikte uygulanmasının MAPK sağ kalım yolağına olan etkisi değerlendirildi. MAPK yolağında görevli ERK 1/2/JNK/P38 protein ve fosforile protein düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlendi.

MDA-MB-231 hücre hattında p-ERK 1/2/tERK 1/2 oranının 10 nM EM uygulaması ile karşılaştırıldığında, 8 µM EF24'te arttığı, 8 µM EF24+10 nM EM birlikte uygulamasında ise değişmediği gözlendi. MDA-MB-436 hücre hattında ise 10 nM EM (%38,4) ile karşılaştırıldığında, 8µM EF24 ve 8µM EF24+10 nM EM birlikte uygulamasının p-ERK 1/2/tERK 1/2 oranında azalmaya neden olduğu tespit edildi (Şekil 4.15).



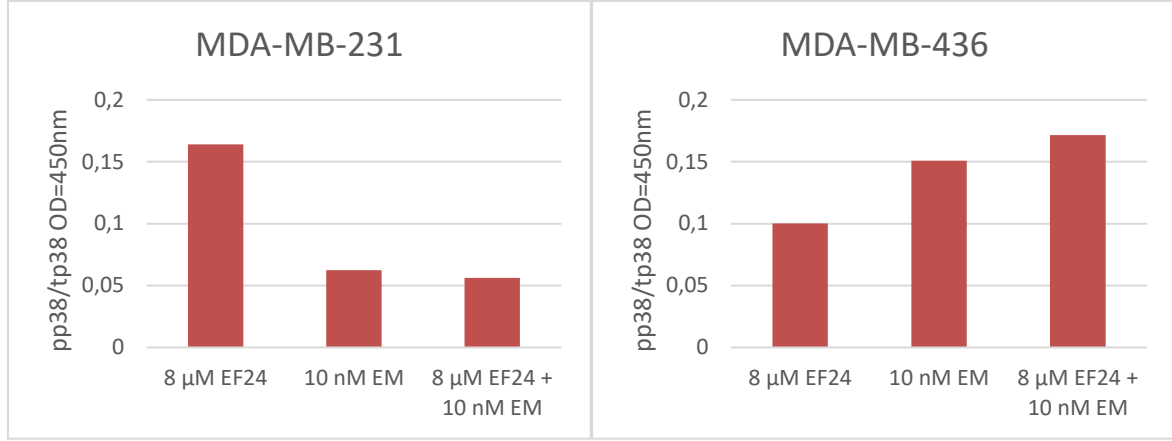
Şekil 4.15. MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 hücre hattında EF24 ve Eribulin Mesilatın tek başlarına veya birlikte uygulanmasının sonucundaki pERK 1/2/tERK 1/2 oranı

MDA-MB-231 hücre hattında 10 nM EM uygulaması ile karşılaştırıldığında, p-JNK/tJNK oranının 8 µM EF24 ve 8 µM EF24+10 nM EM birlikte uygulamasında arttığı gözlemlendi. MDA-MB-436 hücre hattında ise 10 nM EM ile karşılaştırıldığında, 8µM EF24 ve 8µM EF24+10 nM EM birlikte uygulamasının azalmaya neden olduğu tespit edildi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 hücre hattında EF24 ve Eribulin Mesilatın tek başlarına veya birlikte uygulanmasının sonucundaki pJNK/tJNK oranı

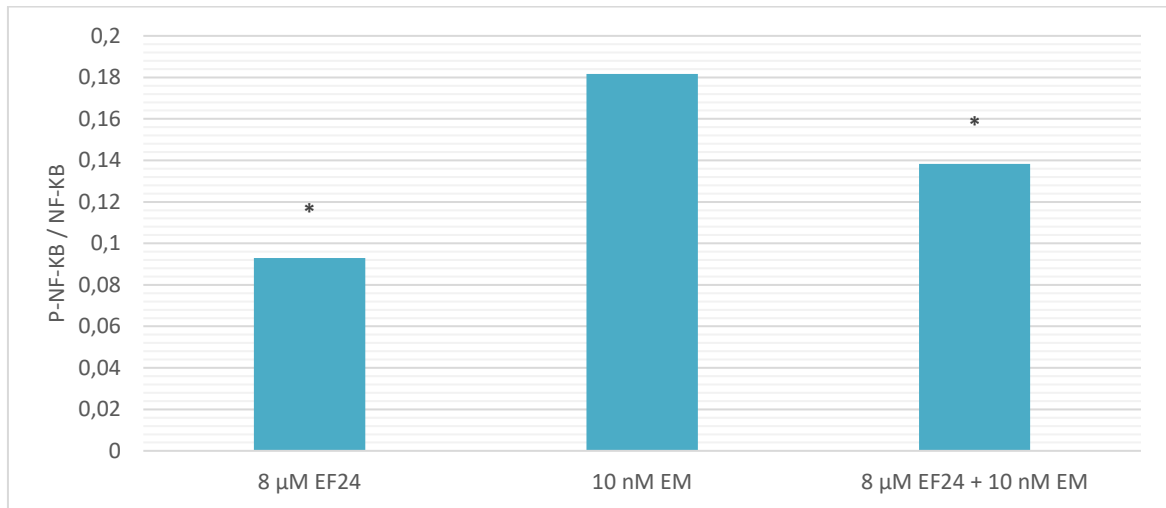
MDA-MB-231 hücre hattında 10 nM EM uygulaması ile karşılaştırıldığında, p-p38/tp38 oranının 8 µM EF24'de arttığı, 8 µM EF24+10 nM EM birlikte uygulamasında ise aynı kaldığı gözlemlendi. MDA-MB-436 hücre hattında ise 10 nM EM ile karşılaştırıldığında, 8µM EF24'de azaldığı, 8µM EF24+10 nM EM birlikte uygulamasının ise artmaya neden olduğu tespit edildi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 hücre hattında EF24 ve Eribulin Mesilatın tek başlarına veya birlikte uygulanmasının sonucundaki pp38/tp38 oranı

4.4. EF24 ve EM'nin Tekli veya Birlikte Uygulanmasının NF-κB Üzerine Olan Etkisinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

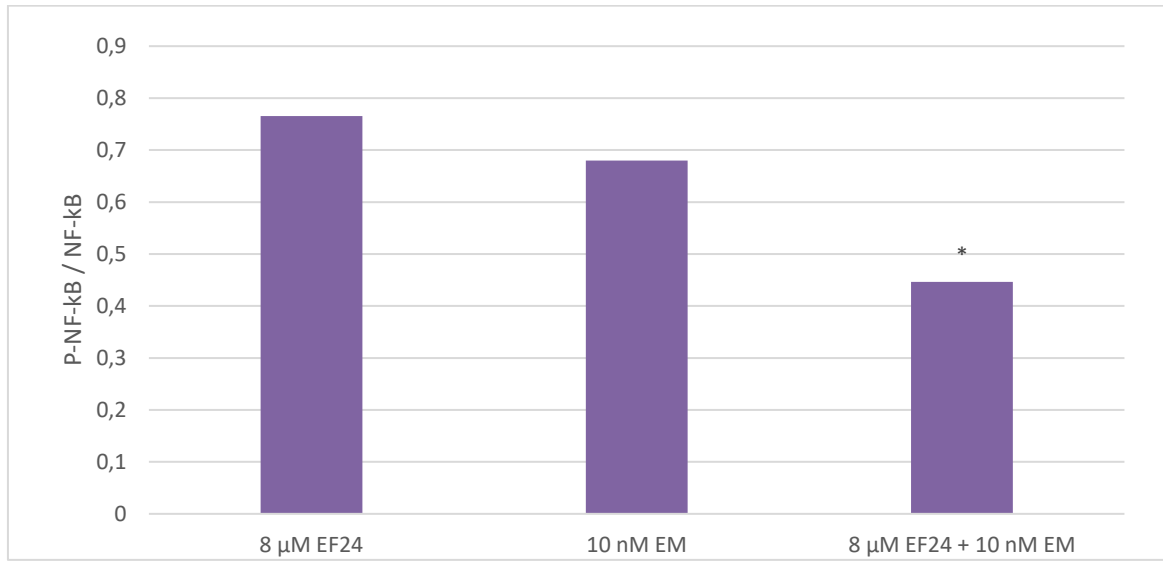
MDA-MB-231 hücrelerine 8µM EF24 ve 10 nM eribulin mesilat'ın (EM) 24 h süre ile tek başlarına ve birlikte uygulanmasının NF-κB üzerine olan etkisi ELISA yöntemiyle değerlendirildi. p-NF-κB p65 protein düzeyi 8µM EF24 uygulaması sonucu % 9,3; 10 nM EM % 18,17; 8µM EF24 ve 10 nM EM uygulaması sonucu ise % 13,84 olduğu belirlendi. İstatistiksel olarak Eribulin Mesilat'ın tekli uygulamasına göre EF24'ün tekli ($p < 0,001$) ve EM ile birlikte ($p = 0,003$) uygulamasındaki p-NF-κB p65 düzeyindeki anlamlı bulundu (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. MDA-MB-231 hücrelerine 8 µM EF24 ve 10 nM EM'nin 24 saat süresince tek başlarına ve birlikte uygulanması sonucu belirlenen p-NF-κB/ NF-κB oranları.

*Eribulin Mesilat ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri $p < 0,05$

MDA-MB-436 hücrelerine 8µM EF24 ve 10 nM eribulin mesilat'ın (EM) 24 h süre ile tek başlarına ve birlikte uygulanmasının NF-κB üzerine olan etkisi ELISA yöntemiyle değerlendirildi. p-NF-κB p65 protein düzeyi 8µM EF24 uygulaması sonucu % 77,02; 10 nM EM % 67,9; 8µM EF24 ve 10 nM EM'nin birlikte uygulaması sonucu ise % 44,89 olduğu belirlendi. İstatistiksel olarak Eribulin Mesilat'ın tekli uygulamasına göre EF24 ile birlikte uygulamasındaki ($p<0,001$) p-NF-κB p65 düzeyindeki azalma anlamlı bulundu (Şekil 4.19).

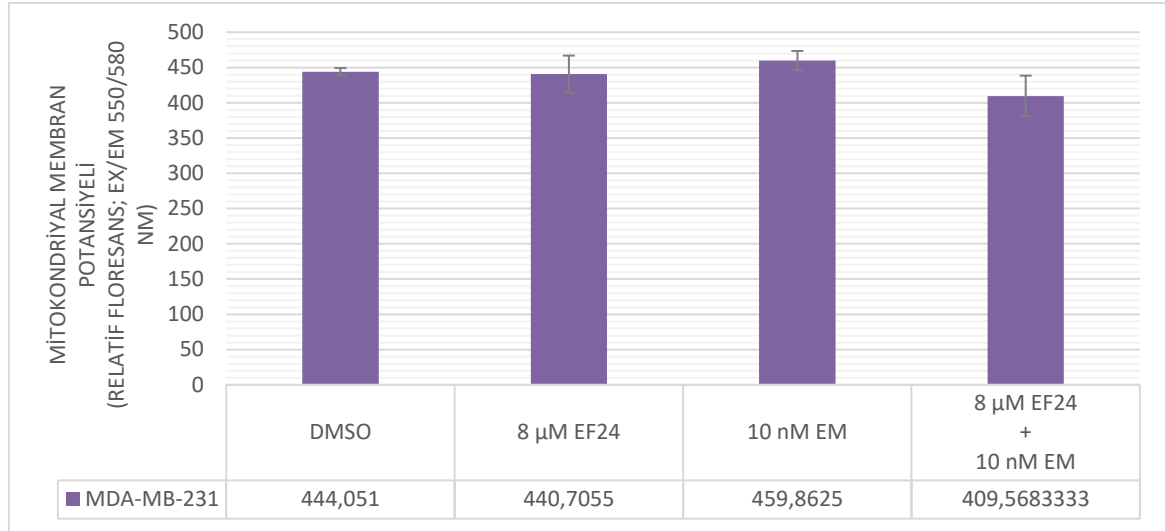


Şekil 4.19. MDA-MB-436 hücrelerine 8 µM EF24 ve 10 nM EM'nin 24 saat süresince tek başlarına ve birlikte uygulanması sonucu belirlenen p-NF-κB/ NF-κB oranları.
*Eribulin Mesilat ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri $p < 0.05$

4.5. EF24 ve EM'nin Tekli veya Birlikte Uygulanmasının Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerine Olan Etkisinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

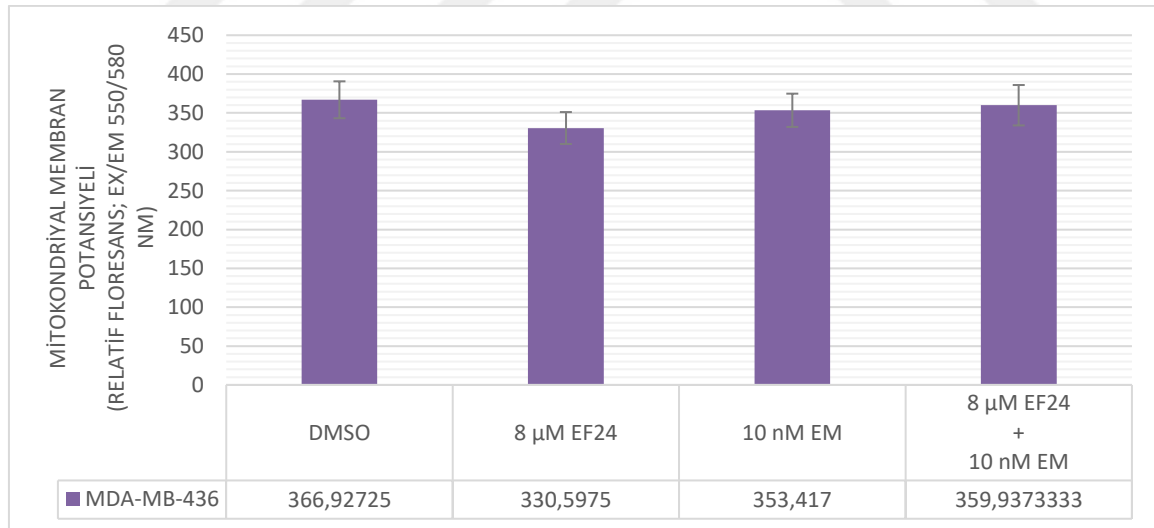
Seçilen konsantrasyonlara bağlı olarak hücrelerdeki mitokondriyal membran potansiyel değişimleri belirlendi.

DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MDA-MB16 231 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelindeki en fazla azalma 8 µM EF24+10 nM EM'nin birlikte uygulanması sonucu elde edildi ($p=0,171$) (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. MDA-MB-231 hücrelerine 8 µM EF24 ve 10 nM EM'nin 24 saat süresince tek başlarına ve birlikte uygulanmasının mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi

DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MDA-MB-436 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelindeki en fazla azalma 8 µM EF24 uygulanması sonucu elde edildi ($p=0,060$) (Şekil 4.21).

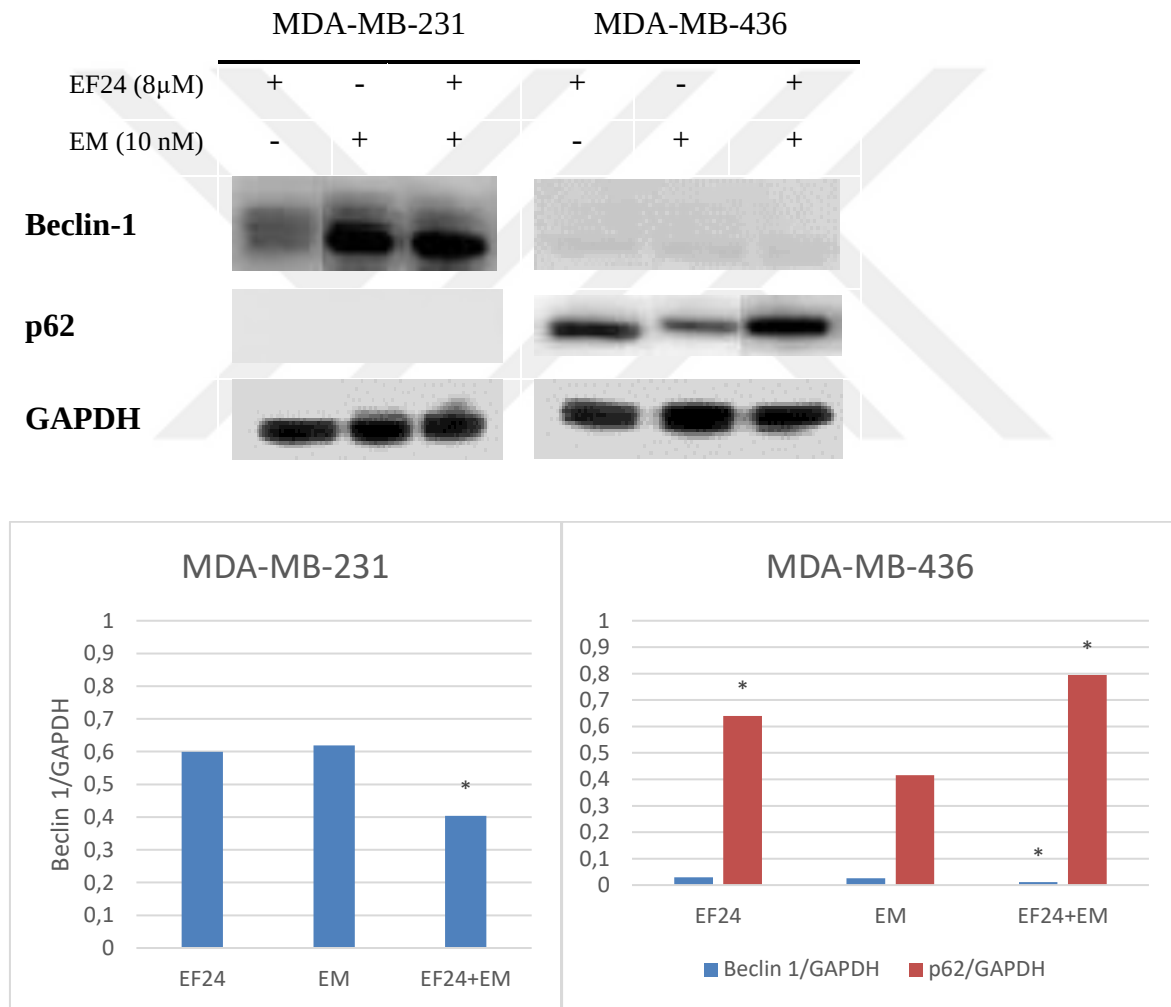


Şekil 4. 21. MDA-MB-436 hücrelerine 8 µM EF24 ve 10 nM EM'nin 24 saat süresince tek başlarına ve birlikte uygulanmasının mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi

4.5. EF24 ve EM'nin Tekli veya Birlikte Uygulanmasının Beclin-1 ve p62 Üzerine Olan Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi

EF24 ve Eribulin Mesilatın seçilen konsantrasyonlarda MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 hücre hatlarında Beclin-1 ve p62 proteinlerine olan etkisi western blot yöntemi ile belirlendi.

Yapılan analizlerde MDA-MB-231 hücrelerinde Eribulin Mesilatın tekli uygulamasına göre; EF24 ile birlikte uygulanmasında beclin-1 protein miktarının daha az olduğu gözlenirken ($p=0,025$), seçilen konsantrasyonlarda p62 proteinine rastlanmadı. MDA-MB-436 hücre hattında ise uygulanan tüm konsantrasyonlarda beclin-1 ve p62 proteinleri bulunduğu; en az beclin 1 protein miktarının Eribulin Mesilat ve EF24'ün birlikte uygulanmasında ($p=0,005$) olduğunu gözlemlendi. EF24'ün tekli ve Eribulin Mesilat ile birlikte uygulamasında p62 protein miktarının arttığı analiz edildi (sırasıyla $p=0,021$ ve $p=0,004$). Bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



Şekil 4. 22. EF24 ve Eribulin Mesilatın tekli veya birlikte uygulanmasının MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 hücre hatlarında Beclin-1 ve p62 proteinlerine etkisi* Eribulin Mesilat ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri $p < 0.05$



5. TARTIŞMA

Doğal bitkilerden elde edilen fitokimyasallar güçlü biyoaktiviteleri, düşük toksisiteleri ve daha az yan etki göstermeleri nedeniyle kansere karşı tedavilerde yardımcı bir ajan olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmada *Curcumin longa* bitkisinden elde edilen kurkuminin biyoyayarılanımı en yüksek analoglarından biri olan EF24'ün Triple negatif meme kanseri hücre hatlarında *in vitro* olarak hücre canlılığını düşürdüğünü, MDA-MB-436 hücre hattında DNA fragmentasyon oranını arttırdığını, fosforile p65/NF-κB seviyesini düşürdüğünü ve mitokondriyal membran potansiyelinde azalmaya neden olduğunu tespit edildi.

Daha önce yapılan çalışmalarda EF24'ün küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (0,5-16μM EF24), kemoterapiye dirençli AML (0,125-4μM EF24), malign melanoma, kolanjiokarsinom (0,5-8μM EF24), gastrik kanser (0,625-10μM EF24), kolorektal kanser (2,5-15μM EF24), oral skuamoz hücreli karsinoma, ovaryum kanseri, pankreas kanseri (0,5-60μM EF24), plevral mezotelyoma (0,5-30μM EF24), renal kanser (3-48μM EF24) hücre hatlarında ve adenokortikal tümörlerde (0,0625-20μM EF24) konsantrasyona bağlı hücre canlılığında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Bertazza ve diğerleri, 2019; Onen ve diğerleri, 2015; Hsiao ve diğerleri, 2020; Ibáñez Gaspar ve diğerleri, 2021; Chang ve diğerleri, 2021; Zou ve diğerleri, 2016; Yin ve diğerleri, 2016; He ve diğerleri, 2016; Yar Sağlam ve diğerleri, 2016). Duan ve diğerlerinin 2022 yılında TNMK hücre hatlarında yaptıkları bir çalışmada, 0,5-8μM EF24'ün MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca bölümümüzde MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada >2 μM EF24 konsantrasyonlarında hücre canlılığı anlamlı derecede azalmıştır (Alp ve diğerleri, 2017). Yapılan bu tez çalışmasında da literatüre uygun olarak EF24'ün konsantrasyona bağımlı olarak TNMK hücre hatlarında hücre canlılığını azalttığı bulundu. Ayrıca BRCA1 mutant hücre hattı olan MDA-MB-436 hücre hattının EF24'e daha duyarlı olduğunu analiz edildi.

Tümör baskılayıcı genlerden biri olan BRCA1, DNA çift zincir kırıklarının tamirinde kritik bir rol oynamaktadır. Bu nedenle BRCA1 mutasyonu taşıyan hücrelerde kromozom translokasyonları ve genomik instabilite riski artmaktadır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki BRCA1 mutasyonu taşıyan kanser hücreleri taksanlara karşı dirençli iken DNA'ya hasar

veren ajanlara karşı duyarlıdır. Rowe ve diğerlerinin 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada BRCA1 mutant TNMK (HCC1937) hücrelerinin kurkumin muamelesi sonucu önemli ölçüde apoptoza uğradığı ve kalıtsal olarak taşınan BRCA1 mutasyonunun kurkumin tedavisinden fayda sağlayabileceğini belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da BRCA1 mutant hücre hattı olan MDA-MB-436 hücre hattının kurkumininin biyoyararlanımı yüksek analoglarından biri olan EF24'e daha duyarlı olduğunu analiz edildi.

Eribulin mesilat meme kanseri ve liposarkom tedavisinde onay almış kemoterapik bir ajandır. Meme kanseri, histiyositik lenfoma, faringeal skuamöz hücreli karsinom, prostat kanseri, ovaryum kanseri, kolon kanseri, uterus sarkomu, melanoma, küçük hücreli olan ve olamayan akciğer kanseri ve promiyelositik lösemi kanser hücre hatlarında hücre büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (Swami ve diğerleri, 2015). Bu ajan ile TNMK olan ve olmayan hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada; Eribulin mesilatın her iki grup hücre hattında da hücre canlılığını azalttığı bulunmuştur. Ayrıca eribulinin antiproliferatif etkisinin meme kanseri hücresinin TNMK tipinde olup olmamasına göre farklılık göstermediği tespit edilmiştir (Bräutigam ve diğerleri, 2016). Rao ve arkadaşlarının 2017 ve Ko ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptıkları çalışmalarda Eribulin Mesilat'ın MDA-MB-231 hücre hattında konsantrasyona bağlı hücre canlılığını azalttığını bulmuşlardır (Rao ve diğerleri, 2014; Ko ve diğerleri, 2022). Terashima ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise TNMK hücre hatları olan MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT-549, ve MX-1 hücre hatlarında eribulinin konsantrasyon bağımlı hücre canlılığını azalttığı analiz edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalara benzer olarak bu çalışmada da Eribulin Mesilatın TNMK hücre hatlarında hücre canlılığında azalmaya neden olduğu gösterildi.

Mikrotübülleri hedef alan kemoterapötik ajanların meme kanseri hücre hatlarındaki etkisini inceleyen bir çalışmada TNMK hücre hatları olan BT-549 (BRCA1 yabancıl) ve HCC1937 (BRCA mutant)'nin Eribulin Mesilat'ın da içinde bulunduğu bu ajanlara daha dirençli olduğu gösterilmiştir (Risinger ve diğerleri, 2015). Bu çalışmada literatürden farklı olarak BRCA1 mutant hücre hattı olan MDA-MB-436 Eribulin Mesilat'a daha duyarlı olduğu görüldü. Bu durum BRCA1 mutant bu iki hücre hattının duyarlılık farklılığının, BRCA1 mutasyon durumları dışında farklı yolaklardaki değişikliklerinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde Eribulin Mesilat ile uyarılan hücre ölümünde EF24'ün farklı konsantrasyonlarının etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat bir NF- κ B inhibitörü olan Bay-117082 ile MDA-MB-231 hücre hattında yapılan bir çalışmada Eribulin Mesilatın tek başına kullanımına göre Bay-117082 ile birlikte kullanımının hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde bu çalışmada da her iki hücre grubunda Eribulin Mesilatın tekli uygulamasına göre EF24 ile birlikte uygulanmasının hücre canlılığını anlamlı derecede düşürdüğünü analiz edildi.

NF- κ B hücrelerin kanserleşmesinin başlamasında, gelişmesinde, metastazında ve ilaçlara direnç geliştirme mekanizmasında önemli rol almaktadır. Birçok kanser hücresi tümör hücre proliferasyonunu destekleyen, anjiogenezi artıran, apoptozu baskılayan, epitelyal mezankimal geçişi hızlandıran ve uzak organ metastazına katkıda bulan NF- κ B aktivitesi gösterir (Yang ve diğerleri, 2021). Teng ve arkadaşları 2021 yılında yayınlanan çalışmalarında meme kanseri hücre hatlarında eribuline olan direncin artmasının NF- κ B yolağından kaynaklanabileceğini bulmuşlardır. MDA-MB-231 hücre hattında bir NF- κ B baskılayıcı molekül olan Bay-117082 (IKK inhibitörü) uygulamasının NF- κ B ilişkili proteinlerin ifadesini baskıladığını ve eribulin ile birlikte bu molekülün MDA-MB-231 hücre hattında kullanımının eribulinin tek başına kullanımına göre hücre sitotoksitesini arttırdığını göstermişlerdir. Yaptıkları *in vivo* çalışmada da eribulinin NF- κ B inhibisyon terapisiyle birlikte kullanımının eribulinin etkinliğini arttırabileceğini bulmuşlardır (Teng ve diğerleri, 2021). Bu çalışmada da benzer olarak her iki hücre hattında da Eribulin Mesilatın tek başına kullanımına göre bir NF- κ B inhibitörü olan EF24 ile birlikte kullanımının hücrede fosforile NF- κ B düzeyini azalttığı bulundu. Ajanların birlikte uygulanması ile elde edilen sonuç, MDA-MB-436 hücrelerinde NF- κ B yolağının daha fazla baskılanmış olabileceğini düşündürdü.

Programlı hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz özellikle embriyogenez sırasında vücudun normal gelişiminin bir parçasıdır. Vücuttaki hasar görmüş (örn: yaşlanmış, hücre döngüsü bozulmuş veya DNA hasarı oluşmuş) hücreler apoptoz aracılığı ile ortadan kaldırılır. Apoptoz sırasında hücrede çeşitli morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Bunlar; çekirdek yoğunlaşması, fragmentasyon, plazma membranında kesecikler oluşumu ve apoptotik cisimciklerin oluşumudur. Normal apoptotik yolların bozulması hasarlı hücrelerin yaşamasına ve hücrelerin kanserleşmesine neden olabilmektedir. Kemoterapide

kullanılan sitotoksik ilaçlar kanser hücrelerinde apoptozu uyarıp onların ölümünü sağlayabilmektedir (Das ve diğerleri, 2021).

Hücrelerde apoptozu gösteren birçok parametre bulunmaktadır. Mitokondriyal membran potansiyelinde azalma ve DNA fragmentasyon oranında artma bunlardandır (Gottlieb, 2003). Bräutigam ve diğerlerinin 2016 yılında TNMK hücre hatları üzerinde yaptıkları bir çalışmada Eribulin Mesilat'ın hücredeki apoptozu uyardığını göstermişlerdir. Sasaki ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptıkları çalışmada ise Eribulin Mesilat'ın MDA-MB- 231 hücre hattında apoptozu uyarırken MDA-MB-436 hücre hattında apoptozu uyarmadığını bulmuşlardır. Yapılan bu çalışmada literatürden farklı olarak her iki hücre hattında da Eribulin Mesilat DNA fragmentasyon oranında bir değişiklik oluşturmadi. MDA-MB-231 hücre hattında mitokondriyel membran potansiyeli artarken MDA-MB-436 hücre hattında hafif bir düşme oldu.

Adams ve diğerlerinin 2005 yılında yaptıkları çalışmada EF24'ün MDA-MB-231 hücre hattında mitokondriyal membran potansiyelinde azalmaya neden olduğunu saptamışlardır. Benzer olarak yapılan bu çalışmada da kullanılan her iki hücre hattında EF24'ün mitokondriyel membran potansiyelinde azalmaya neden olduğunu fakat en fazla düşmenin MDA-MB-436 hücre hattında olduğunu görüldü. Ayrıca bu hücre hattında EF24'ün tekli uygulanmasının DNA fragmentasyon oranını 1,6 kat artırdığını bulundu. Buna ilaveten MDA-MB-231 hücre hattına EF24 ve Eribulin Mesilatın birlikte uygulanması mitokondriyal membran potansiyelinde azalmaya neden oldu. Bu bilgiler ışığında EF24'ün MDA-MB-436 hücre hattında tekli veya Eribulin Mesilatla birlikte kullanımının apoptozu uyardığı sonucuna varmamızı sağladı.

Mitojenle aktive edilen protein kinaz (Mitogen-activated protein kinase-MAPK) sinyal yolağı hücre bölünmesi, proliferasyonu, hayatta kalması ve farklılaşması ile ilişkili bir yoldur. Bu yolda görev alan MAPK'lar hücreye bir uyarı geldiğinde fosforile olarak aktive olan ve çekirdeğe girerek transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını sağlayan serin ve treonin protein kinazlardır. Bu ailede en az üç tip protein kinaz bulunmaktadır: ERK 1/2, JNK ve p38. ERK 1/2 hücrede hücre büyümesi ve proliferasyonu ile ilgili süreçleri uyarırken JNK ve p38 hücre stresine yanıt olarak inflamasyon, hücre büyümesi, hücre farklılaşması ve apoptozla ilişkilendirilmiştir. (Farghadani ve Naidu, 2021).

MAPK sinyal iletim yolağının, TNMK'nın gelişiminde önemli bir rolü vardır. MAPK yolağındaki sinyal değişiklikleri meme kanserinin gelişmesinde ve ilerlemesinde rol oynar. Triple negatif meme kanserinde MAP kinazlar invazyon, metastaz, kemoterapötiklere direnç ve kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Ayrıca MAPK sinyal yolakları hücre tiplerine ve uyaranlara bağlı olarak hücre ölümüne de aracılık edebilmektedir (Farghadani ve Naidu, 2021; Jiang ve diğerleri, 2020). MAPK aktivitesindeki artış TNMK'li hastalarda daha kısa hayatta kalma süresi ile ilişkili bulunmuştur (Gholami ve diğerleri, 2014). Bu nedenle MAPK yolaklarının bileşenleri, meme kanseri tedavisi için yapılan çalışmalarda araştırma konusu olmuştur.

MDA-MB-231 hücre hattında kurkuminin MAPK yolağı üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada kurkuminin ERK 1/2 ve p38 fosforilasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Mo ve diğerleri, 2012). Benzer olarak Sun ve diğerlerinin 2012 yılında yaptıkları çalışmada MDA-MB-231 hücre hattında kurkuminin ERK 1/2 fosforilasyonunun baskıladığı bulunmuştur. Fakat Wang ve diğerleri 2016 yılında MDA-MB-231 hücre hattında yaptıkları çalışmada kurkuminin ERK 1/2 ve JNK fosforilasyon düzeyini arttırdığı sonucuna varmışlardır. Aynı çalışmada hücre hattındaki ERK 1/2 aktivasyonunun hücreleri apoptoza götürdüğünü ve JNK aktivasyonunun otofajik hücre ölümü ile sonuçlandığını göstermişlerdir. Hücre proliferasyonunu indükleyen ERK 1/2 yolağının hücre ve uyaran tipine göre apoptotik hücre ölümünü desteleyebileceği sonucuna varmışlardır.

Hsiao ve diğerlerinin 2020 yılında yayınlanan çalışmalarında EF24'ün AML hücre hatlarında p38 aktivasyonunu uyardığı, ERK 1/2 aktivitesinde azalmaya neden olduğunu ve hücreleri apoptoza götürtüğünü analiz etmişlerdir. Lee ve diğerlerinin 2022 yılında yaptıkları bir çalışmada ise servikal kanser hücre hatlarında EF24'ün p38 sinyal yolağının fosforilasyonunu baskıladığını bulmuşlardır. Thomas ve diğerlerinin 2010 yılında EF24'ün akciğer kanseri hücre hatlarına etkisini inceleyen diğer bir çalışmada ise EF24'ün ERK 1/2, JNK ve p38 fosforilasyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Bu çalışmada Eribulin Mesilatın tekli uygulamasına göre EF24 ile birlikte uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattında fosforile ERK 1/2, JNK ve p38 düzeylerinde bir farklılığa neden olmazken, Hsiao ve diğerlerinin 2020 yılında yaptıkları çalışmaya benzer olarak MDA-MB-436 hücre hattında fosforile ERK 1/2 düzeyinde azalmaya, fosforile p38 düzeyinde artmaya neden olduğunu tespit edildi.

Kelime anlamı olarak “kendini yeme” olarak ifade edilen otofaji hücreyi stres durumlarından koruyan bir savunma mekanizmasıdır. Hücrenin programlı bir şekilde ölümüne neden olan apoptoz ile hücrenin zor durumlarda bile yaşamasına olanak sağlayan otofaji, birbiriyle kesişen yolları içeren ve hücrenin kaderini belirleyen temel mekanizmalardır. Katabolik süreçleri içinde barındıran otofaji hücresel bir geri dönüşüm mekanizmasıdır. Hasarlı organeller ve yanlış katlanmış proteinler otofajik yolk sayesinde lizozom aracılığıyla ortadan kaldırılır. Hipoksi ve besin yokluğu gibi stres durumlarında hücre otofajik sistemi devreye sokarak enerji ihtiyacını kendini sindirerek giderir. Bir hücre sağkalım mekanizması olan otofaji çok fazla arttığı durumlarda hücrenin tamamının sindirilerek ölümüne neden olmaktadır. Kanser hücreleri hasarlı protein ve hipoksi varlığında yaşamaya devam edebilmek için otofajik yolları kullanmaktadır. Ayrıca kemoterapik ajanların varlığında sağkalım otofaji sayesinde olabilmektedir (Abd El-Aziz ve diğerleri, 2022; Das ve diğerleri, 2021).

Hücreye bir stres uyarısı geldiğinde ULK-1 proteini aktive olmasıyla otofajik yolk uyarılmaktadır. Aktive ULK-1, Beclin-1 proteininde içinde bulunduğu kompleksi aktive etmekte ve bu kompleks fagosfor oluşumunu başlatmaktadır. Atg5 ve LC3-II’nin fagosfor zarına yerleşmesiyle, hücrede parçalanması gereken proteinleri taşıyan p62 kargosuyla birlikte otofagozom yapısına katılır (Abd El-Aziz ve diğerleri, 2022). p62 otofaji sırasında kendide parçalanmaktadır. Otofaji inhibe olduğunda hücrede p62 birikmekte, indüklendiğinde ise seviyesi azalmaktadır. Bu nedenle otofajik akış sürecinin bir belirteci olarak kullanılabilir (Björkøyve diğerleri, 2009).

Normal hücresel süreçler sırasında Beclin-1 bir anti-apoptotik protein olan Bcl-2’ye bağlı olarak bulunur ve otofaji engellenir. Bcl-2 ayrıca pro-apoptotik proteinler olan Bax ve Bak’a da bağlanarak apoptozu engellemektedir. Hücresel stres durumlarında aktive olan JNK Bcl-2’yi fosforile etmekte ve Beclin-1 serbest kalarak aktive olmaktadır. Bu da otofajiyi başlatmaktadır (Mukhopadhyay, 2014).

Guan ve diğerlerinin 2016 yılında MDA-MB-231 hücre hattında yaptıkları çalışmada kurkuminin bu hücre hattında zamana bağlı p62 ifadesinde azalmaya neden olarak otofajiyi aktive ettiğini bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında da benzer olarak MDA-MB-231 hücre kullanılan tüm konsantrasyonlarda p62 ifadesine rastlanmadı. Tüm veriler birlikte analiz edildiğinde Eribulin Mesilat’ın EF24 ile birlikte kullanılmasında MDA-MB-231 hücre

hattında otofajik yolların aktif olduğu, MDA-MB-436 hücre hattında ise apoptotik yolların uyarılmaya başlandığı sonucuna varıldı.





6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık gözlenen kanser türüdür. Triple negatif meme kanseri ise en agresif meme kanseri alt tiplerinden biridir. Prognozu kötü bir meme kanseri alt tipi olan TNMK'nın ilk beş yılda mortalite oranı yüksektir. Uzak organ metastazı kemik yerine daha çok iç organlara olan bu alt tip, meme kanseri hücrelerinde gözlenen spesifik belirteçlerinin olmamasından dolayı endokrin tedavi veya HER2 tedavisine yanıt vermemekte ve standart bir tedavisi bulunmamaktadır.

Bir halichondrin B'nin analogu olan Eribulin Mesilat (Halaven®) Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) 15 Kasım 2010 yılında antrasiklin ve taksan tedavisi içeren en az 2 kemoterapi rejimi uygulanmış metastatik meme kanserinde kullanılması yönünde onay almıştır. Ayrıca 2016 yılında FDA tarafından liposarkom için 2. kuşak tedavi için onay almıştır. Dinamik bir mikrotübül inhibitörü olan Eribulin Mesilat kanser hücrelerindeki toksik etkisini mikrotübül uzamasını engelleyerek yapmaktadır.

EF24 kurkuminden elde edilen bir fitokimyasaldır. Yapılan çalışmalarda antikanser etkisi gösterilen kurkumininin biyoyararlanımı düşük olması nedeniyle çeşitli analogları üretilmiştir. Bu analoglardan biyoyararlanımı ve etkinliği en yüksek olanlardan biri de EF24'dür. EF24'ün kanser hücreleri üzerindeki anti-tümör etkisi NF- κ B yolağını baskılamakla olmaktadır.

Bu tez çalışmasında kullanılan TNMK hücre hatlarında literatüre uygun olarak EF24 ve Eribulin Mesilatın tekli veya birlikte kullanımının konsantrasyona bağlı hücre canlılığında azalmaya neden olduğunu tespit edildi. Kullanılan hücre hatlarından BRCA1 gen mutasyonu taşıyan MDA-MB-436 hücre hattının EF24'e daha duyarlı olduğunu görüldü. MDA-MB-231 hücre hattında EF24 ve Eribulin Mesilatın tekli veya birlikte kullanımının DNA fragmentasyon oranını değiştirmediği ve mitokondriyal membran potansiyelinde hafif değişiklikler yaptığını analiz edildi. Bu nedenle apoptotik hücre ölüm yolağının bu hücre hattında uyarılmadığı düşünülmüştür. MDA-MB-436 hücre hattında ise EF24'ün tekli ve Eribulin Mesilatla birlikte uygulanmasının DNA fragmentasyon oranını artırdığı ve mitokondriyal membran potansiyelinde hafif düşmelere neden olduğunu görüldü. Bu hücre hattında apoptotik yolağın EF24 kaynaklı uyarıldığı sonucuna varılmıştır.

Hücre sağ kalım yolağında incelediğinde MDA-MB-231 hücre hattında ERK1/2, JNK ve p38 proteinlerinin fosforilasyon düzeylerinin Eribulin Mesilat'ın tekli uygulamasına göre EF24 ile birlikte uygulanmasında bir fark oluşturmadığını tespit edildi. MDA-MB-436 hücre hattında ise Eribulin Mesilatın tekli uygulamasına göre EF24 ile birlikte uygulanmasında ERK 1/2 fosforilasyon düzeyinin azaldığı ve p38 fosforilasyon düzeyinin arttığını analiz edildi. Bu analizlerin sonucunda BRCA1 gen mutasyonu taşıyan MDA-MB-436 hücre hattının MAPK sağ kalım yolağının EF24 uygulamasından etkilendiği görülmüştür.

Otofajik ve apoptotik yollar hücre ölüm ve sağ kalım mekanizmalarında birlikte çalışmaktadır. Yapılan bu çalışmada MDA-MB-231 hücre hattının kullanılan kimyasalların etkisiyle daha çok otofajik yolağa, MDA-MB-436 hücre hattının ise daha çok apoptotik yolağa doğru gittiği düşünülmüştür. Bu yollarda görev alan diğer proteinlerin de çalışıldığı ilerideki çalışmalar kullanılan kimyasalların hücre ölüm ve sağ kalım mekanizmalarına etkisini daha ayrıntılı bir şekilde ortaya koyabilecektir. Bu konuda bu çalışma öncül bir çalışma olma niteliğindedir.

BRCA1 mutant MDA-MB-436 hücre hattı diyetle kolaylıkla eklenebilecek bir fitokimyasal olan EF24'e daha duyarlı görünmektedir. BRCA1 mutasyonu taşıyan diğer meme kanseri hücre hatlarının EF24'e yanıtı inceleyecek gelecekteki çalışmalar bu duyarlılığının BRCA1 mutasyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığını aydınlayabilecektir.

Kullandığımız TNMK hücre hatlarında EF24 Eribulin Mesilatın hücre canlılığı üzerine etkisini artırmaktadır. Gelecekte yapılacak prelinik *in vivo* çalışmalar sonucunda bu etkinin tümör büyüklüğüne etki edip etmediğinin analiz edilmesi, triple negatif meme kanseri tedavisinde Eribulin Mesilat ile birlikte kullanılma potansiyelini ortaya çıkarabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abd El-Aziz, Y. S., Gillson, J., Jansson, P. J., and Sahni, S. (2022). Autophagy: A promising target for triple negative breast cancers. *Pharmacological research*, 175, 106006.
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., and Ullah Khan, A. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*, 50(1),33.
- Alp, E., Yilmaz, A., Onen, H.I, and Menevse, E.S. (2017). Effects of EF-24, RAD001, and paclitaxel on the expression profiles of apoptotic and anti-apoptotic genes. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 13(2),346-350.
- Avery, T.P. (2018). Triple-Negative Breast Cancer. In: Howard-McNatt, M. (eds) Changing Paradigms in the Management of Breast Cancer. *Springer, Cham*. pp 155–166.
- Ban, K. A., and Godellas, C. V. (2014). Epidemiology of breast cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 23(3), 409–422.
- Bertazza, L., Barollo, S., Mari, M.E., Faccio, I., Zorzan, M., Redaelli, M., Rubin, B., Armanini, D., Mian, C., and Pezzani, R. (2019). Biological Effects of EF24, a Curcumin Derivative, Alone or Combined with Mitotane in Adrenocortical Tumor Cell Lines. *Molecules* 24(12),2202.
- Bertucci, F., Finetti, P., Cervera, N., Esterni, B., Hermitte, F., Viens, P., and Birnbaum, D. (2008). How basal are triple-negative breast cancers? *International Journal of Cancer* 2008123(1), 236-40.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., and Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods in enzymology*, 452, 181–197.
- Bosch, A., Eroles, P., Zaragoza, R., Viña, J.R., and Lluch, A. (2010). Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treatment Reviews* 36(3),206-15.
- Boyle, P. (2012). Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Annals of Oncolog*, 23 Suppl 6, vi7-12.
- Caparica, R., Lambertini, M., and de Azambuja, E. (2019). How I treat metastatic triple-negative breast cancer. *ESMO Open* 4(Suppl 2), e000504.
- Cesar, A. S. M. (2020) Advances in Neoadjuvant and Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *Current Surgical Therapy*, Elsevier
- Chang, M., Shang, M., Yuan, F., Guo, W., and Wang, C. (2021). EF24 exerts cytotoxicity against NSCLC via inducing ROS accumulation. *Cancer Cell International*, 21, 531-544.
- Collignon, J., Lousberg, L., Schroeder, H., and Jerusalem, G. (2016). Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer: Targets and Therapy* 8,93-107.

- Das, S., Shukla, N., Singh, S. S., Kushwaha, S., and Shrivastava, R. (2021). Mechanism of interaction between autophagy and apoptosis in cancer. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 26(9-10), 512–533.
- Dass, S.A., Tan, K.L., Selva, Rajan, R., Mokhtar, N.F., Moh, Adzmi, E.R., Wan, Abdul, Rahman, W.F., Tengku, Din, T.A.D.A., and Balakrishnan, V. (2021). Triple Negative Breast Cancer: A Review of Present and Future Diagnostic Modalities. *Medicina* 57(1),62.
- Dawood, S. (2010). Triple-negative breast cancer: epidemiology and management options. *Drugs* 70(17):2247-58.
- De Ruijter, T.C., Veeck, J., de Hoon, J.P.J, van Engeland, M., and Tjan-Heijnen, V.C. (2011). Characteristics of triple-negative breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 137(2),183-192.
- Duan, Y., Chen, H.L., Ling, M., Zhang, S., Ma, F.X., Zhang, H.C., and Lv, X.A. (2022). The Curcumin Analog EF24 Inhibits Proliferation and Invasion of Triple-Negative Breast Cancer Cells by Targeting the Long Noncoding RNA HCG11/Sp1 Axis. *Molecular and Cellular Biology* 42(1), e0016321.
- Foulkes, W.D., Smith, I.E., and Reis-Filho, J.S. (2010). Triple-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 363(20),1938-48.
- Funahashi, Y., Okamoto, K., Adachi, Y., Semba, T., Uesugi, M., Ozawa, Y., Tohyam, a O., Uehara, T., Kimura, T., Watanabe, H., Asano, M., Kawano, S., Tizon, X., McCracken, P.J., Matsui, J., Aoshima, K., Nomoto, K., and Oda, Y. (2014). Eribulin mesylate reduces tumor microenvironment abnormality by vascular remodeling in preclinical human breast cancer models. *Formerly Japanese Journal of Cancer Research*, 105(10),1334-42.
- Gottlieb E., SM Armour S.M., MH Harris M.H., and Thompson C.B. (2003). Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 10, 709-717.
- Guan, F., Ding, Y., Zhang, Y., Zhou, Y., Li, M., and Wang, C. (2016). Curcumin Suppresses Proliferation and Migration of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells through Autophagy-Dependent Akt Degradation. *PloS one*, 11(1), e0146553.
- Guney Eskiler, G., Cecener, G., Egeli, U., and Tunca, B. Triple negative breast cancer: new therapeutic approaches and *BRCA* status. *APMIS* 2018; 126: 371– 379
- Harbeck, N., and Gnant, M. (2017). Breast cancer. *The Lancet*, 389(10074),1134-1150.
- Hassiotou, F. and Geddes D. (2013). Anatomy of the Human Mammary Gland: Current Status of Knowledge. *Clinical Anatomy* 26,29-48.
- He, G., Feng, C., Vinothkumar, R., Chen, W., Dai, X., Chen, X., Ye, Q., Qiu, C., Zhou, H., Wang, Y., Liang, G., Xie, Y., and Wu, W. (2016). Curcumin analog EF24 induces apoptosis via ROS-dependent mitochondrial dysfunction in human colorectal cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 78(6),1151-1161.

- Hsiao, P.C., Chang, J.H., Lee, W.J., Ku, C.C., Tsai, M.Y., Yang, S.F., and Chien, M.H. (2020). The Curcumin Analogue, EF-24, Triggers p38 MAPK-Mediated Apoptotic Cell Death via Inducing PP2A-Modulated ERK Deactivation in Human Acute Myeloid Leukemia Cells. *Cancers* 12(8),2163.
- Ibáñez Gaspar, V., McCaul, J., Cassidy, H., Slattery, C., and McMorrow, T. (2021). Effects of Curcumin Analogues DMC and EF24 in Combination with the Cytokine TRAIL against Kidney Cancer. *Molecules* 26(20),6302.
- İnternet: Bonnie N Joe, B. N., (2019). Clinical features, diagnosis, and staging of newly diagnosed breast cancer. Web: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-features-diagnosis-and-staging-of-newly-diagnosed-breast-cancer> adresinden 11 Ekim 2019 tarihinde alınmıştır
- İnternet: Cancer Stat Facts: Female Breast Cancer Subtypes. (2022). Web: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast-subtypes> adresinden 21 Aralık 2022 tarihinde alınmıştır
- İnternet: Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2020, Turkey, females, all ages. (2020). Web: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020andmode=cancerandmode_population=countriesandpopulation=900andpopulations=792andkey=asrandsex=2andcancer=39andtype=0andstatistic=5andprevallence=0andpopulation_group=0andages_group%5B%5D=0andages_group%5B%5D=17andnb_items=10andgroup_cancer=1andinclude_nmsc=1andinclude_nmsc_other=0andtype_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257Dandorientation=horizontalandtype_sort=0andtype_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D#collapse-group-0-1 adresinden 24 Kasım 2022 tarihinde alınmıştır
- Jiang W., Wang, X., Zhang, C., Xue, L., and Yang L. (2020). Expression and clinical significance of MAPK and EGFR in triple-negative breast cancer. *Oncology Letters* 19, 1842-1848.
- Jimenez, P.C., Wilke, D.V., and Costa-Lotufo, L.V. (2018). Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans. *Clinics (Sao Paulo)*, 73(suppl 1):e482s.
- Kasinski, A.L, Du, Y., Thomas., S.L., Zhao, J., Sun, S.Y., Khuri, F.R., Wang, C.Y., Shoji, M., Sun, A., Snyder, J.P., Liotta, D., and Fu, H. (2008). Inhibition of IκB Kinase-Nuclear Factor-κB Signaling Pathway by 3,5-Bis (2 fluorebenzylidene) piperidin-4-one (EF24), a Novel Monoketone Analog of Curcumin. *Molecular Pharmacology* 74(3),654-651.
- Lee, A., Moon, B.I., and Kim, T.H. (2020). BRCA1/BRCA2 Pathogenic Variant Breast Cancer: Treatment and Prevention Strategies. *Annals of Laboratory Medicine* 40(2),114-121.

- Lee, C.L., Ho Y.C., Lin C.W., Hsin M.C., Wang, P.H., Tang, Y. C., Yang, S.F., and Hsiao, Y.H. (2022). EF-24 inhibits TPA-induced cellular migration and MMP-9 expression through the p38 signaling pathway in cervical cancer cells. *Environmental Toxicology* 1-9. DOI: 10.1002/tox.23709.
- Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y., and Pietenpol, J.A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation* 121(7),2750-2767.
- Leone, J.P., Leone, J., Zwenger, A.O., Iturbe, J., Leone, B.A., and Vallejo, C.T. (2017) Prognostic factors and survival according to tumour subtype in women presenting with breast cancer brain metastases at initial diagnosis. *European Journal of Cancer* 74:17-25.
- Lin, H., Chen, X., Zhang, C., Yang, T., Deng, Z., Song, Y., Huang, L., Li, F., Li, Q., Lin, S., and Jin, D. (2021). EF24 induces ferroptosis in osteosarcoma cells through HMOX1. *Biomedicine and pharmacotherapy = Biomedecine and pharmacotherapie*, 136, 111202.
- Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., and Stanisławek, A. (2021). Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers*, 13(17), 4287.
- Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., and Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer biology and therapy*, 10(10), 955–960.
- Millikan, R. C., Newman, B., Tse, C. K., Moorman, P. G., Conway, K., Dressler, L. G., Smith, L. V., Labbok, M. H., Geradts, J., Bensen, J. T., Jackson, S., Nyante, S., Livasy, C., Carey, L., Earp, H. S., and Perou, C. M. (2008). Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 109(1), 123–139.
- Mo, N., Li, Z. Q., Li, J., and Cao, Y. D. (2012). Curcumin inhibits TGF- β 1-induced MMP-9 and invasion through ERK and Smad signaling in breast cancer MDA-MB-231 cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 13(11), 5709–5714.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mukhopadhyay, S., Panda, P. K., Sinha, N., Das, D. N., and Bhutia, S. K. (2014). Autophagy and apoptosis: where do they meet?. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 19(4), 555–566.
- Onen, H. I., Yilmaz, A., Alp, E., Celik, A., Demiroz, S. M., Konac, E., Kurul, I. C., and Menevse, E. S. (2015). EF24 and RAD001 potentiates the anticancer effect of platinum-based agents in human malignant pleural mesothelioma (MSTO-211H) cells and protects nonmalignant mesothelial (MET-5A) cells. *Human and Experimental Toxicology* 34(2),117-126.

- Orun, Y. (2017). Türkiye’de yaşam boyu kansere yakalanma riski. *Sosyal Güvençe*, 0 (12), 108-124.
- Özmen, V., Özmen, T., and Doğru, V. (2019). Breast Cancer in Turkey; An Analysis of 20.000 Patients with Breast Cancer. *European journal of breast health*, 15(3), 141–146.
- Pandya, S., and Moore, R. (2011). Breast Development and Anatomy. *Clinical Obstetrics And Gynecology* 54(1),91-95.
- 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., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., and Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797),747-752.
- Pharoah, P.D.P., Guilford, P., and Caldas, C. (2001). Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology*, 121 (6), 1348-1353.
- Risinger, A. L., Dybdal-Hargreaves, N. F., and Mooberry, S. L. (2015). Breast Cancer Cell Lines Exhibit Differential Sensitivities to Microtubule-targeting Drugs Independent of Doubling Time. *Anticancer research*, 35(11), 5845–5850.
- Robles-Escajeda, E., Das, U., Ortega, N.M., Parra, K., Francia, G., Dimmock, J.R., Varela-Ramirez, A., and Aguilera, R.J. (2016). A novel curcumin-like dienone induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Cellular Oncology* 39, 265-277.
- Rojas, K., and Stuckey, A. (2016). Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 59(4), 651-672.
- Rowe, D.L., Ozbay, T., O'Regan, R.M., and Nahta, R. (2009). Modulation of the BRCA1 Protein and Induction of Apoptosis in Triple Negative Breast Cancer Cell Lines by the Polyphenolic Compound Curcumin. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* 3,61-75.
- Schon, K., and Tischkowitz, M. (2018). Clinical implications of germline mutations in breast cancer: TP53. *Breast cancer research and treatment*, 167(2), 417–423.
- Shiovitz, S., and Korde, L.A. (2015). Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Annals of Oncology*, 26(7),1291-9.
- Sporikova, Z., Koudelakova, V., Trojanec, R., and Hajduch, M. (2018). Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, 18(5), e841-e850.
- Sun, X., Liu, X., and Huang, D.S. (2012). Curcumin induces apoptosis of triple-negative breast cancer cells by inhibition of EGFR expression. *Molecular Medicine Reports* 6, 1267-1270.

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.
- Swami, U., Shah, U., and Goel, S. (2015). Eribulin in Cancer Treatment. *Marine Drugs* 143,5016-5058.
- Tan, M. H., Mester, J. L., Ngeow, J., Rybicki, L. A., Orloff, M. S., and Eng, C. (2012). Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(2), 400–407.
- Teng, X., Hayashida, T., Murata, T., Nagayama, A., Seki, T., Takahashi, and M., Kitagawa, Y. (2021). A transposon screen identifies enhancement of NF- κ B pathway as a mechanism of resistance to eribulin. *Breast Cancer* 28, 884- 895.
- Thomas, S.L., Zhao, J., Li, Z., Lou, B., Dub, Y., Purcell, J., Snyder J.P., Khuri, F.R., Liotta, D., and Fu, H. (2010) Activation of the p38 pathway by a novel monoketone curcumin analog, EF24, suggests a potential combination strategy. *Biochemical Pharmacology* 80, 1309-1316.
- Torabi Dalivandan, S., Plummer, J., and Gayther, S. A. (2021). Risks and Function of Breast Cancer Susceptibility Alleles. *Cancers*, 13(16), 3953.
- Uscanga, Perales, G.I., Santuario, Facio, S.K., and Ortiz, Lopez, R. (2016). Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity. *Medicina Universitaria*, 18(71),105-114.
- Wang, K., Zhang, C., Bao, J., Jia, X., Liang, Y., X Wang, X., Chen, M., Su, H., Li, P., Wan J.B., and He, C. (2016). Synergistic chemopreventive effects of curcumin and berberine on human breast cancer cells through induction of apoptosis and autophagic cell death. *Scientific Reports* 6, 26064.
- Yao, Y., Chu, Y., Xu, B., Hu, Q., and Song, Q. (2019). Risk factors for distant metastasis of patients with primary triple-negative breast cancer. *Bioscience Reports* 39(6): BSR20190288.
- Yar, Saglam, A.S., Yilmaz, A., Onen, H.I., Alp, E., Kayhan, H., and Ekmekci, A. (2016). HDAC inhibitors, MS-275 and salermide, potentiates the anticancer effect of EF24 in human pancreatic cancer cells. *EXCLI Journal* 15,246-255.
- Yar, Sağlam, A., S., Elmazoğlu, Z., Kayhan, H., Önen, H.I., Yılmaz, A., ve Menevşe, E., S. (2018). EF24'ün Dosetaksel ile Sıralı Uygulanmasının Metastatik Meme Kanseri Hücre Hattına Etkisi. *Fırat Tıp Dergisi*, 23(2), 58-67.
- Yin, D.L, Liang, Y.J., Zheng, T.S., Song, R.P., Wang, J.B., Sun, B.S., Pan, S.H., Qu, L.D., Liu, J., R., Jiang, H.C., and Liu, L.X. (2016). EF24 inhibits tumor growth and metastasis via suppressing NF-kappaB dependent pathways in human cholangiocarcinoma. *Scientific Reports* 6,32167.

Yonghan, H., L, Wen L., Hu G., Sun, H and Kong, Q. (2018). Bioactivities of EF24, a Novel Curcumin Analog: A Review. *Frontiers in Oncology* 8,614.

Zou, P., Xia, Y., Chen, W., Chen, X., Ying, S., Feng, Z., Chen, T., Ye, Q., Wang, Z., Qiu, C., Yang, S., and Liang, G. (2016). EF24 induces ROS-mediated apoptosis via targeting thioredoxin reductase 1 in gastric cancer cells. *Oncotarget* 7(14),18050-64.





ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : YALÇIN BURHAN, Başak
Uyruğu : TC

Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi / Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2004
Lisans	Ankara Üniversitesi / Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2000
Lise	Sinop Anadolu Öğretmen Lisesi	1996

İş Deneyimi, Yıl	Yer	Görev
2019-devam ediyor	Ankara Bilkent Şehir Hastanesi	Akreditasyon Koordinatörü
2008-2020	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hast.	Kalite Koordinatörü
2005-2008	Tokat Halk Sağlığı Laboratuvarı	Laboratuvar Sorumlusu

Yabancı Dil: İngilizce

Yayınlar

1. Turkcapar, N., Tuncalı, T., Kutlay, S. et al. The contribution of genotypes at the MICA gene triplet repeat polymorphisms and MEFV mutations to amyloidosis and course of the disease in the patients with familial Mediterranean fever. Rheumatol Int 27, 545–551 (2007).
2. Akman AÖ, Burhan BY, Uzun AK, Taş D. Hepatitis A virus age-specific seroprevalence after the implementation of a Toddlers' Vaccination in Turkey: Shifting susceptibility to adolescents. Turk Pediatri Ars. 2020 Dec 16;55(4):370-375.

3. Yigit, M., Ozkaya-Parlakay, A., Yilmaz, N., Akyol, O., Gulhan, B., Kanik Yuksek, S., Yalcin Burhan, B., Kilic, E.K. and Karagol, C. (2022), Potential and promising marker for serious bacterial infections in children: Delta neutrophil index. J Paediatr Child Health, 58: 1623-1628.
4. Celik OM, Burhan Yalcin B, Hanalioglu D, Akman AO. Evaluation of Clinical and Laboratory Differences Between Rotavirus Detected and Undetected Gastroenteritis in Children Hospitalized in Pediatric Emergency Care. Firat Med J 2020; 25(4): 173-178.
5. Yakut, H. İ., Burhan, B. Y., Çiftçi, A. and Orhan, M. F. (2012). Sağlıkta Güvenlik ve Fiziksel Şiddet: Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden Bir Çalışma. Türkiye Çocuk Hastalıkları Dergisi, 6 (3), 146-154.





GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..